

機関番号：37111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23650628

研究課題名（和文） がん転移抑制剤の探索を指向したがん転移モデルの構築

研究課題名（英文） Construction of a metastatic model in cancer for searching the metastatic inhibitor

研究代表者

芝口浩智（SHIBAGUCHI Hiroto）

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：60295061

研究成果の概要（和文）：本研究計画では、標的組織における接着阻害をその作用機序とする新規がん転移抑制剤の開発に有用な *in vitro* がん転移モデルの構築を試みた。今回作製した *in vitro* がん転移モデル系を用いて CEACAM6 の発現抑制した HLC-1 で細胞外マトリクス collagen IV との相互作用／接着について検討したところ、CEACAM6 抑制により collagen と相互作用する HLC-1 の減少が確認でき、新規がん転移抑制剤の開発に有用なツールになることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this project is to make a novel metastatic model in cancer for searching the anti-metastatic agent, that works by preventing the interaction between tumor cells and the target organ. The reduction of cell number interacting with collagen IV, an extracellular matrix, was observed in this model using HLC-1 cells with less amount of CEACAM6 on the cellular surface generated by shRNA, meanings that this model system might be a useful tool for searching a novel metastatic inhibitor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：抗がん物質検索・ケミカルバイオロジー、がん転移モデル

1. 研究開始当初の背景

がん治療を難しくしている原因の一つは、がんの浸潤・転移であり、その効果的な抑制は治療における非常に有用な手段となる。がんの浸潤・転移の抑制を考えたとき、(1) Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) で知られる原発巣での腫瘍細胞の質的变化を抑制する方法のほか、(2) 循環系に侵入した腫瘍細胞が標的組織の微小循環系において、接着・浸潤するのを妨げる方法が考えられる。これまでがんの浸潤・転移の抑制では (1) を中心に EMT のメカニズムの解明や抑制剤の開発が精力的に行われてきたが、これまでほとんど報告がないものの (2) についても、anoikis として知られる足場依存性細胞死を考えると有効な戦略といえる。

2. 研究の目的

本研究計画では、まず細胞の接着に関わる候補遺伝子／分子の細胞間あるいは細胞-細胞外マトリクス (ECM) の相互作用への影響をリアルタイムで観察・解析でき、がん転移抑制剤の開発に必要な基礎的情報が得られる *in vitro* 疑似血管モデル実験系の構築を試みるとともに、その有用性を確認する。

3. 研究の方法

(1) 従来のウェルを用いたバッチ法による抗 CEACAM 抗体の足場依存的細胞死に対する影響の確認：マウス抗体遺伝子を knockout し代わりにヒト抗体遺伝子を導入して作製した KMmouse™ に、癌胎児性抗原 (CEA) を

免疫して得たヒト抗 CEA 抗体とマウス抗 CEACAM6 抗体を用いて足場依存的細胞死における各抗体の影響を WST-8 assay にて検討した。

(2) 細胞接着因子 CEACAM6 の発現を RNA 干渉により抑制したヒト肺癌細胞株 HLC-1 の作製と発現解析：レンチウイルスを用いて shRNA 発現ベクターを HLC-1 に導入し、RNA 干渉にて CEACAM6 の発現を抑制し、その蛋白質発現量を特異的抗体を用いてウエスタンブロットにて、また、細胞表面の発現量をフローサイトメトリーによってそれぞれ確認した。その一方で、CEA の発現量もフローサイトメトリーにて確認した。

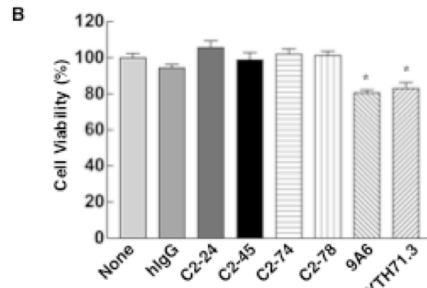
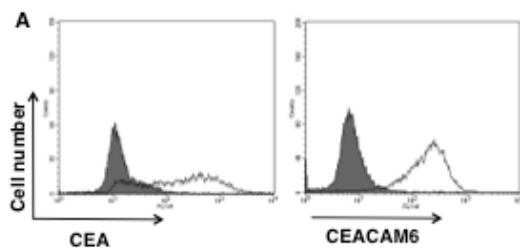
(3) *In vitro* 疑似血管モデル実験系の構築：血管を模したキャピラリー中を腫瘍細胞が還流しコートした細胞外マトリクス等との相互作用をリアルタイムに顕微鏡下で観察できるがん転移モデル実験系を構築し以下の実験に用いた。

(4) 新規がん転移モデルを用いた細胞外マトリクス collagen IV と HLC-1 相互作用における CEACAM6 の影響：がん転移モデルを用いて細胞外マトリクス collagen IV と HLC-1 の相互作用を観察した。このとき、細胞接着因子 CEACAM6 の影響を発現抑制細胞を用いて検討した。HLC-1 と collagen IV との相互作用は、1 時間後の接着細胞数を指標として求めた。

4. 研究成果

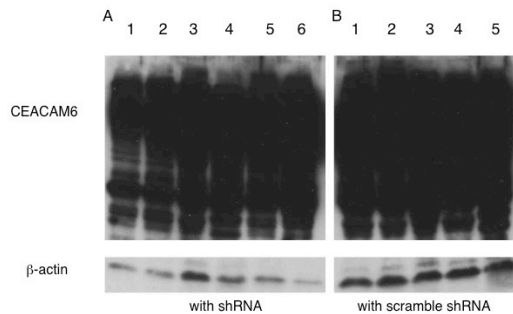
(1) バッチ法において抗 CEACAM6 抗体は足場依存的細胞死を促進した：今回用いたヒト肺癌細胞株 HLC-1 は、その細胞表面に細胞接着因子である CEA と CEACAM6 の両方を発現している (図 1 A)。一連のヒト抗 CEA 抗体は、いずれもバッチ法で HLC-1 の足場依存的細胞死に影響を与えなかったが、抗 CEACAM6 抗体と抗 CEA/CEACAM6 抗体はいずれも足場依存的細胞死を促進した (図 1 B)。この結果は、抗 CEACAM6 抗体ががん転移抑制剤として有効である可能性を示唆する。

図 1 (↓)



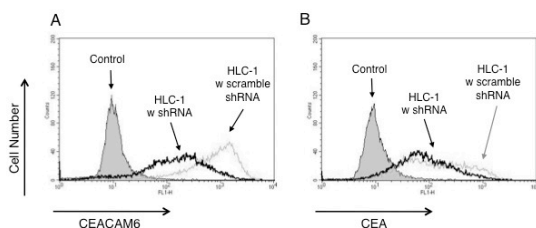
(2) 細胞接着因子 CEACAM6 の発現を RNA 干渉により抑制したヒト肺癌細胞株 HLC-1 を作製した：細胞接着因子 CEACAM6 に対して RNA 干渉を引き起こす配列と塩基配列がランダムな配列を HLC-1 に導入し、一連のクローンにおける CEACAM6 の発現量を確認した。内部標準として β -actin を用いたウエスタンブロットでは蛋白質発現量の減少が認められた (図 2 A)。

図 2 (↓)



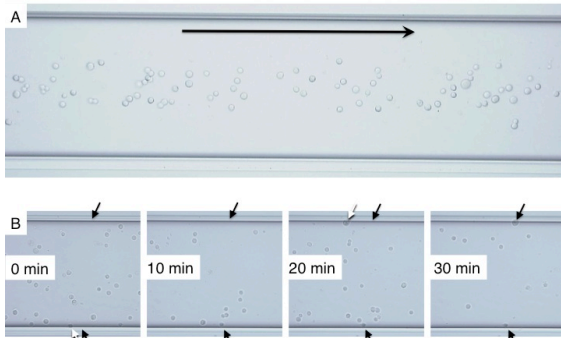
さらに、細胞表面上に発現し細胞接着に関する CEACAM6 の発現量は 1/5 程度まで減少することをフローサイトメトリーにて確認した (図 3 A)。このとき、発現抑制の特異性を担保するために同じ CEACAM ファミリーの CEA についても検討を行い、CEA の発現に変化のないことを確認した (図 3 B)。

図 3 (↓)

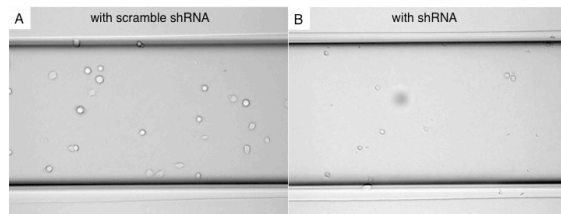


(3) 細胞動態と相互作用を経時的に観察できる *in vitro* がん転移モデルを構築した：本モデル実験系の特徴は、流れのある中での相互作用を観察できることで、HLC-1 がキャピラリー中を移動して行く様子を観察できる (図 4 A)。流速は精密ポンプを用いることで自在に変更できるため、より生体の微小環境に近い条件で観察することが可能である。今回、HLC-1 を用いた実験では 0.5 dyne/cm^2 の流速で観察を行ったところ、細胞の接着する様子が観察できた (図 4 B)。

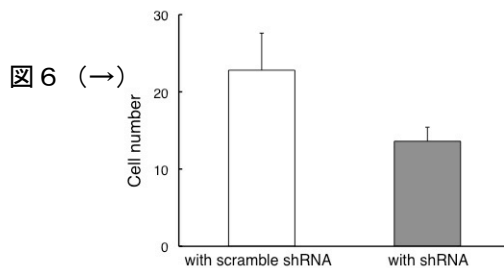
図 4 (↓)



(4) 新規 *in vitro* がん転移モデルにおいて CEACAM6 の発現抑制は collagen IV との相互作用を減弱させた：RNA 干渉によって CEACAM6 の発現を抑制した HLC-1 と比較したところ、collagen IV との相互作用が *in vitro* がん転移モデルで減弱する結果が得られた (図 5)。 図 5 (↓)



任意の 5 視野における細胞数を数えたところ、いずれの視野においても CEACAM6 の発現を抑制した HLC-1 の方が接着している細胞数が少ないという結果となった (図 6)。



この結果は、ウェルを用いたバッチ法で得られた結果を支持するものであり、また、抗体ではなく CEACAM6 そのものの発現を抑制しているという違いがあるものの、阻害/抑制効果がバッチ法よりも大きいことから、当初の目的通り、より生体の微小環境を反映したモデル実験系であることが示唆され、今後この新規がん転移モデル実験系が転移抑制をその作用機序とした阻害剤探索に有用なツールとなりうることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Tsuru H, Shibaguchi H, Kuroki M, Yamashita Y, Kuroki M. Tumor growth inhibition by sonodynamic therapy using a novel sonosensitizer. *Free Radical Bio Med*, *in press*, 2012. 査読あり

2. Shibaguchi H, Tsuru H, Kuroki M, Kuroki M. The enhancement of antitumor effect on combination therapy of an anticancer drug and its antibody against carcinoembryonic antigen. *Chemotherapy*, 58(2): 110-117, 2012. 査読あり

3. Shirasu N, Yamada H, Shibaguchi H, Kuroki M, Kuroki M. Molecular Characterization of a fully human chimeric T cell antigen receptor for tumor-associated antigen EpCAM. *J Biomed Biotech*, 2012: doi:10.1155/2012/853879. 査読あり

4. Shibaguchi H, Tsuru H, Kuroki M, Kuroki M. Sonodynamic cancer therapy: a non-invasive and repeatable approach using low-intensity ultrasound with a sonosensitizer. *Anticancer Res.*, 31:2425-2430, 2011. 査読あり

5. Ohmura T, Fukushima K, Shibaguchi H, Yoshizawa S, Inoue T, Kuroki M, Sasaki K, Umemura SI. Sonodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid and focused ultrasound for deep-seated intracranial glioma in rat. *Anticancer Res*, 31(7): 2527-2534, 2011. 査読あり

6. Shibaguchi H, Tsuru H, Hachimine K, Kuroki M, Kuroki M. Sonodynamic cancer therapy using low-intensity ultrasound with novel porphyrin derivatives. *Proceedings of the 20th annual meeting of the Japan society of sonochemistry and the international workshop on advanced sonochemistry*, 152-154, 2011. 査読あり

7. 芝口浩智, 山下祐一. 超音波のがん治療への応用. *Research*, 16(1): 20-22, 2011. 査読なし

[学会発表] (計 4 件)

1. 芝口浩智, 黒木政秀：がん超音波力学療法における細胞傷害機構, 第 15 回バイオ治療法研究会学術集会、福岡、2011.12.03.

2. 芝口浩智, 水流弘文、大村忠寛、黒木 求、黒木政秀：超音波感受性物質を用いたがん超音波力学療法 *の in vivo* 抗腫瘍効果 (シンポジウム). 第 10 回超音波治療研究会、東京、2011.11.26.

3. Shibaguchi H, Tsuru H, Hachimine K, Kuroki M, Kuroki M: Sonodynamic cancer therapy using low-intensity ultrasound with novel porphyrin derivatives. The international workshop on advanced sonochemistry and the 20th annual meeting of the Japan society of sonochemistry, Nagoya, Japan, 2011.11.03.

4. 芝口浩智、黒木 求、黒木政秀：超音波感受性物質 DEG を併用した低出力超音波照射における細胞傷害機構。第 70 回日本癌学会学術集会、名古屋、2011.10.04.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：TUMOR PROLIFERATION INHIBITOR CONTAINING ULTRASOUND-SENSITIVE SUBSTANCE AND METHOD FOR INHIBITING TUMOR PROLIFERATION USING TUMOR PROLIFERATION INHIBITOR AND LOW-INTENSITY PULSED ULTRASOUND

発明者：Shibaguchi Hiroto, Tsuru Hirofumi.

権利者：Fukuoka University

種類：PCT 国際出願

番号：PCT/JP2011/069590

出願年月日：Aug 30 2011

国内外の別：外国

○ 取得状況（計 0 件）

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/biochem1/index-j.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

芝口 浩智 (SHIBAGUCHI Hiroto)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：60295061

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし