

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790452

研究課題名(和文)小細胞肺癌の新規骨転移モデルの開発とそれを活用した転移機構の解析

研究課題名(英文)Development of a novel orthotopic transplantation model of human small cell lung cancer metastasis.

研究代表者

坂本 修一(SAKAMOTO, Shuichi)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所 沼津支所・主任研究員

研究者番号：60346070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：小細胞肺癌はその強力な転移能ゆえに最も予後不良な癌の一つとなっており、転移機構の解明は治療成績改善のために極めて重要である。本課題では、ヒト小細胞肺癌をマウス肺に接種して多臓器に遠隔転移させるモデル系を新たに開発し、転移機構の解析を行った。その結果、本モデルに用いた小細胞肺癌由来細胞株が、細胞の運動を促進する因子HGFを自己分泌することが判った。HGFの自己分泌は臨床の小細胞肺癌でも見られる現象であり、本モデルの妥当性を示している。

また、転移巣から癌細胞を回収して再度接種することを繰返し、より転移能が高い亜株も樹立した。この亜株を利用して、モデルの遠隔転移頻度を向上させることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Because small cell lung cancer (SCLC) is an aggressive cancer with highly metastatic activity, it is important to reveal the molecular basis of the SCLC metastasis for improvement of SCLC therapeutics. In this study, we developed a new in vivo orthotopic model for SCLC metastasis and investigated the molecular mechanism of metastasis using the model. We found that cells used in our model expressed both HGF and its receptor c-MET, and that condition medium of the cells enhanced motility of them. These data suggest the existence of an HGF/MET autocrine loop in our model as in SCLC patients. Moreover, we established a new subclone of the cells with higher metastatic activity through in vivo selection cycles, and successfully improved our model using this subclone.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：癌転移 小細胞肺癌 同所移植 HGF

1. 研究開始当初の背景

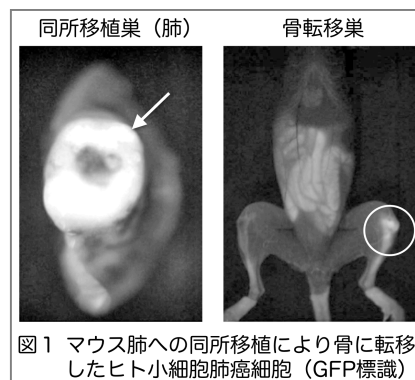
肺癌は難治性癌の一つであり、本邦においては死亡者数が年々増加し、性別を問わず悪性腫瘍による死亡原因の上位を占めている。このうち原発性肺癌の10~20%を占める小細胞肺癌は、その多くが神経内分泌性を示し、骨・脳・肝臓・副腎等への遠隔転移を高頻度に生じるため、予後は極めて不良である。小細胞肺癌の治療では、遠隔転移の頻度が高いために外科的治療はあまり行われず、放射線や化学療法剤(シスプラチン等)を用いた内科的治療が行われるが、多くの場合初回治療は奏功するものの再発をきたし、その結果2年生存率が20%以下という極めて厳しい治療状況にある。このような低い治療成績を改善する上で、遠隔転移の制御が非常に重要な課題となっている。

癌の転移は、原発巣からの離脱→血管やリンパ管等の脈管への浸潤→脈管内での生存及び移動→転移臓器の脈管内皮への接着→転移臓器への浸潤→転移臓器内での増殖、という多数の過程を経る複雑な現象である。そのため転移に関与する因子も多岐にわたっており、細胞の運動・接着能や転移先臓器との相互作用に関わる接着因子やサイトカイン(例えば乳癌骨転移におけるCTGF等: Kang *et al.* Cancer Cell 2003)、転移関連遺伝子群の発現制御を行う転写因子やmiRNA(例えば肺腺癌におけるmiR-200: Gibbons *et al.* Genes Dev. 2010)、さらにゲノム全体のエピジェネシスを制御するlincRNA(Long non-coding RNA; 長鎖非コードRNA)(乳癌におけるHOTAIR: Gupta *et al.* Nature 2010)等の関与が明らかになっている。さらにこれらの因子群に加えて、近年注目を集めている癌幹細胞や上皮-間葉系転換といった癌の形質・現象が、転移においても重要な意義を持つと考えられている。

このように転移研究は乳癌等を中心に既に一定の進展を見せてはいるが、転移は癌の発生した臓器や組織型、分化度によって転移経路や転移先臓器、転移成立の分子機構が大きく異なるため、転移を制御するためには癌種ごとに分子機構を詳細に解析する必要がある。小細胞肺癌については、PTHrPの関与(Miki *et al.* Int. J. Cancer 2004)等の報告があるが、他の癌種と比較すると、転移の分子機構に関する知見は、その治療における意義にも関わらず著しく少ない状況であった。

研究代表者の所属する研究グループでは、化合物の抗がん活性の評価等に、マウスを用いた蛍光 *in vivo* イメージング法を行っていたが、その実験の過程で、ヒト小細胞肺癌由来の細胞株から遠隔転移を起こす亜株を樹立することに成功した(図1)。転移性亜株については、*in vivo* での転移能が異なる複数の亜株を既に樹立していた(以下第一世代亜株と呼ぶ)。同所移植により遠隔転移をきたす自然転移モデルは、小細胞肺癌について

は本研究開始時点で報告がなかった。



2. 研究の目的

独自に見出した転移能を持つヒト小細胞肺癌由来の細胞株を用いて、ヌードマウスへの同所移植による自然転移モデルを新たに開発する。これを活用して抗癌活性を有する化合物の評価を行うとともに、不明な点が多い小細胞肺癌の転移機構の解析を行い、転移制御のための治療標的の同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* での転移性亜株の解析: 本課題の開始時に既に樹立していた第一世代亜株について *in vitro* での性質の解析を行い、さらに *in vivo* 転移能と相関しうる *in vitro* 形質であるマトリゲル浸潤能に関わる遺伝子を探索した。

(2) *in vivo* での化合物の評価: 小細胞肺癌の転移に関与しうる経路に対する分子標的剤を本モデルに投与し、同所移植巣と遠隔転移形成への効果を検討した。

(3) *in vivo* 選択法: より高い転移能を備えた亜株や、転移先臓器が限定された亜株を樹立するために、*in vivo* 選択法による新たな転移性亜株の樹立を試みた。

4. 研究成果

(1) *in vitro* での転移性亜株の解析

本課題の開始時に既に樹立済みであった第一世代の転移性亜株について、*in vitro* での性質を解析した。細胞外基質(フィブロネクチン、I型コラーゲン、IV型コラーゲン等)への結合能や、抗癌剤(シスプラチン、カンプトテシン、エトポシド、ブレオマイシン、5-FU等)に対する感受性を比較したが、第一世代亜株間で顕著な違いは認められなかった。また、14種のサイトカイン/増殖因子類の増殖への影響をMTTアッセイにて評価したが、やはり亜株間で差異は見られなかった。

一方、トランスウェルチャンバーを用いて遊走能及びマトリゲル浸潤能を測定したところ、細胞遊走因子としてチャンバー下室に転移性亜株の培養上清を入れた場合、10%ウシ血清を入れた場合と比較して遊走細胞が著しく増加する事が判った。さらに、この条件下では高転移性の亜株がより高いマトリゲル浸潤能を示すことが判明した。

そこで、80種のサイトカイン/増殖因子類を検出できる抗サイトカイン抗体アレイ (RayBio 社) を用いて転移性亜株の培養上清を調べたところ、HGF が含まれていることが判った。HGF に対する中和抗体、あるいは HGF 受容体である c-MET の阻害剤をチャンバーに添加すると、遊走及び浸潤が有意に抑制されたことから、HGF がこの細胞の運動能に影響する因子の一つであると考えられた。

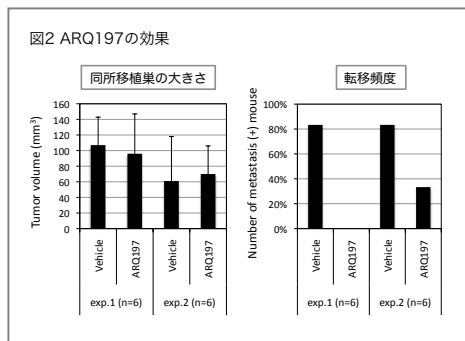
また、複数の第一世代亜株について全遺伝子をカバーするマイクロアレイ (Agilent 社) を用いて遺伝子発現プロファイルを解析し、*in vivo* 転移能と発現量が相関する遺伝子群を同定した。その一部については定量的 RT-PCR で発現量の変動を確認した。高転移性亜株 (*in vitro* でのマトリゲル浸潤能も亢進している亜株) で発現が高い遺伝子群の中から、主に転写因子に着目して複数の遺伝子について siRNA ノックダウンを行い、マトリゲル浸潤能に与える影響を検討した。その結果、この高転移性亜株のマトリゲル浸潤能に関する2つの遺伝子を同定した。

(2) *in vivo* での分子標的剤の評価

本モデルで用いた転移性亜株は GFP で標識しており、蛍光観察によって微小な転移も比較的容易に検出可能である。詳細な観察の結果、骨以外に副腎、脳、リンパ等にも頻繁に転移することが判った。この転移先臓器は臨床の小細胞肺癌と同様である。そこで、本モデルを用いて、分子標的剤の *in vivo* での腫瘍形成及び遠隔転移に対する効果を評価した。

まず、ケモカイン CXCL12 (SDF1) の受容体 CXCR4 のアンタゴニスト AMD3100 の評価を行った。 1×10^6 個の第一世代の高転移性亜株をヌードマウス肺に同所移植し、その翌日より AMD3100 (7.5 mg/kg) を週5回腹腔内投与した。移植後26日もしくは27日に犠牲死させ、同所移植巣の腫瘍径と遠隔転移巣を測定したが、この投与プロトコールでは AMD3100 の同所移植巣及び遠隔転移巣形成への有意な影響は認められなかった。

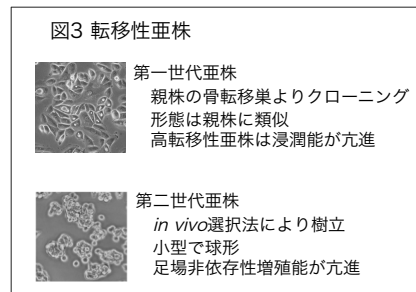
次に、HGF 受容体 cMET のキナーゼ阻害剤 ARQ197 について同様に検討を行った。同所移植後3日目より ARQ197 (120mg/kg) を週5回経口投与し、移植後25日もしくは26日に犠牲死させた。その結果、ARQ197 投与群では、同所移植巣の形成はコントロール群と同程



度であったが、転移頻度の低下が認められた (図2)。

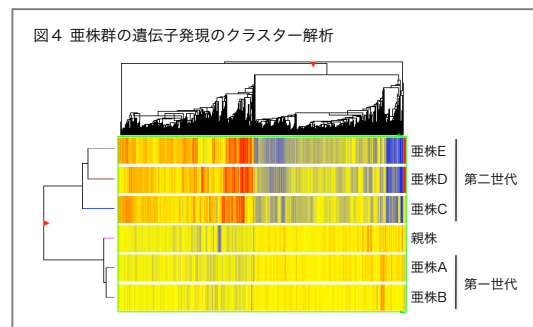
(3) *in vivo* 選択法による新しい亜株の樹立

転移性亜株のバリエーションを増やすために *in vivo* 選択法による新しい亜株の取得を試みた。すなわち、「遠隔転移巣からの回収→*in vitro*での培養→ヌードマウス肺への再接種」を5サイクル以上繰返し、転移能が向上した亜株を複数取得する事が出来た (以下第二世代亜株と呼ぶ)。第一世代亜株が培養皿に接着後進展して増殖するのに対し、第二世代亜株は進展せず球形のまま増殖する特徴を持つ (図3)。転移先臓器については、骨転移巣から回収するサイクルと副腎転移巣から回収するサイクルを行ったが、5サイクルを越えても、転移先臓器の限定化は出来なかった。



in vitro で第二世代亜株の性質の解析を行ったところ、抗癌剤感受性等には違いは見出せなかったが、超低接着性プレートでの培養における足場非依存性増殖能が、第一世代と比較して顕著に亢進している事が判った。足場非依存性増殖能は、*in vivo* での腫瘍形成能との相関が知られており、実際、皮下移植での腫瘍形成能は第一世代亜株よりも第二世代亜株の方が有意に高かった。そこで、この第二世代亜株を用いて条件検討を行い、第一世代亜株を用いる従来のプロトコールよりも、より高率かつ安定的に遠隔転移させるプロトコールを作成する事が出来た。

この第二世代亜株についてもマイクロアレイ解析を行ったところ、親株及び第一世代亜株とは異なるクラスターに分類されることが判った (図4)。さらに、第一世代との間で発現量に変動している遺伝子群を同定することが出来た。第二世代の足場非依存性増殖能に影響する遺伝子を同定するために、



発現量の変動が認められた中から5遺伝子についてsiRNAノックダウン実験を行ったが、いずれも足場非依存性増殖への関与は認められなかった。

(考察)

詳細な蛍光観察及び組織学的解析の結果、我々の自然転移モデルでは、骨以外に副腎、脳、リンパ等、臨床の小細胞肺癌患者と同様の臓器に遠隔転移することが判った。また、第一世代亜株の*in vitro*での解析から、本モデルでは癌細胞自身がHGFを分泌するとともに、その受容体cMETを介して運動能を亢進させていることが示唆された。臨床の小細胞肺癌においても、HGFを自己分泌するケースが知られている(Ma *et al.* British J. Cancer 2007)。このように、本モデルの特徴は小細胞肺癌の臨床像と共通しており、化合物評価や治療標的探索において有用なツールになると考えられる。

本モデルを用いて2種の分子標的剤の同所移植巣及び転移巣形成に与える影響を評価した。CXCR4アンタゴニストAMD3100については、今回の投与プロトコールでは有意な影響は認められなかった。小細胞肺癌においては別のCXCR4阻害剤での転移抑制効果が報告されており(Ohtani *et al.* FEBS letter 2012)、本モデルにおけるCXCR4の意義については更なる解析が必要であろう。

一方、cMET阻害剤であるARQ197投与では、同所移植巣の形成には影響はなかったが、遠隔転移抑制効果が認められた。これは乳癌転移モデルでの先行研究と同様の結果である(Previdi *et al.* Mol. Cancer Ther. 2012)。しかし本実験完了後に、ARQ197はcMET阻害に加えTubulin重合阻害活性を有することが報告された(Katayama *et al.* Cancer Research 2013)。これを考慮すると、ARQ197による転移抑制にHGF-METシグナル阻害がどの程度寄与していたのかは、不明である。

in vivo 選択法において、回収する転移先臓器を骨、もしくは副腎に固定して選択サイクルを繰返したが、転移臓器指向性をもつ転移性亜株を樹立することは出来なかった。乳癌等では*in vivo* 選択法による転移臓器指向性を持つ亜株の樹立が報告されており、今回の結果は小細胞肺癌に特徴的な転移機構の存在を反映しているのかも知れない。

in vivo 選択法により得られた第二世代の高転移性亜株は、回収した転移先臓器によらず足場非依存性増殖能が亢進していた。足場非依存性は転移形成の過程の一つである血流内での生存能力等と相関すると考えられ、そのためにより高転移性になった可能性がある。

本研究において、新たな小細胞肺癌の自然転移モデルを独自に開発した。本モデルは小細胞肺癌の臨床像に近い特徴を備えており、また、脳転移を形成する自然転移モデルは、小細胞肺癌ではこれまで知る限り報告はな

い。今後は、特に第二世代亜株の足場非依存性増殖能の解析をすすめ、治療標的となりうる因子の探索を進める予定である。

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)

[学会発表] (計7件)

1. 坂本修一、井上裕幸、川田学、宇佐美伊保美、雨宮昌秀、大庭俊一、幸田泰子、増田徹、野本明男：小細胞肺癌の同所移植による自然転移モデルの開発。第3回先端がん転移研究討論会，湯宿みかんの木（熱海市），2014年2月15日
2. 坂本修一、川田学：ヒト小細胞肺癌の自然転移モデルにおけるHGF/METシグナルの意義。第22回日本がん転移学会学術総会，ホテルブエナビスタ松本（松本市），2013年7月1日
3. 坂本修一、川田学、井上裕幸、大庭俊一、宇佐美伊保美、野本明男：小細胞肺癌の同所移植による自然転移モデルの開発。第10回がんハイポキシア研究会，横浜市開港記念館（横浜市），2012年12月7日
4. Shuichi Sakamoto, Manabu Kawada, Hiroyuki Inoue, Shun-ichi Ohba, Ihomi Usami, Akio Nomoto: Development of a novel orthotopic transplantation model of human small cell lung cancer metastasis. 14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society, Brisbane Convention & Exhibition Centre (Brisbane), Australia, Sep 4, 2012.
5. 坂本修一、川田学：ヒト小細胞肺癌の自然転移モデルの構築と転移機構の解析。第21回日本がん転移学会学術総会，オリエンタルホテル広島（広島市），2012年7月12日
6. 坂本修一、井上裕幸、大庭俊一、宇佐美伊保美、川田学、野本明男：小細胞肺癌の同所移植による自然転移モデルの開発。第2回先端がん転移研究討論会，金沢大学（金沢市），2012年2月25日
7. 坂本修一、川田学：小細胞肺癌の同所移植による自然転移モデルの開発。第20回日本がん転移学会学術総会，アクトシティ浜松（浜松市），2011年6月30日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 修一 (SAKAMOTO, Shuichi)

公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所沼津支所・主任研究員

研究者番号：60346070

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし