

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591166

研究課題名(和文) ヒト肺がん脳転移モデルを用いた新規脳転移療法開発のための探索的研究

研究課題名(英文) An exploratory analyses for for the development of novel therapeutic strategies against lung cancer brain metastases

研究代表者

埴淵 昌毅 (HANIBUCHI, Masaki)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：80335794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、肺がん脳転移に対する新規治療法開発のための探索的研究を行った。肺がん脳転移形成を規定する諸因子の検討では、肺がん脳転移巣において種々の血管新生因子の高発現が認められた。新規血管新生阻害剤を用いた治療によりヒト肺がん細胞による実験的脳転移形成が有意に抑制され、担がんマウスの生存期間も有意に延長した。

以上の知見より、肺がん脳転移形成における血管新生の重要性が明らかとなり、肺がん脳転移治療における新たな分子標的となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we performed exploratory analyses for the development of novel therapeutic strategies against lung cancer brain metastases.

The expression of various angiogenesis factors was observed in brain metastatic lesions of lung cancer, indicating the significance of angiogenesis in the metastasis formation to the brain. In an experimental brain metastasis model of human lung cancer, an anti-angiogenic agent significantly inhibited the growth of brain metastasis and revealed a striking survival prolongation of tumor-bearing mice.

These results suggest that the inhibition of angiogenesis could be a promising therapeutic strategy for the brain metastases of human lung cancer.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺がん 脳転移 血管新生 宿主因子

### 1. 研究開始当初の背景

肺がんは世界的にがん死亡原因の上位を占め、本邦でも部位別がん死亡原因の第1位となっている。肺がんは遠隔転移をきたす頻度が高く、既存の抗がん剤等による治療法では遠隔転移の完全な制御は困難であることから、遠隔転移形成は肺がん難治化の最大の要因となっている。したがって、肺がんの克服には肺がん転移形成における分子機構の解明とそれらの分子を標的とした制御法について検証していくことが必要不可欠である。

肺がんの多臓器転移のなかでも脳転移は麻痺、痙攣、意識障害を惹起するなど患者のQOLを著しく低下させる要因となる。肺がん脳転移の予後は極めて不良で、適切な治療が行われても脳転移が発見されてからの平均生存期間は3~4ヶ月であることから、その制御は喫緊の課題となっている。

我々は、肺がんの遠隔転移形成に関与する分子機構を解明するために、NK細胞を除去した免疫不全マウスを用いて臨床を反映したヒト肺がん転移モデルを確立した。同モデルを用いて、様々な遠隔転移関連分子を標的とした生物学的治療法開発に向けた基礎的研究を継続的に推進している。肺がんの多臓器転移形成に重要な役割を担う血管新生因子を標的とした新規治療法開発のための探索的研究においては、複数の血管新生因子を阻害する新規血管新生阻害剤が骨転移を含めた肺がんの多臓器転移形成を抑制することを明らかにするなど、現在までに多くの有用な知見を集積している。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、肺がん難治化の大きな要因となっている遠隔転移、特に脳転移に対する有効な新規治療法を開発することである。

具体的には、ヒト肺がんの実験的脳転移モデルを用いて、①肺がん脳転移形成に関与する因子を検索・同定し、それらの因子を標的とした制御法を構築すること、②肺がんの脳転移形成過程におけるがん細胞と宿主側因子の間の相互的な応答性を解明し、肺がん脳転移の詳細な分子機構を明らかにすることを目標とする。

### 3. 研究の方法

ヒト肺がん細胞株による実験的脳転移モデルを用い、肺がんの脳転移形成を規定する因子の探索を遂行する。またがん細胞と宿主側因子の間の相互的な応答性を解明し、難治がんとしてされている肺がんの脳転移因子を分子標的とした新規治療法を確立する。

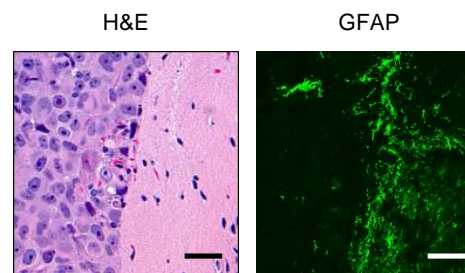
具体的には、肺がん脳転移形成における血管新生の関与を検討するとともに、肺がん脳転移に対する新規血管新生阻害剤の治療効果の検討を行い、肺がん脳転移に対する最適な治療法の確立を目指す。また、肺がん脳転移形成におよぼすがん幹細胞やastrocyteなど

の宿主側因子の影響を検討することにより、がん細胞および宿主側因子の相互作用を系統的に解明する。

### 4. 研究成果

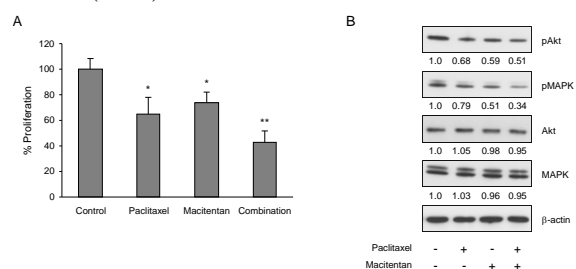
まず我々は、肺がん脳転移形成における血管新生の関与を検討した。肺がん細胞による実験的脳転移モデルを用いて脳転移巣における種々の血管新生因子の発現を免疫染色にて評価したところ、VEGFをはじめとした血管新生因子が高発現しており、肺がん脳転移形成における血管新生の重要性が確認された。

次に宿主側因子とがん細胞との相互的応答性を解明するためastrocyteに着目して検討を行った。astrocyteは炎症性サイトカインの産生や抗がん剤耐性の誘導など種々の機能によりがん細胞の脳転移形成および脳転移巣での増殖を促進することが報告されているが、我々の検討でも肺がん細胞による実験的脳転移巣の周囲にはGFAP陽性の活性化astrocyteの集簇が認められ、がん細胞の脳転移形成におけるastrocyteの関与が改めて証明された(下図)。



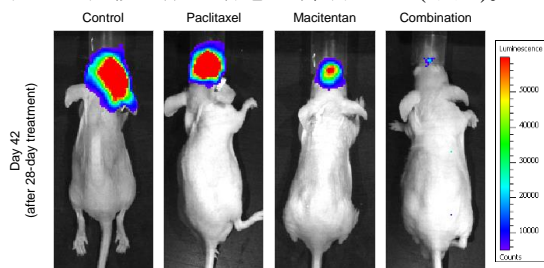
Endothelin-1 (ET-1)は1988年に発見された血管内皮細胞由来のペプチドであり、強力な血管収縮作用を有する。また、ET-1はその受容体(Endothelin receptor: ETR)への結合を介して、肺がんを含めた種々のがん細胞の増殖、生存、浸潤・転移および血管新生を促進することが知られている。我々は肺がん脳転移に対する有効な治療法の開発に関する基礎的検討を推進する目的から、ヒト肺がん細胞の脳転移モデルを用いて新規血管新生阻害剤(ETR拮抗剤)の脳転移抑制効果を検討した。

ETR拮抗剤はET-1およびETRを発現するヒト肺がん細胞の*in vitro*での増殖を抑制し、その作用はPaclitaxelとの併用により増強された(下図)。



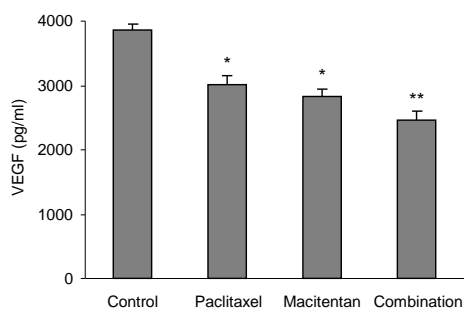
また、ETR拮抗剤はヌードマウスの内頸動脈より接種されたヒト肺がん細胞による実

験的脳転移形成を有意に抑制した(下図)。



ETR拮抗剤はヒト肺がん細胞による実験的脳転移を有する担がんマウスの生存期間を有意に延長した。*in vitro* および *in vivo* における ETR 拮抗剤の治療効果はいずれも Paclitaxel との併用により増強された。ETR 拮抗剤は ETR の下流シグナル伝達因子である Akt および MAPK のリン酸化を抑制することにより ET-1/ETR axis の活性化を阻害し、*in vitro* および *in vivo* における腫瘍増殖抑制および腫瘍細胞のアポトーシスを誘導した。

さらに ETR 拮抗剤はヒト肺がん細胞からの VEGF 産生を抑制することにより、脳転移病巣における血管新生を抑制した(下図)。



以上の結果から、ETR 拮抗剤は ET-1/ETR axis を発現するヒト肺がん細胞に対して直接的抗腫瘍効果および血管新生抑制作用を有すること、ETR 拮抗剤が実験的脳転移抑制効果を示すことが示され、ET-1/ETR axis が肺がん脳転移治療における新たな分子標的となり得る可能性が示唆された。

我々は最後に、探索的なナノパーティクル治療を目的に臓器特異的なバイオマーカーの同定を行った。ヒト肺がん細胞による実験的脳転移巣における血管透過性な詳細な解析により、MMP-9 をはじめとした複数のバイオマーカー候補分子群を特定した。

以上のように、本研究では肺がんの脳転移形成を規定する諸因子を、がん細胞および宿主側因子の両面から明らかにした。これらの因子を標的とした新規治療法の創薬・開発を推進することにより、肺がん難治化の最大の要因といえる脳転移の制御および克服に繋がることを期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

① Ogino H, Hanibuchi M, 他 9 名 2 番目, A case of primary pulmonary synovial

sarcoma showing prolonged survival with multimodality therapy, Intern Med, 査読有, in press, 2015

<http://www.naika.or.jp/imonline/>

- ② Sato S, Hanibuchi M, 他 7 名 2 番目, Idiopathic pleuroparenchymal fibroelastosis is characterized by an elevated serum level of Surfactant Protein-D, but not Krebs von den Lungen-6, Lung, 査読有, Vol. 192, No. 5, 2014, 711-717  
DOI: 10.1007/s00408-014-9599-0
- ③ Hanibuchi M, Kim SJ, 他 2 名 1 番目, The molecular biology of lung cancer brain metastasis: an overview of current comprehensions and future perspectives, J Med Invest, 査読有, Vol. 61, No. 3-4, 2014, 241-253  
<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/jmi>
- ④ Yokoi K, Hanibuchi M, 他 6 名 5 番目, Serum biomarkers for personalization of nanotherapeutics-based therapy in different tumor and organ microenvironments, Cancer Lett, 査読有, Vol. 345, No. 1, 2014, 48-55  
DOI: 10.1016/j.canlet.2013.11.015
- ⑤ Huang J, Hanibuchi M, 他 5 名 6 番目, Identification of pregnancy-associated plasma protein A as a migration-promoting gene in malignant pleural mesothelioma cells: a potential therapeutic target, Oncotarget, 査読有, Vol. 4, No. 8, 2013, 1172-1184  
<http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=index>
- ⑥ Abe S, Hanibuchi M, 他 19 名 4 番目, A novel targeting therapy of malignant mesothelioma using anti-podoplanin antibody, J Immunol, 査読有, Vol. 190, No. 12, 2013, 6239-6249  
DOI: 10.4049/jimmunol.1300448
- ⑦ Mitsuhashi A, Hanibuchi M, 他 13 名 7 番目, Surfactant protein A suppresses lung cancer progression by regulating the polarization of tumor-associated macrophages, Am J Pathol, 査読有, Vol. 182, No. 5, 2013, 1843-1853  
DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.01.030
- ⑧ Sato S, Hanibuchi M, 他 10 名 2 番目, Macrophage stimulating protein promotes liver metastases of small cell lung cancer cells by affecting the organ microenvironment, Clin Exp Metastasis, 査読有, Vol. 30, No. 3, 2013, 333-344

DOI: 10.1007/s10585-012-9540-y

- ⑨ Kuramoto T, Hanibuchi M, 他 12 名 11 番目, Dll4-Fc, an inhibitor of Dll4-Notch signaling, suppresses liver metastasis of small cell lung cancer cells through down-regulation of NF-kappa-B activity, *Mol Cancer Ther*, 査読有, Vol. 11, No. 12, 2012, 2578-2587  
DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0640
- ⑩ Van TT, Hanibuchi M, 他 8 名 2 番目, SU6668, a multiple tyrosine kinase inhibitor, inhibits the progression of human malignant pleural mesothelioma in an orthotopic model, *Respirology*, 査読有, Vol. 17, No. 6, 2012, 984-990  
DOI: 10.1111/j.1440-1843.2012.02193.x
- ⑪ Dat LT, Hanibuchi M, 他 8 名 6 番目, Identification of genes potentially involved in bone metastasis by genome-wide gene expression profile analysis of non-small cell lung cancer in mice, *Int J Oncol*, 査読有, Vol. 40, No. 5, 2012, 1455-1469  
DOI: 10.3892/ijo.2012.1348
- ⑫ Gabr AGM, Hanibuchi M, 他 11 名 3 番目, Erlotinib prevents experimental metastases of human small cell lung cancer cells with no epidermal growth factor receptor expression, *Clin Exp Metastasis*, 査読有, Vol. 29, No. 3, 2012, 207-216  
DOI: 10.1007/s10585-011-9443-3

[学会発表] (計 16 件)

- ① Ogino H, Goto H, Hanibuchi M, et al. Characterization of sphere-forming stem like population of lung cancer cell line in multi-organ metastasis model. *ATS 2015 International Conference*, 2015/5/19, Denver, USA
- ② 後東 久嗣, 埴淵 昌毅, 他. ベバシズマブに対する獲得耐性メカニズムとしての線維細胞 (fibrocytes) の役割. 第 18 回 日本がん分子標的治療学会学術集会, 2014/6/27, 仙台市情報・産業プラザ (宮城県・仙台市)
- ③ Goto H, Hanibuchi M, et al. The role of fibrocytes in the resistance to anti-angiogenic therapy in malignant pleural mesothelioma and lung cancer. *ATS 2014 International Conference*, 2014/5/21, San Diego, USA
- ④ 埴淵 昌毅, 阿部 真治, 他. 悪性胸膜中皮腫同所移植モデルにおける抗ポドプラニン抗体の抗腫瘍効果. 第 54 回日本

呼吸器学会学術講演会, 2014/4/25, 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

- ⑤ Hanibuchi M, Otsuka K, et al. Therapeutic efficacy of endothelin receptor blockade on experimental brain metastases of human non-small cell lung cancer. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology, 2013/11/13, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑥ Goto H, Hanibuchi M, et al. Phase II study of S-1 with patient-reported outcome evaluation in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology, 2013/11/13, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑦ 埴淵 昌毅, 柿内聡司, 他. 呼吸器疾患の Controversy -Pros & Cons- 高齢者肺癌にベバシズマブは必要か? -Pro の立場から-. 第 49 回日本呼吸器学会中国・四国地方会第 20 回呼吸器セミナー, 2013/7/20, アルファあなぶきホール (香川県・高松市).
- ⑧ 埴淵 昌毅, 大塚 憲司, 他. Endothelin 受容体拮抗剤による肺癌脳転移抑制効果の検討. 第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2013/6/13, 国立京都国際会館 (京都府・京都市)
- ⑨ Huang J, Hanibuchi M, et al. Therapeutic efficacy of RNA interference targeting focal adhesion kinase against orthotopic xenograft of human malignant pleural mesothelioma in SCID mice. *AACR Annual Meeting 2013*, 2013/4/7, Washington DC, USA
- ⑩ Mitsuhashi A, Hanibuchi M, et al. Acquired resistance to anti-VEGF therapy via angiogenic switch in orthotopically implanted human malignant pleural mesothelioma in SCID mice. *The 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research*, 2013/2/24, Maui, USA
- ⑪ Yukishige S, Hanibuchi M, et al. Surfactant protein A suppresses lung cancer progression by regulating tumor-associated macrophage polarization. *The 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research*, 2013/2/24, Maui, USA.

- ⑫ 埴淵 昌毅, 阿部 真治, 他. 抗ポドプレニン抗体 NZ-1 の悪性胸膜中皮腫に対する抗体依存性細胞障害活性と抗腫瘍効果. 第 53 回日本肺癌学会総会, 2012/11/9, 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)
- ⑬ Hanibuchi M, Otsuka K, et al. Eradication of experimental brain metastases of human non-small cell lung cancer by macitentan, a dual antagonist of the endothelin A and B receptor, combined with paclitaxel. A Joint Meeting by ASCO, EORTC, and NCI on Markers in Cancer, 2012/10/12, Hollywood, USA
- ⑭ Goto H, Hanibuchi M, et al. Surfactant protein A suppresses progression of human lung adenocarcinoma in an experimental lung metastasis model. 14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society, 2012/9/4, Brisbane, Australia
- ⑮ 大塚 憲司, 埴淵 昌毅, 他. Endothelin 受容体拮抗剤による肺癌脳転移抑制効果の検討. 第 21 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2012/7/12, オリエンタルホテル広島 (広島県・広島市)
- ⑯ Nishioka Y, Hanibuchi M, et al. Antitumor effects of anti-podoplanin antibody NZ-1 against malignant mesothelioma via ADCC. ATS 2012 International Conference, 2012/5/23, San Francisco, USA

〔図書〕(計 4 件)

- ① 埴淵 昌毅 他, 克誠堂出版, 日本胸部臨床 特集: 非小細胞肺癌に対する新規薬剤の開発・導入の現場から, 2015, 728 (717)
- ② 埴淵 昌毅 他, 日本臨牀社, 日本臨牀増刊号 抗がん剤の副作用と支持療法—より適切な抗がん剤の安全使用をめざして—, 2015, 731 (93-97)
- ③ 矢野 聖二, 埴淵 昌毅 他, メディカルレビュー社, 癌と骨 Cancer and Bone, 2013, 347 (95-104)
- ④ 埴淵 昌毅 他, 最新医学社, 最新医学特集 がんの分子病態診断—免疫染色と遺伝子診断の進歩—, 2012, 500 (479-484)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.sannai.umin.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

埴淵 昌毅 (HANIBUCHI, Masaki)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・准教授  
研究者番号: 80335794

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし