

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592519

研究課題名(和文) RCAS1をターゲットとした新たながん治療戦略の構築

研究課題名(英文) Nobel therapeutic strategy against human cancer by targeting RCAS1

研究代表者

園田 顕三 (Sonoda, Kenzo)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30294929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：計15種類の悪性腫瘍での臨床的予後因子であるRCAS1は正常組織から悪性腫瘍への悪性転化シークエンスにおいてその発現頻度が増加し、複数の悪性腫瘍における臨床病理因子と有意な相関を示す。臨床的に腫瘍マーカーとして有用でありアポトーシスを誘導するRCAS1はバイオマーカーであるが、生体免疫機構からの逃避と腫瘍間質リモデリングを介して腫瘍進展に寄与していると考えられる。RCAS1は悪性腫瘍の特性を表現する重要な分子でectodomain shedding機構により分泌型に変換されるが、悪性腫瘍に対する標的治療における新たなターゲットとなり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：RCAS1 can induce apoptosis in immune cells including peripheral lymphocytes and natural killer cells after converted to a secreted type by ectodomain shedding. Because RCAS1 not only helps tumor cells to evade immune surveillance but also induces cancer stromal tissue remodeling, RCAS1 is believed to exaggerate aggressive characteristics of human malignancies. RCAS1 expression correlates with several clinicopathological variables including tumor size, stage, invasion depth, and lymph node metastasis and is a negative predictor of overall survival in 15 different kinds of cancer. Novel therapeutic strategies against cancer are now under development by targeting an intriguing biomarker RCAS1.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：RCAS1 分子 リンパ球アポトーシス 腫瘍間質組織 血管新生 ectodomain shedding 悪性腫瘍 治療標的

1. 研究開始当初の背景

RCAS1 は本研究代表者により子宮頸部腺癌細胞株(SiSo 細胞)から単離された分子で、末梢血 T リンパ球を含む RCAS1 受容体発現細胞にアポトーシスを誘導する。また、アミノ酸 N 末端が細胞内に、C 末端が細胞外に位置した型の膜タンパクであり、分泌される際には C 末端に存在する coiled-coil 構造で oligomer を形成する。RCAS1 に関してこれまでに 150 を超える論文報告があり、脳腫瘍、口腔癌、肺癌、胸膜悪性中皮腫、食道癌、胃癌、膵癌、胆嚢癌、胆管癌、大腸癌、消化管間葉系腫瘍、前立腺癌、腎癌、子宮頸癌、子宮体癌を含む計 15 種類の悪性腫瘍での臨床的予後因子であることが報告されている。RCAS1 は正常組織から悪性腫瘍への悪性転化においてその発現頻度が増加し、上述した悪性腫瘍の腫瘍径、臨床進行期、浸潤、脈管侵襲、リンパ節転移と有意な相関を示すことが認められた (Sonoda K *et al. Front Biosci* 13; 1106-1116, 2008.)。RCAS1 は受容体発現細胞にアポトーシスを誘導するが (Nakashima M, Sonoda K *et al. Nat Med* 5: 928-942, 1999.) 臨床検体を使用した TUNEL 法による検討では子宮頸癌に発現する RCAS1 に相関して腫瘍周囲リンパ球にアポトーシスが誘導されていた (Sonoda K *et al. Gynecol Oncol* 97: 772-779, 2005.)。同様の知見は脳グリオーマ、口腔癌、肺癌、乳癌、食道癌、胃癌、胆管癌、大腸癌でも得られており、RCAS1 を介して腫瘍細胞が生体内の免疫監視機構から逃避することによって腫瘍の進展に寄与することが想定される。RCAS1 は分泌型となり子宮頸癌では腔分泌液内に検出されるが (Sonoda K *et al. Cancer* 77: 1501-1509, 1996.) 子宮癌および卵巣癌患者血清中には健常者に比し高濃度の RCAS1 が分泌され、RCAS1 値の推移は治療後臨床経過と相関することが示された (Sonoda K *et al. Gynecol Oncol* 103: 924-931, 2006.; Sonoda K *et al. Oncol Rep* 17: 623-628, 2007.)。さらに、子宮癌患者での末梢血リンパ球数が血清 RCAS1 濃度に逆相関して減少していた。これらの結果から、RCAS1 は婦人科癌患者血清中に存在し、臨床的には腫瘍マーカーとして有用であり、アポトーシスを誘導する生物活性を有することからバイオマーカーであることが証明された。RCAS1 が腫瘍マーカーとして有用であるという知見は、これまでに、肺癌、胸膜悪性中皮腫、食道癌、胃癌、膵癌、胆嚢癌、胆管癌、大腸癌、パジェット病でも得られている。RCAS1 はアポトーシス誘導以外にも、血管新生によって *in vivo* 腫瘍増殖を促進することが認められた (Sonoda K *et al. Cancer* 110: 1979-1990, 2007.)。実際に子宮頸癌サンプルを使用した解析でも、RCAS1 発現と血管新生因子である vascular endothelial growth factor 発現および微小血管数が有意な相関を示すことが確認された。これらの結果から、RCAS1 が腫瘍増殖促

進や腫瘍・間質相互作用において間質の質的变化を誘導すると考えられるが、子宮頸癌での RCAS1 発現と matrix metalloproteinase-1 および laminin-5 発現が相関する一方で、腫瘍間質での vimentin 陽性細胞数の減少が確認された (Sonoda K *et al. Gynecol Oncol* 99: 189-198, 2005.) が、卵巣癌でも RCAS1 はビメンチン陽性細胞数を減少させることによって腫瘍間質のリモデリングを誘導することが示唆された (Sonoda K *et al. Int J Gynecol Cancer* 19: 838-843, 2009.)。さらに、本研究代表者により、RCAS1 が ectodomain shedding 機構を介して膜型から分泌型に変換されアポトーシス誘導活性を獲得することが示された (Sonoda K *et al. Exp Cell Res* 316: 1795-1803, 2010.)。生体の発生、分化、組織の生理学的機能維持に関わる増殖因子の多くが ectodomain shedding 機構により細胞膜から切断され分泌型として機能することから、RCAS1 がこれらの分子同様に生体にとって重要な分子であることが想定される。

2. 研究の目的

上述した研究背景を踏まえ、本研究では、
(1) RCAS1 の発現・分泌機構の解析
(2) RCAS1 受容体の単離と細胞内シグナル伝達機構の解析
(3) RCAS1 をターゲットとした新たながん分子標的治療の開発
を行うことを目的とした。

RCAS1 研究は本研究代表者の研究から端を発した、我国のオリジナルな研究である。これまでの基礎医学的研究成果は、その究極の目的である RCAS1 を標的とする新たな癌治療の開発を目的として積重ねられてきた。現在の医学研究のトレンドは、「ベンチからベッドへ」という標語に表現されるように基礎医学研究の成果がトランスレーショナル臨床応用研究へと発展することが重要視されている。進行・再発癌では満足出来る程度の成績向上は認められておらず、今後とも新たな治療法開発へ情熱を捧げることを継続しなければならぬ。RCAS1 研究が対癌戦略における基礎研究と臨床研究の架け橋となり、癌患者予後を改善し得る新たな治療法の樹立に帰結することが本研究の究極の目的である。

3. 研究の方法

(1) RCAS1 の発現・分泌機構の解析：
複数の細胞株の2次元・3次元培養を行い、RCAS1 タンパク発現の差異を Western blot と flow cytometry にて比較し、有意な発現差を認める細胞株を用いて microarray 法および comparative genomic hybridization (CGH) array 法による遺伝子発現の解析を行った。
RCAS1 を発現・分泌する子宮頸癌由来 SiSo 細胞と RCAS1 を発現するが分泌しない乳癌由来 MCF-7 細胞を用いて、RCAS1 の分泌およびア

ポトース誘導機構に関して解析を行った。
本研究で新たながん治療戦略を構築する対象には子宮頸部腺癌も含まれるため、子宮頸部腺癌の細胞学的特徴に関して解析を行うこととし、特に悪性度が高い明細胞腺癌に関する解析を行った。

(2) RCAS1受容体の単離と細胞内シグナル伝達機構の解析：

RCAS1が赤白血病由来K562細胞にアポトースを誘導することから、short hairpin RNAライブラリーを用いた受容体単離を試みた。

(3) RCAS1 をターゲットとした新たながん分子標的治療の開発：

RCAS1 の発現変化による腫瘍進展の影響について、高転移能を有する SQUU-B 細胞を含む計4種類の口腔癌細胞株を用いて解析した。

抗 RCAS1 抗体で RCAS1 を免疫沈降により除去する試み、RCAS1 特異的 siRNA 導入による RCAS1 発現抑制の試み、RCAS1 の shedding に関与する protease 機能抑制の試みに関する有用性を検討した。

4. 研究成果

(1) RCAS1の発現・分泌機構の解析：

RCAS1の発現調節に関する解析：
複数の細胞株の2次元・3次元培養を行い、RCAS1タンパク発現の差異をWestern blotとflow cytometryにて比較した。有意な発現差を認める細胞株を用いてmicroarray法およびcomparative genomic hybridization (CGH) array法による遺伝子発現の解析を行ったところ、RCAS1発現と相関する分子としてS100タンパクファミリーに属する分子を含めた複数抽出された。これらの分子の発現パターンを細胞株および組織標本を使用して解析した。

RCAS1の分泌機構に関する解析：

RCAS1 の ectodomain shedding 機構において RCAS1 を分泌させる protease を同定し、子宮頸癌および体癌症例から採取した臨床検体における RCAS1 発現・分泌動態と protease 発現の相関解析を行った。その結果、RCAS1 の shedding 機構においては ADAM9 が切断酵素として重要な役割を担っていることが確認されたため、子宮頸癌 47 例および体癌 48 例の末梢血 RCAS1 濃度および腫瘍組織での RCAS1 と protease 発現に関して ELISA および免疫組織染色を用いて相関解析を行った。その結果、子宮頸癌および体癌症例での末梢血 RCAS1 濃度と腫瘍組織での RCAS1 および ADAM9 発現に有意な相関を認め、ADAM9 は RCAS1 の ectodomain shedding において主要な protease であり、悪性腫瘍における RCAS1 分子標的治療開発のターゲットとなり得ることが示唆された。以上の研究成果は Biomed Research International 誌に発表した (Sonoda K and Kato K. *Biomed Res Int*

2014; 482396, 2014.)。

子宮頸部明細胞腺癌の特徴的細胞診所見に関する解析：

前述したように RCAS1 は子宮頸部腺癌細胞株から単離された分泌型分子であるが、本研究において新たながん治療戦略を構築する対象には子宮頸部腺癌も含まれる。そこで、子宮頸部腺癌の細胞学的特徴に関して解析を行うこととし、中でも悪性度の高い明細胞腺癌を対象とした研究を行った。当科で 2003 ~ 2012 年の 10 年間に治療した子宮頸部明細胞腺癌 4 症例の細胞診所見について解析を行ったが、全例に類円形から楕円形の大小不同の核に著明な核小体とクロマチン増量を認め、細胞質は豊富で淡明レース状であった。一部にライトグリーン好染性で細胞質の辺縁が明瞭な腫瘍細胞がシート状に配列し、扁平上皮癌との鑑別を要した。3 症例に collagenous stroma を有する細胞集塊と鉤型・釘型細胞形態を認め、他 1 症例のみにミラーボール状細胞集塊を認めた。この研究成果は Journal of Cytology & Histology 誌に発表した (Sonoda K *et al. J Cytol Histol* 4: 1000196, 2013.)。

(2) RCAS1受容体の単離と細胞内シグナル伝達機構の解析：

RCAS1が赤白血病由来K562細胞にアポトースを誘導することから、short hairpin RNAライブラリーを用いた受容体単離を行ったところ、複数の候補遺伝子が同定された。これらの候補分子の発現を人為的に変化させた細胞株クローンを樹立し、RCAS1によって誘導されるアポトースの質的变化について解析を行った。

(3) RCAS1 をターゲットとした新たながん分子標的治療の開発：

RCAS1の発現変化による腫瘍進展への影響について、口腔癌細胞株を使用して解析した。使用した計4種類の口腔癌細胞株は全てRCAS1を発現していたが、高転移能を有するSQUU-B細胞は他細胞株に比しより強いアポトース誘導能を有していた。一方で、SQUU-B細胞のRCAS1発現をRNA干渉によりknock downすることによって、誘導されるアポトースは有意に低下した。この結果から、RCAS1発現を人為的に減弱させることによって腫瘍の進展が抑制されることが理解され、トランスレーショナルに悪性腫瘍に対する治療戦略として臨床応用が期待できることが示唆された。本研究成果はJournal of Translational Medicine誌に掲載された (Tanaka H, Sonoda K, *et al. J Transl Med* 12: 112, 2014.)。

RCAS1 抗体を用いた RCAS1 機能抑制：子宮頸癌、子宮体癌および卵巣患者血清を用いた *in vitro* 実験系では血清中に存在する RCAS1 により RCAS1 受容体発現 K562 細胞の細胞増

殖抑制効果が WST-1 法を用いた解析によって認められた。抗 RCAS1 モノクローナル抗体を使用し RCAS1 を免疫沈降除去することにより K562 細胞の細胞増殖抑制効果が減弱したことから、抗体が分子標的治療として有用であることが示唆された。

RCAS1 の発現を抑制する特異的 RNA 干渉：腎線維芽細胞 COS-7 に RCAS1 遺伝子を導入することで、ヌードマウス上での腫瘍径の増大、血管新生因子である VEGF の発現増加を誘導することを明らかにした。一方で、RCAS1 発現を特異的に抑制する siRNA を SiSo および子宮体癌由来 HOUA 細胞株に導入したところ増殖抑制効果を認めた。以上より RCAS1 特異的 RNA 干渉が分子標的治療として有用であることが示唆された。

RCAS1 の shedding に関与する protease および細胞内シグナル伝達機構の阻害：RCAS1 が分泌型に変換されることによってアポトーシス誘導活性を獲得する結果から、shedding に関与する protease の機能阻害が有効であることが示唆された。

なお、臨床検体の使用に際しては当施設倫理委員会承認の下（承認番号：440-02）文書によるインフォームドコンセントを得て施行した。

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 10 件）

Kenzo Sonoda.

RCAS1 is a promising therapeutic target against cancer: its multifunctional bioactivities and clinical significance.

Expert Review of Obstetrics and Gynecology. 2012; 7 (3): 261-267.

（査読有）

園田 顕三.

RCAS1 分子を標的とした婦人科がん治療法の開発。

産婦人科の実際「特集：婦人科悪性腫瘍の治療開発とそのシーズ」。2012; 61(2): 229-234.

（査読無）

Kenzo Sonoda, Miwako Nogami, Masaki Naka, Fumihiko Ookubo, Hiroaki Kobayashi, Hideaki Yahata, Kaoru Okugawa, Eisuke Kaneki, Yoshinao Oda, Kiyoko Kato.

Characteristic cytological features of cervical clear cell adenocarcinoma: a report of 4 cases.

Journal of Cytology & Histology 4 (5): 1000196, 2013.

（査読有）

園田 顕三、小林裕明、矢幡秀昭、野上美和子、仲 正喜、大久保文彦、山元英崇、小田義直、加来恒壽、加藤聖子。

特徴的な細胞診所見を呈した子宮頸部明細胞腺癌の一例。

日本臨床細胞学会九州連合会雑誌 45: 59-64, 2014.

（査読有）

Hideaki Tanaka, Takeshi Toyoshima, Kenzo Sonoda, Ryoji Kitamura, Masaaki Sasaguri, Shintaro Kawano, Ryota Matsubara, Yuichi Goto, Seiji Nakamura.

Apoptotic function of tumor-associated antigen RCAS1 in oral squamous cell carcinoma.

Journal of Translational Medicine 12(1): 112, 2014.

（査読有）

Kenzo Sonoda, Kiyoko Kato.

A disintegrin and metalloproteinase 9 is involved in ectodomain shedding of receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells.

Biomed Research International 2014: 482396, 2014.

doi:10.1155/2014/482396

（査読有）

Hiroimi Imai, Hiroshi Yagi, Kaoru Okugawa, Hironori Kenjo, Tatsuhiro Ohgami, Yoshiaki Kawano, Eisuke Kaneki, Akimasa Ichinoe, Kazuo Asanoma, Hideaki Yahata, Kenzo Sonoda, Hiroaki Kobayashi, Tsunehisa Kaku, Kiyoko Kato.

Uterine myxoid leiomyosarcoma with tumor embolism extending into the right atrium. Case Reports in Obstetrics and Gynecology

316262, 2015.

（査読有）

Tomoyasu Kato, Atsuo Takashima, Takahiro Kasamatsu, Kenichi Nakamura Junki Mizusawa, Toru Nakanishi, Nobuhiro Takeshima, Shoji Kamiura, Takashi Onda, Toshiyuki Sumi, Masashi Takano, Hidekatsu Nakai, Toshiaki Saito, Kiyoshi Fujiwara, Masatoshi Yokoyama, Hiroaki Itamochi, Kazuhiro Takehara, Harushige Yokota, Tomoya Mizunoe, Satoru Takeda, Kenzo Sonoda, Tanri Shiozawa, Takayo Kawabata, Shigeru Honma, Haruhiko Fukuda, Nobuo Yaegashi, Hiroyuki Yoshikawa, Ikuo Konishi, Toshiharu Kamura.

Clinical tumor diameter and prognosis of patients with FIGO stage IB1 cervical cancer (JCOG0806-A).
Gynecologic Oncology 137: 34-39, 2015.
(査読有)

Kenzo Sonoda, Hideaki Yahata, Akimasa Ichinoe, Kaoru Okugawa, Eisuke Kaneki, Yoshiaki Kawano, Hironori Kenjo, Tatsuhiro Ohgami, Hiroshi Yagi, Saiji Ohga, Kaori Asai, Katsumasa Nakamura, Hiroshi Honda, Kiyoko Kato.
Retrospective analysis of concurrent chemoradiation with triweekly cisplatin plus 5-fluorouracil versus weekly cisplatin in cervical cancer.
Anticancer Research (in press)
(査読有)

Kenzo Sonoda.
Molecular biology of gynecologic cancer-An overview.
Oncology Letters (in press)
(査読有)

[学会発表](計9件)

Kenzo Sonoda.
Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1) induces apoptosis via ectodomain shedding mediated by a disintegrin and metalloproteinase 9.
American Association for Cancer Research: Special Conference of Tumor Invasion and Metastasis
2013年1月21日
米国 San Diego 市

田中秀明、豊嶋健史、園田顕三、北村亮二、川野真太郎、平野充広、神野哲平、中村誠司。
口腔扁平上皮癌由来細胞株における腫瘍関連抗原 RCAS1(receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells)の発現と機能についての検討。
第31回日本口腔腫瘍学会
2013年1月24日
東京都

園田顕三、宮本新吾、小林裕明、和氣徳夫、加藤聖子。
アポトーシス誘導分子 RCAS1 の ectodomain shedding に関与する protease 解析。
第65回日本産科婦人科学会
2013年5月12日
札幌市

田中秀明、豊嶋健史、園田顕三、北村亮二、川野真太郎、平野充広、神野哲平、

丸瀬靖之、笹栗正明、大部一成、中村誠司。
口腔扁平上皮癌由来細胞株における腫瘍関連抗原 RCAS1 の発現と機能についての検討。
第37回日本頭頸部癌学会
2013年6月13日
東京都

園田 顕三、小林 裕明、矢幡 秀昭、野上 美和子、大久保 文彦、仲 正喜、山元 英崇、浅野間 和夫、奥川 馨、兼城 英輔、河野 善明、大神 達寛、八木 裕史、権丈 洋徳、小田 義直、加来 恒壽、加藤 聖子。
特徴的な細胞診所見を呈した子宮頸部明細胞腺癌の一例。
第29回日本臨床細胞学会九州連合会学会
2013年7月27日
福岡市

田中 秀明、豊嶋 健史、園田 顕三、北村 亮二、川野 真太郎、平野 充広、神野 哲平、丸瀬 靖之、笹栗 正明、大部 一成、中村 誠司。
口腔扁平上皮癌由来細胞株における腫瘍関連抗原 RCAS1 の発現と機能についての検討。
第58回日本口腔外科学会
2013年10月11日
福岡市

園田 顕三、小林 裕明、矢幡 秀昭、奥川 馨、兼城 英輔、河野 善明、大神 達寛、八木 裕史、権丈 洋徳、浅野間 和夫、加藤 聖子。
子宮頸癌でのシスプラチン単剤同時化学放射線療法の治療効果と有害事象に関する解析。
第51回日本癌治療学会
2013年10月26日
京都市

園田 顕三、小林 裕明、矢幡 秀昭、奥川 馨、兼城 英輔、河野 善明、大神 達寛、八木 裕史、権丈 洋徳、浅野間 和夫、加来 恒壽、加藤 聖子。
子宮頸癌に対する同時化学放射線療法(シスプラチン+5-FU 併用とシスプラチン単剤)の治療効果と有害事象に関する後方視的解析。
第66回日本産科婦人科学会総会
2014年4月20日
東京都

園田 顕三、小林 裕明、野上 美和子、仲 正喜、大久保 文彦、矢幡 秀昭、奥川 馨、兼城 英輔、小田 義直、加藤 聖子。

当科で経験した子宮頸部明細胞腺癌4例
の細胞診所見に関する解析.
第55回日本臨床細胞学会 春期大会
2014年6月6日
横浜市

〔図書〕(計2件)

Kenzo Sonoda, Hiroaki Kobayashi,
Norio Wake.
Chapter 65. Cervical carcinoma
surveillance counterpoint: Japan. In:
Patient surveillance after cancer
treatment. Johnson FE, Maehara Y,
Browman GP, Margenthaler JA, Audisio
RA, Thompson JF, Johnson DY, Earle CC,
Virgo KS (eds.). New York, Humana
Press, Springer Science Business
Media, pp 335-340, 2013.

園田 顕三.

総論 4 . 疾患 : 子宮頸がん、子宮
体がん、卵巣がん
婦人科がん患者の臨床と看護 : 36-62、医学
出版

〔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.med.kyushu-u.ac.jp/gynob/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

園田 顕三 (SONODA KENZO)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号 : 30294929

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし