

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460481

研究課題名(和文)独自の自然転移モデルを活用した小細胞肺癌の治療標的の探索

研究課題名(英文) Search for therapeutic targets for small cell lung cancer using a new orthotopic transplantation model.

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌患者の2割を占める小細胞肺癌は、遠隔転移形成が非常に多く予後不良である。本研究では、研究代表者らが独自に開発した自然転移モデルを活用して、低分子化合物や抗体の評価を行うとともに、転移関連因子の探索を進め、以下の結果を得た。(1)シスプラチンあるいはHGF受容体阻害剤による治療実験を行い、本モデルが低分子化合物や抗体などの評価に有用であることを明らかにした。(2)患者での発現と予後が相関する膜タンパク質の解析を行い、抗腫瘍活性抗体の標的になりうることを見出した。(3)自然転移モデルの同所移植巣と転移巣での癌細胞の遺伝子発現プロファイルを比較するプロトコルを確立した。

研究成果の概要(英文)：Small cell lung cancer (SCLC) accounts for nearly 20% of lung cancer cases and one of the most aggressive cancers with highly metastatic ability. In this study, we assessed anti-tumor activities of compounds and an antibody and searched the metastatic genes using our originally developed orthotopic metastasis model of SCLC. Our results are listed below.(1) Our model has the same aspects of SCLC patients and is useful for assessment of anti-tumor activities of drug seeds.(2) We identified a membranous protein as a good candidate for anti-tumor antibody-drug target. (3) We established a protocol for identification of genes differentially expressed between orthotopic tumors and metastatic tumors.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：小細胞肺癌 癌転移 自然転移モデル 治療標的

1. 研究開始当初の背景

肺癌は世界の全がん死の最大の原因である。肺癌はその組織型から、頻度の高い順に腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌そして小細胞癌に分類される。このうち肺癌全体の20%程度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・副腎・脳・肝臓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。小細胞肺癌は進行が速く転移頻度が高いために外科的治療が行われることはまれで、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、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。このため著効を示す分子標的薬の開発が望まれるが、そこで重要になる小細胞肺癌の転移及び癌進展の分子機構には、現在も不明な点が多い。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、という多く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数存在し、細胞の運動・接着能等に関わる接着因子やサイトカイン、転移関連遺伝子群の発現制御を行う転写因子や miRNA、さらにゲノム全体のエピジェネシスを制御する長鎖非コード RNA 等の関与が乳癌等で既に明らかにされている。しかし、転移及び癌進展の分子機構は癌種によって異なり、小細胞肺癌についての知見は、現在のところ著しく少ない状況と言える。外科的治療がまれなために臨床検体が得られにくい事が、研究の進展を妨げている要因の一つとなっている。研究代表者らは、ヒト小細胞肺癌由来の細胞株から、肺同所移植により移植巣を形成するとともに、臨床と同じ転移先臓器(骨、副腎、脳等)に自然転移する亜株群を樹立した。さらに、これらの亜株を利用した独自の小細胞肺癌の自然転移モデルを確立するための条件検討を行った。本モデルには以下の特徴がある。(1) 肺に同所移植巣を形成させるため、尾静脈注入や皮下移植等と比べてより臨床病態に近い系である。(2) 転移先臓器も、骨、副腎、脳、リンパ節等で臨床像と一致する。(3) 小細胞肺癌の自然転移モデルは限り論文は一報のみ(Isobe *et al.* *J. Thorac. Onc.* 2013)で、さらに脳転移するものは報告が無く、稀少性が高い。以上のような特徴から、本モデルが臨床検体の入手困難さという小細胞肺癌研究における障壁を克服しうる有効なツールと考え、小細胞肺癌の治療標的探索を目的とする本課題を着想するに至った。

2. 研究の目的

小細胞肺癌の転移や癌進展の分子機構については不明な点が多く、有効な治療標的が確立されていない。本課題では、ヒト小

細胞肺癌由来細胞株から研究代表者らが樹立した転移性亜株群及び独自の小細胞肺癌の自然転移モデルを活用して、「低分子化合物や抗体の抗腫瘍活性及び転移抑制活性の評価」と「小細胞肺癌の癌進展に関与する因子の探索及び評価」を行い、小細胞肺癌の新たな創薬シーズの同定を目指した。

3. 研究の方法

(1) シスプラチン及び HGF 受容体阻害剤 PHA665752 による治療実験

自然転移モデルの化学療法への反応性を検討するために、小細胞肺癌の化学療法の第一選択薬であるシスプラチンについて、*in vitro* 細胞増殖への影響を MTT アッセイにて調べた上で、*in vivo* 治療実験を行った。1x10⁶ 個の高転移性亜株をヌードマウス肺に同所移植し、シスプラチンを 1.25 mg/kg もしくは 5 mg/kg の用量で週一回静注投与を行って、腫瘍移植 25 日もしくは 26 日後に解剖して同所移植巣及び遠隔転移を評価した。

さらに、小細胞肺癌において癌進展への寄与が明らかになっている HGF 受容体 MET の特異的阻害剤 PHA665752 について、MTT アッセイによる *in vitro* 細胞増殖への影響の検討と、*in vivo* 治療実験を行った。高転移性亜株を用いた自然転移モデルに PHA665752 を 15 mg/kg の用量で週 3 回静注投与を行い、腫瘍移植 27 日もしくは 28 日後に解剖して同所移植巣及び遠隔転移を評価した。

(2) 膜タンパク質 CXADR の治療標的としての評価

小細胞肺癌での発現レベルが患者の予後と正の相関がある膜タンパク質 CXADR について、高転移性亜株における発現をウエスタンブロット及び免疫組織化学により検討した。次に CXADR shRNA 発現レンチウイルスを感染させ、持続的 CXADR ノックダウン株を樹立した。コントロール shRNA を導入した高転移性亜株も作成し、それぞれをヌードマウス肺に同所移植して自然転移モデルを作出して、両群で同所移植巣の大きさと遠隔転移形成を比較した。さらに、抗腫瘍効果を持つ抗 CXADR モノクローナル抗体(Kawada *et al.*, *Sci Rep* 2017)を自然転移モデルに週 1 回 250ug の用量で計 5 回静注投与し、腫瘍移植 34 日から 36 日後に解剖して同所移植巣及び遠隔転移を評価した。

(3) 同所移植巣と転移巣の発現比較プロトコルの確立

自然転移モデルの骨転移巣及び副腎転移巣、そして同所移植巣を回収し、ハサミで小片にした後、ディッシュで培養した。培養後、トリプシン処理して分散させ、抗体磁気ビーズ(ミルテニー社)を用いてヒト癌細胞を分離回収した。得られた癌細胞より RNA を抽出し、全遺伝子及び lincRNA をカバーする DNA マイクロアレイ(SurePrintG3 Human GE 8x60K、

Agilent 社)により遺伝子発現プロファイルを取得した。有意な発現変動が認められた遺伝子の一部については、免疫組織化学により同所移植巣と転移巣でのタンパク質レベルでの発現量を確認した。

4. 研究成果

(1) シスプラチン及び HGF 受容体阻害剤 PHA665752 による治療実験

高転移性亜株及び親株に対するシスプラチンの *in vitro* 細胞増殖抑制効果を検討したところ、シスプラチン 72 時間処理による IC50 値は凡そ 0.5 μ g/ml であり、これは胃癌細胞株 MKN45 と同程度の感受性であった。次に高転移性亜株を用いた自然転移モデルにシスプラチンを 1.25 mg/kg もしくは 5 mg/kg の用量で週一回静注投与したところ、同所移植巣はそれぞれ 35%もしくは 45%の縮小を示した。遠隔転移巣の形成頻度については、非投与群が 67%だったのに対し、投与群ではいずれも 0%と顕著な抑制がみられた。小細胞肺癌の化学療法の一選択薬であるシスプラチンは、本モデルにおいても著効を示すことが明らかになった。

また、HGF 受容体 MET の特異的阻害剤 PHA665752 の 72 時間処理による *in vitro* 細胞増殖抑制の IC50 値は凡そ 2 μ M であり、これは MET に依存している胃癌細胞株 MKN45 の IC50 値 20nM とは大きく異なる数値であった。そして、細胞毒性を示さない 0.2 μ M の用量で、高転移性亜株の遊走能及びマトリゲル浸潤能が有意に抑制された。次に高転移性亜株を用いた自然転移モデルに PHA665752 を 15 mg/kg の用量で週 3 回静注投与したところ、同所移植巣には影響しなかったが、遠隔転移形成は非投与群が 78%に対して投与群が 25%と有意に抑制された。HGF/MET シグナルは小細胞肺癌においても重要な因子であることが知られており、以前にも本モデルにおいて MET 阻害剤 ARQ197 が遠隔転移を抑制するデータを得ていたが、ARQ197 には Tubulin 重合活性もあるため解釈が難しかった。今回、特異性の高い MET 阻害剤 PHA665752 によっても遠隔転移形成が抑制されたことから、本モデルでの遠隔転移形成への HGF/MET シグナルの関与が強く示唆された。

以上の結果は、本モデルが SCLC の臨床像をよく反映しており、低分子化合物や抗体などの評価に有用であることを示している。

(2) 膜タンパク質 CXADR の治療標的としての評価

小細胞肺癌の患者のうち、膜タンパク質 CXADR (Coxsackie virus and adenovirus receptor) の発現が高い患者は再発を来しやすいことが示された(Wunder *et al.* *Cancer Gene Ther* 2013) ため、本モデルでの肺腫瘍形成や転移形成における CXADR の意義について解析した。まず、高転移性亜株における発現をウエスタンブロット及び免疫組織化学

により調べたところ、*in vitro* (通常の培養条件) 及び *in vivo* (同所移植巣) とともに発現が認められた。そこで高転移性亜株の CXADR ノックダウン細胞を作製し、*in vitro* での通常の増殖能及び足場非依存性増殖能を検討した結果、親株やコントロール shRNA 導入細胞と比較して有意な差はみられなかった。また、我々は前立腺がん細胞株の造腫瘍性の解析から CXADR に着目し、抗腫瘍活性を持つ抗 CXADR モノクローナル抗体を作製していた(Kawada *et al.*, *Sci Rep* 2017)。この抗体を用いた治療実験では、自然転移モデルの同所移植巣形成と遠隔転移形成がともに有意に抑制された。これらの結果から、膜タンパク質 CXADR は本モデルの腫瘍増殖や遠隔転移形成には必須ではないが、小細胞肺癌の抗がん抗体医薬の標的分子候補となると考えられた。

(3) 同所移植巣と転移巣の発現比較プロトコルの確立

複数の同所移植巣と転移巣から分離回収した癌細胞のマイクロアレイデータを解析した結果、43 遺伝子が移植巣癌細胞と転移巣癌細胞間で 4 倍以上の発現変動を示すことがわかった。それらの遺伝子のうち、転移巣癌細胞で発現上昇していた膜タンパク質遺伝子と小 GTPase 遺伝子について、自然転移モデルの腫瘍組織における発現を免疫組織染色により検討したところ、両遺伝子ともにタンパク質レベルでも遠隔転移巣で高発現していることが確認できた。すなわち、本モデルの同所移植巣と遠隔転移巣で発現変動する因子を同定するプロトコルを確立するとともに、転移関連因子候補を複数得ることが出来た。

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 2 件)

A novel monoclonal antibody targeting coxsackie virus and adenovirus receptor inhibits tumor growth *in vivo*. Kawada, M., Inoue, H., Kajikawa, M., Sugiura, M., Sakamoto, S., Urano, S., Karasawa, C., Usami, I., Futakuchi, M., Masuda, T. *Scientific Reports* 7: 40400, 2017, DOI:10.1038/srep40400, 査読有

New metastatic model of human small-cell lung cancer by orthotopic transplantation in mice. Sakamoto, S., Inoue, H., Ohba, S., Kohda, Y., Usami, I., Masuda, T., Kawada, M., Nomoto, A. *Cancer Science* 106: 367-374, 2015, DOI:10.1111/cas.12624, 査読有

[学会発表](計 6 件)

坂本修一、井上裕幸、大庭俊一、梶川益紀、杉浦雅仁、浦野咲子、幸田泰子、水谷壮利、宇佐美伊保美、川田学：ヌードマウス肺への同所移植によるヒト小細胞肺癌の自然転移モデルの開発とその応用、文部科学省新学術領域研究 先端モデル動物支援プラットフォーム若手支援技術講習会、蓼科グランドホテル（長野県茅野市）、2016年09月16日、ポスター発表

坂本修一、川田学：小細胞肺癌の自然転移モデルの開発とその応用、第25回日本がん転移学会学術総会、米子コンベンションセンター（鳥取県米子市）、2016年07月21日、招待講演

坂本修一、梶川益紀、増田徹、川田学：小細胞肺癌の同所移植モデルの移植巣及び転移巣形成における膜タンパク質CXADRの役割の解析、第74回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）、2015年10月09日、一般口演

坂本修一、川田学：小細胞肺癌の自然転移モデルにおける膜タンパク質CXADRの意義の検討、第24回日本がん転移学会学術総会、シティプラザ大阪（大阪府大阪市）、2015年07月23日、一般口演

坂本修一、川田学、野本明男：Development of a novel orthotopic transplantation model of human small cell lung cancer metastasis、第73回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）、2014年09月26日、ポスター発表

坂本修一、川田学：ヒト小細胞肺癌由来の高転移性細胞に対する新規抗CXADR抗体の制がん活性の検討、第23回日本がん転移学会学術総会、金沢ニューグランドホテル（石川県金沢市）、2015年07月10日、ポスター発表

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

井上 裕幸 (INOUE, Hiroyuki)
公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所動物施設・研究員
研究者番号：50601548

(4) 研究協力者

()