

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：72602

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22112008

研究課題名（和文）転移形成に関わるがん微小環境の解明とその分子機構を標的とした治療法開発

研究課題名（英文）Molecular analysis of metastasis-related tumor microenvironment and development of new anti-metastatic therapy

研究代表者

藤田 直也（FUJITA, Naoya）

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター・所長

研究者番号：20280951

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 70,300,000円

研究成果の概要（和文）：Merm1やAggrusなど転移関連分子のがん微小環境による活性制御機構の解析とこれら分子を標的とした転移抑制剤開発を行なった。具体的には、（1）Merm1はがん抑制遺伝子p53の機能を抑制することで血管内のがん細胞の生存を促進し、その結果として転移形成を助長していることを見いだした。また、がん転移抑制遺伝子候補を複数同定することに成功した。また、（2）血小板のがん微小環境を構成する因子であり、血小板より放出されるPDGFをはじめとする増殖因子ががん細胞の増殖を促進していること、これら血小板を凝集させるAggrusを標的とした阻害薬は抗腫瘍薬として有望であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this project, we tried to analyze the regulation of metastasis-promoting activities of Merm1 and Aggrus by tumor microenvironment and to develop anti-metastatic drugs. We performed the following experiments and obtained several new findings.

(1) We found that Merm1 enhanced tumor cell survival in the vasculature by suppressing p53-mediated apoptosis. We established the in vivo screening system to select high metastatic tumors and obtained several candidate metastasis-related genes.

(2) We analyzed the role of platelets in tumor growth and metastasis. We found that platelets were one of the components of tumor microenvironment, that growth factors secreted from platelets were associated with tumor growth in vivo, and that anti-Aggrus drugs would suppress tumor growth as well as tumor metastasis.

研究分野：がん化学療法学

キーワード：癌 がん微小環境 転移 Merm1 血小板

### 1. 研究開始当初の背景

がんは、生体内制御機構から逸脱して無秩序な増殖をするといった特徴をもつ疾患であるが、がんの致死率を規定する最も大きな要因は、がんが発生した原発巣での増殖ではなく、転移巣における増殖である。転移性がん細胞は異常な運動能・接着能・細胞外基質の破壊能など様々な性質を兼ね備えているが、これに加え転移先臓器の微小環境が、がんの転移巣形成に重要な役割を果たしていることが知られている。しかしこうしたがん微小環境による転移の制御機構を明らかにするためには、個体レベルで解析する必要があると考えられていた。

### 2. 研究の目的

研究代表者らはこれまでに、独自の個体レベルの転移モデル系を用いて、Aggrusなどの血行性転移に関わる新規分子を同定し、その転移促進機構を解明してきた。そこで本研究課題では、実験的転移モデルを用いた *in vivo* スクリーニングにより同定・命名した機能未知分子 Merm1 の解析を中心に、転移関連がん微小環境を解明し、その微小環境を制御する薬剤開発につなげることを目的とする。また、*in vivo* スクリーニングを再度実施することで、新たな転移関連遺伝子を同定するとともに、がん細胞と血小板の相互作用並びにその相互作用を介したがん微小環境の機能変化も解析し、得られた相互作用・分子機構を標的にした新たな治療法開発も目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 血行性転移における Merm1 の機能解析。Merm1 は、*in vivo* スクリーニングにより得られた遺伝子である。Merm1 のがん転移促進活性を確認するために、恒常的 Merm1 発現 CHO 細胞株を樹立し、この細胞株における転移能を検討する。血行性転移モデル系で汎用される高転移細胞株における Merm1 遺伝子発現を RT-PCR 法や Western 法などで検討し、Merm1 高発現細胞株を探索し、見出された高発現細胞株に Merm1 shRNA を導入することで、恒常的 Merm1 ノックダウン細胞株を樹立し、転移能に対する影響を検討する。

(2) Merm1 発現制御機構の解析と阻害剤探索。転移巣が形成されるまでには、運動、浸潤、接着、再増殖など様々なステップが関与している。Merm1 過剰発現あるいは shRNA でノックダウンした細胞株を用い、運動能の変化は創傷治癒 (スクラッチ) アッセイで、浸潤能の変化は transwell chamber を用いたアッセイで、接着能の変化はヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) への接着能変化で、再増殖は MTS アッセイで検証する。変化が認められた場合には、各々のステップに関与する分子との相互作用を検討する。これら検討でも Merm1 の転移促進作用に相関のある機構が見つからない場合は、マイクロアレイ法による網羅的な関連遺伝子探索法に切り替えて研

究を進める。また、Merm1 遺伝子のプロモーター部位をルシフェラーゼ遺伝子上流につないだレポーターコンストラクトを用いることにより、Merm1 発現抑制活性を示すヒット化合物を探索する。

(3) 新規転移関連遺伝子の探索。がん転移を抑制している遺伝子の同定を行うために、低転移がん細胞株に shRNA ライブラリーを導入し、マウスに shRNA 導入株を移植して肺または肝臓に転移したがん細胞を回収するといった *in vivo* スクリーニング系を構築する。そのうえで、転移先臓器から shRNA の導入されたがん細胞を回収し、導入されている shRNA の遺伝子配列を解析することで、ノックダウンされると予想される遺伝子を特定する。shRNA の標的遺伝子の転移抑制活性は、高転移細胞株に過剰発現させることで確認する。

(4) がん細胞と血小板の相互作用並びにその相互作用を介したがん微小環境の機能変化。抗血小板薬には、転移巣におけるがん細胞の増殖抑制効果が認められている。そこで、転移巣における相互作用を、血小板マーカーである抗 CD41 抗体を用いた免疫染色法で検証するとともに、抗血小板薬投与に伴う相互作用変化を検証する。

### 4. 研究成果

(1) 血行性転移における Merm1 の機能解析。高転移性メラノーマ細胞より調製した cDNA ライブラリーを低転移性 CHO 細胞に遺伝子導入し、この遺伝子導入細胞を尾静脈より移植した結果、肺転移結節が生じることを見いだした。この肺転移結節を回収し、そこに含まれている導入遺伝子を解析することで、Merm1 遺伝子が同定された(図1)。Merm1 遺伝子は、

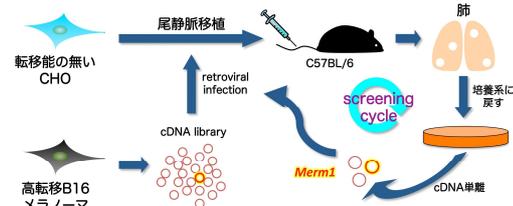


図1：新規転移関連遺伝子Merm1の同定につなげた *in vivo* スクリーニング系

多臓器障害を特徴とするウィリアムズ - ビューレン症候群で欠失している7番染色体の7q11.23上に載っている遺伝子であるが、疾患特にがん化との関連は報告されていない。本年度、CHO細胞にMerm1を過剰発現させた細胞株を樹立し、*in vivo*におけるがん転移促進活性を検討した。その結果、Merm1発現に伴い肺や肝臓などへの血行性転移が促進されることが確認された。さらに、Merm1の一次アミノ酸配列より類推されるメチルトランスフェラーゼ活性と転移促進能の相関を検討するために、メチルトランスフェラーゼと相関性の高い部位に変異を導入して活性を喪失させた変異

Merm1遺伝子(Merm1-MD)を作製し、同様にCHO細胞に高発現させた(図2)。MD変異体は血行

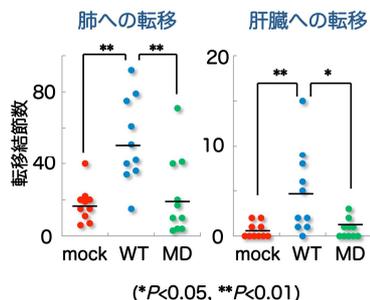


図2 : Merm1遺伝子導入による肺や肝臓への血行性転移促進

性転移を生じなかったため、Merm1のメチルトランスフェラーゼ活性が転移促進活性と密接に関わっていることが示唆された。また、組織アレイを用いてMerm1発現腫瘍の探索を行った結果、浸潤能が高い浸潤性乳管がんやメラノーマにおいてMerm1発現が高いことを見出した。また公的細胞バンクより入手したメラノーマ細胞株でもMerm1過剰発現を確認した。一方、正常メラノサイトおよび皮膚扁平上皮がん細胞株ではMerm1発現が低かった。そこでMerm1を高発現しているメラノーマ細胞株A375Mを蛍光標識し、転移初期過程である肺毛細血管におけるトラップ状態を検討した。Merm1 shRNAを用いてMerm1発現を抑制すると、肺毛細血管内における生細胞数の減少が確認され(図3)、Merm1は血管内における

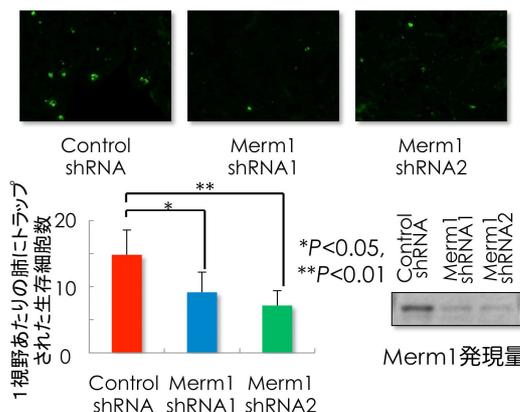


図3 : Merm1 ノックダウンに伴う肺にトラップされた生細胞数の減少

がん細胞生存に関わることが示唆された。

(2) Merm1発現制御機構の解析と阻害剤探索。Merm1の機能解明に向けて、shRNAを用いたMerm1発現抑制メラノーマ細胞株の樹立を行った。その発現抑制細胞株で接着能の変化など各種検討したが、Merm1発現減少に伴い変化する事象は見出されなかった。そこでマイクロアレイ法でMerm1発現減少に伴い発現変動する遺伝子を探索した結果、p53のco-activatorであるZac1の発現が上昇することを見出した(図4)。さらに、Merm1がZac1の発現抑制を介してp53誘導性のアポトーシ

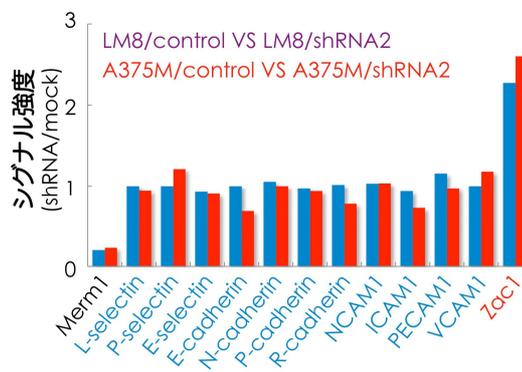


図4 : Merm1 ノックダウン時に発現増強される Zac1 遺伝子の同定

スを阻害することで、がん細胞の転移先臓器における生存を促進していることが、Merm1の転移促進能の根幹であることが明らかとなった。また、Merm1遺伝子のプロモーター部位約2500 bpをクローニングしてレポーターコンストラクトの作製を行った。Deletion mutantを作製することで、Merm1遺伝子転写に関わるcis-elementの同定に成功した。また、このプロモーター部位にp53/p73ファミリー転写因子が結合するコンセンサス配列を見出したため、p53によるMerm1発現制御の可能性を検討したが、p53阻害剤の結果とレポーター活性の相関が得られず、得られていた5種類のp53阻害剤のさらなる検討は断念した。一方、Merm1との相互作用因子を質量分析計で解析した結果、リボソーム合成に関わる多数の因子が結合していることを見出した。これら因子がMerm1阻害剤開発の際の標的分子となることが示唆された。

(3) 新規転移関連遺伝子の探索。shRNAライブラリーを用いた *in vivo* アッセイ系で回収された shRNA の標的遺伝子には、転移の際に不活性化されるあるいは発現減少が起きると報告されている遺伝子も含まれていた。そこで現在、高転移細胞に shRNA の標的遺伝子を過剰発現することで転移能の減弱が認められるかなどの確認を進めている。同定された遺伝子の転移抑制活性が確認されたら、この遺伝子をがん悪性のバイオマーカーとして利用可能であると考えられた。

(4) がん細胞と血小板の相互作用並びにその相互作用を介したがん微小環境の機能変化。Aggrusは血小板上のCLEC-2と結合することで、血小板凝集を引き起こす転移促進分子である。これまでに、AggrusとCLEC-2の結合を阻害し、血小板凝集を阻害する中和抗体の作製に成功していた。そこで、この中和抗体を担がんマウスに投与すると、当初の目的である血行性転移の阻害だけでなく、Aggrus陽性がん細胞の *in vivo* における増殖をも抑制することを見いだした。その作用機作を検討した結果、血小板凝集時に放出される血小板からの増殖因子がAggrus陽性がん細胞の増殖を促進しており、中和抗体投与によりこの増殖因子の枯

湯が引き起こされ、腫瘍増殖が抑制されることを見いだした(図5)。

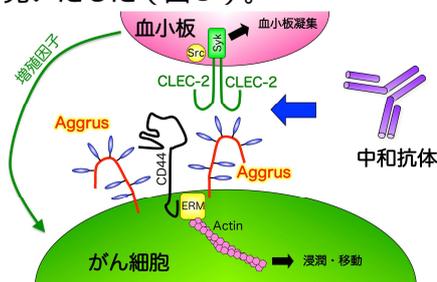


図5 : Aggrusを起点とした血小板凝集誘導機構と、血小板が放出する増殖因子によるがん細胞の増殖促進

腫瘍部位における血小板の集積を検討するために、Aggrus陽性のPC10細胞とAggrus陰性のA549細胞の腫瘍を用いて、血小板を認識する抗CD41抗体で免疫染色を行なった。その結果、PC10細胞の腫瘍内には多数の血小板が集積していることが明らかとなった(図6)。よっ

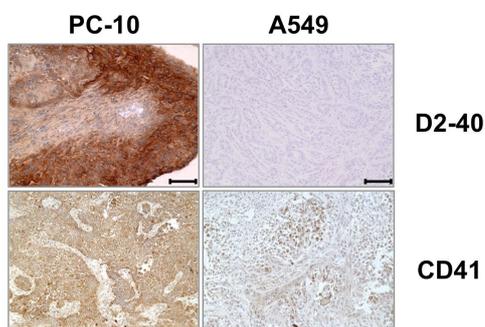


図6 : CD41抗体を用いた、腫瘍内における血小板集積の検討

て、これら血小板が凝集時に放出する増殖因子が腫瘍の増殖を促進している可能性が示唆された。

そこで血小板凝集を引き起こす骨肉腫などのがん細胞を用いて、血小板凝集を抑制する抗血小板薬の効果を検討した。その結果、抗血小板薬処理は腫瘍増殖の抑制と浸潤抑制を引き起こすことを見いだした。がん微小環境における血小板の意義を明確にするために、血小板凝集に伴い放出される因子のうち、がん細胞の増殖に関わる因子の同定を、サイトカインアレイ等を用いて行なった。その結果、血小板凝集を引き金として血小板よりPDGFが放出され、そのPDGFが骨肉腫細胞などの増殖を促進していることを見出した。しかし、PDGF受容体阻害剤あるいはその下流のAkt阻害剤では、腫瘍増殖抑制を十分に行うことができず、血小板凝集時に放出される他の増殖因子も腫瘍増殖に関わっている可能性が示唆された。よって、血小板凝集自体を阻害するAggrus阻害薬の創製が重要であることが示唆された。そこで、これまでにスクリーニングして得られたAggrus阻害低分子化合物を元に誘導体を100種類以上合成し、AggrusとCLEC-2の結合を

阻害する薬剤の探索を行なった。その結果、これまでとほぼ同じ活性を示す6種類のヒット化合物を取得することに成功するとともに、化合物のAggrus阻害に関わる構造活性相関データを得ることに成功した。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計14件)

Takagi S, Takemoto A, Takami M, Oh-Hara T, Fujita N. Platelets promote osteosarcoma cell growth through activation of the platelet-derived growth factor receptor-Akt signaling axis. *Cancer Sci.* 2014 査読有、105(8):983-8. DOI: 10.1111/cas.12464.

Miyata K, Takagi S, Sato S, Morioka H, Shiba K, Minamisawa T, Takami M, Fujita N. Suppression of Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and pulmonary metastasis by a single-chain antibody variable region fragment. *Cancer Med.* 2014 査読有、3(6):1595-604. DOI: 10.1002/cam4.320.

Takagi S, Oh-hara T, Sato S, Gong B, Takami M, Fujita N. Expression of Aggrus/podoplanin in bladder cancer and its role in pulmonary metastasis. *Int J Cancer.* 2014 査読有、134(11):2605-14. DOI: 10.1002/ijc.28602.

Takagi S, Sato S, Oh-hara T, Takami M, Koike S, Mishima Y, Hatake K, Fujita N. Platelets promote tumor growth and metastasis via direct interaction between Aggrus/podoplanin and CLEC-2. *PLoS One.* 2013 査読有、8(8):e73609. DOI: 10.1371/journal.pone.0073609.

Yamada T, Takeuchi S, Fujita N, Nakamura A, Wang W, Li Q, Oda M, Mitsudomi T, Yatabe Y, Sekido Y, Yoshida J, Higashiyama M, Noguchi M, Uehara H, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Akt kinase-interacting protein1, a novel therapeutic target for lung cancer with EGFR-activating and gatekeeper mutations. *Oncogene.* 2013 査読有、32(37):4427-35. DOI: 10.1038/onc.2012.446.

Fujita N, Takagi S. The impact of Aggrus/podoplanin on platelet aggregation and tumour metastasis. *J Biochem.* 2012 査読有、152(5):407-13. DOI: 10.1093/jb/mvs108.

Hahne J.C., Honig A., Meyer S.R., Gambaryan S., Walter U., Wischhusen J., Häussler S.F.M., Segerer S.E.,

Fujita N., Dietl J. Engel J.B. Downregulation of AKT reverses platinum resistance of human ovarian cancers *in vitro*. **Oncol. Rep.**, 2012 査読有、28 (6): 2023-2028.

DOI: 10.3892/or.2012.2041

Nakazawa Y, Takagi S, Sato S, Oh-hara T, Koike S, Takami M, Arai H, Fujita N. Prevention of hematogenous metastasis by neutralizing mice and its chimeric anti-Aggrus/podoplanin antibodies. **Cancer Sci.** 2011 査読有、102(11):2051-7.

DOI:

10.1111/j.1349-7006.2011.02058.x.

Nakazawa Y, Arai H, Fujita N. The novel metastasis promoter Merm1/Wbscr22 enhances tumor cell survival in the vasculature by suppressing Zac1/p53-dependent apoptosis. **Cancer Res.** 2011 査読有、71(3):1146-55.

DOI: 10.1158/0008-5472.

Konishi S, Yasuchika K, Ishii T, Fukumitsu K, Kamo N, Fujita N, Ikai I, Uemoto S. A transmembrane glycoprotein, gp38, is a novel marker for immature hepatic progenitor cells in fetal mouse livers. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.** 2011 査読有、47(1):45-53.

DOI: 10.1007/s11626-010-9354-7.

Morishita D, Takami M, Yoshikawa S, Katayama R, Sato S, Kukimoto-Niino M, Umehara T, Shirouzu M, Sekimizu K, Yokoyama S, Fujita N. Cell-permeable carboxyl-terminal p27(Kip1) peptide exhibits anti-tumor activity by inhibiting Pim-1 kinase. **J Biol Chem.** 2011 査読有、286(4):2681-8.

DOI: 10.1074/jbc.M109.092452.

Ehata S, Johansson E, Katayama R, Koike S, Watanabe A, Hoshino Y, Katsuno Y, Komuro A, Koinuma D, Kano MR, Yashiro M, Hirakawa K, Aburatani H, Fujita N, Miyazono K. Transforming growth factor- decreases the cancer-initiating cell population within diffuse-type gastric carcinoma cells. **Oncogene.** 2011 査読有、30(14):1693-705.

DOI: 10.1038/onc.2010.546.

Nakamura A, Naito M, Arai H, Fujita N. Mitotic phosphorylation of Aki1 at Ser208 by cyclin B1-Cdk1 complex. **Biochem Biophys Res Commun.** 2010 査読有、393(4):872-6.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.103.

Misawa A, Katayama R, Koike S, Tomida A, Watanabe T, Fujita N. AP-1-Dependent miR-21 expression contributes to chemoresistance in cancer stem cell-like SP cells. **Oncol Res.** 2010 査読有、19(1):23-33.

URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21141738>

〔学会発表〕(計18件)

Ai Takemoto, Satoshi Takagi, Mina Okitaka, Miho Takami, Shigeo Sato, Tomoko Oh-hara, Naoya Fujita. Aggrus-induced platelet aggregation promotes tumor metastasis by enhancing EMT. Joint International Symposium on TGF- and Cancer (2015年1月12日、つくば国際会議場、つくば)

大原智子、高木聡、竹本愛、佐藤重男、高見美穂、藤田直也. Expression of Aggrus/podoplanin in bladder cancer and its role in pulmonary metastasis. 第73回日本癌学会総会(2014年9月27日、パシフィコ横浜、横浜)

竹本愛、高木聡、高見美穂、大原智子、藤田直也. Platelets promote the malignancy of osteosarcoma through activation of the PDGFR-Akt signaling. 第73回日本癌学会総会(2014年9月25日、パシフィコ横浜、横浜)

宮田憲一、高木聡、藤田直也. 一本鎖抗体による Aggrus/podoplanin 依存的な血小板凝集及び肺転移の抑制。第23回日本がん転移学会(2014年7月10日、金沢市文化ホール、金沢)

藤田直也. 新規血小板凝集促進因子 Aggrus を標的とした分子標的治療薬の創製。平成25年度彩都産学官連携シンポジウム(2014年1月21日、千里ライフサイエンスセンター、大阪)

藤田直也、高木聡. Development of anti-Aggrus/podoplanin antibodies suppressing hematogenous metastasis and tumor growth *in vivo*. 第72回日本癌学会総会(2013年10月4日、パシフィコ横浜、横浜)

高木聡、佐藤重男、藤田直也. Suppression of tumor growth *in vivo* by a murine/human chimeric anti-Aggrus neutralizing antibody. 第72回日本癌学会総会(2013年10月3日、パシフィコ横浜、横浜)

高木聡、藤田直也. Aggrus/podoplanin を標的とした中和抗体による抗転移効果と抗腫瘍効果。第22回日本がん転移学会学術集会(2013年7月11日、エナピスタ、松本)

竹内伸司 山田忠明 藤田直也 石井源一郎 落合淳志 矢野聖二. Aggrus/Podoplanin は Rho/ROCK シグナルを活性化し胸膜中皮腫の進展を促進する. 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会(2013年4月20日、東京国際フォーラム、東京)

Naoya Fujita. Targeting tumor-host interaction for developing anti-metastatic therapies. JST CREST/SICP/ERATO Joint Symposium on "Microfluidics for Tissue and Cell Applications" (2012年11月5日、東京大学、東京)

Naoya Fujita. The role of tumor-platelet interaction in hematogenous metastasis. The 2nd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program "TGF- Family: Signal Network and Tumor Microenvironment"(2012年10月29日、昭和薬科大学、東京)

Naoya Fujita. Role of Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation in tumor growth and metastasis formation. The 9th Nikko International Symposium 2012 "Understanding complex network system in disease biology" (2012年10月12日、自治医科大学、栃木)

藤田直也. Involvement of platelet-tumor interaction in tumor cell survival and metastasis. 第 71 回日本癌学会総会(2012年9月20日、ロイトン札幌、札幌)

藤田直也、がん分子標的の探索から治療薬開発への展開とその現状. 第 141 回日本医学会シンポジウム「がん分子標的治療の進歩」(2011年12月8日、日本医師会館大講堂、東京)

高木聡、藤田直也、Prevention of hematogenous metastasis by mouse and murine/human chimeric anti-Aggrus/podoplanin antibodies. 第 70 回日本癌学会総会(2011年10月4日、名古屋国際会議場、名古屋)

高木聡、藤田直也、血小板凝集促進因子 Aggrus を標的とした抗体による血行性転移の阻害. 第 20 回日本がん転移学会(2011年6月30日、アクトシティ浜松、浜松)

Youya Nakazawa, Hiroyuki Arai, Naoya Fujita. A novel histone methyltransferase Merm1 promotes metastasis by Zac1 silencing. 第69回日本癌学会総会(2010年9月23日、大阪国際会議場、大阪)

Aya Misawa, Ryohei Katayama, Sumie

Koike, Akihiro Tomida, Toshiki Watanabe, Naoya Fujita. AP-1-dependent miR-21 expression contributes to chemoresistance in cancer stem cell-like SP cells. 第 69 回日本癌学会総会(2010年9月22日、大阪国際会議場、大阪)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/fundamental/index.html>

<http://www.jfcr.or.jp/english/chemotherapy/department/fundamental/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田直也 (FUJITA, Naoya)  
公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター・所長  
研究者番号: 20280951

### (2) 研究分担者

小郷 尚久 (OGO, Naohisa)  
静岡県立大学・薬学研究院・創薬探索センター・講師  
研究者番号: 20501307

### (3) 研究協力者

佐藤 重男 (SATO, Shigeo)  
中澤 侑也 (NAKAZAWA, Youya)  
三沢 彩 (MISAWA, Aya)  
竹本 愛 (TAKEMOTO, Ai)  
大原 智子 (OH-HARA, Tomoko)  
高見 美穂 (TAKAMI, Miho)  
宮田 憲一 (MIYATA, Kenichi)  
沖高 美奈 (OKITAKA, Mina)  
関口 貴哉 (SEKIGUCHI, Takaya)  
高鳥 一樹 (TAKATORI, Kazuki)  
布施 美保ジェーン (FUSE, Miho Jane)