

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2007～2008

課題番号：19209010

研究課題名 (和文) マウスモデルを用いた消化器癌転移の研究

研究課題名 (英文) Studies on digestive cancer metastasis using mouse models

研究代表者

武藤 誠 (TAKETO MAKOTO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：70281714

研究成果の概要：Aes (amino-terminal enhancer of split) が大腸癌の血行性転移を抑制すること、その機序として、Aes が Notch シグナル抑制を介して癌細胞の血管内侵入を阻害することを、マウスモデルを用いて明らかにした。AES の発現消失はヒト大腸癌の肝転移とも関連していた。また、ケモカイン受容体 CXCR3 の阻害薬はメラノーマのリンパ節転移を抑制し、CXCR3 がリンパ節転移の治療標的となる可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	20,300,000	6,090,000	26,390,000
平成 20 年度	18,500,000	5,550,000	24,050,000
総計	38,800,000	11,640,000	50,440,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：分子腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

近年、癌の早期発見・治療技術の進歩により初期癌の治療成績は飛躍的に向上しているが、浸潤・転移を伴う進行癌の予後は極めて悪く癌による死亡率は改善されていない。中でも消化器癌による死亡率は肺癌に次いで高く、その遠隔転移を抑制することが治療における重要課題となっていた。

研究開始当初までに多くの研究者が癌細胞の離脱・浸潤の過程に着目し、細胞間接着因子 (cadherin 等) やプロテアーゼ (MMP 等) をはじめとする因子が転移に関わることを明らかにしてきたが、残念ながら治療の標的となりうる癌転移関連因子は殆ど報告されていなかった。その理由の一つに、これまでの多くの研究が異所移植 (例えば大腸癌細胞の皮下など原発巣とは異なる組織への移植) の系を用いており、実際の癌転移の過程を反映するモデルが用いられていないことが考え

られた。我々は、同所移植の系を駆使してケモカインレセプター CXCR3 とそのリガンドがメラノーマのリンパ節転移に重要であることを証明していた。

我々はまた、直腸への同所移植を繰り返すことによって Colon 26 マウス大腸癌細胞のリンパ節及び肺・肝臓高転移株を樹立し、親株と比べて高転移株で発現が変動する 32 個の遺伝子を DNA マイクロアレイにより同定した。これら全ての遺伝子について安定発現細胞株を作製し、*in vitro* での浸潤能を指標に簡易スクリーニングを行った結果、4 個の遺伝子が *in vitro* での浸潤を抑制することを見出した。特に抑制効果の強かった Aes (amino-terminal enhancer of split) については、*in vivo* での同所移植実験でも血行性転移を顕著に抑制することを確認していた。

2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまでに得た知見・手法を駆使して大腸癌の転移を抑制するための新たな治療標的を見出すことを目的とし、以下の研究を行った。

- (1) 当研究室で独自に同定した転移関連遺伝子 (*CXCR3*, *Aes*) が大腸癌細胞の転移能獲得に果たす役割とその機序を明らかにする。
- (2) これまであまり注目されていなかった転移先周辺組織の変化とそれらが転移細胞の増殖に及ぼす影響を明らかにする。

なお、当初の計画では、臨床病状をより正確に反映した同所移植の系を用いて新規腸癌転移関連遺伝子を同定する予定であったが、後述の通り *Aes* 遺伝子が転移において極めて重要な役割を果たすことが明らかとなったため、*Aes* の機能、発現の解析を優先して行なった。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌転移における *Aes* 遺伝子の役割の解明

- ① Tet-on システムにより *Aes* 発現誘導 Colon26 マウス大腸癌細胞を樹立した。また、shRNA により *Aes* の発現を減弱させたノックダウン Colon26 細胞も樹立した。これらの細胞の *in vitro* での浸潤、増殖能を対照と比較するとともに、ノックダウン細胞を Balb/c マウスに同系同所性移植し、大腸癌転移における *Aes* 遺伝子の役割を解析した。
- ② 免疫組織染色により、癌組織中の Notch 経路のリガンド及びレセプターの局在を検討した。
- ③ Notch 経路を抑制する gamma-secretase 阻害剤を用いて大腸癌細胞の転移における Notch 経路遮断の影響について検討した。
- ④ ヒト大腸癌臨床検体での AES 免疫組織染色により、同一患者の原発巣と転移巣の AES 発現を比較した。また、原発巣の AES 発現と病理学的因子との間に相関があるかを検討した。

(2) CXCR3 がリンパ節転移の治療標的となる可能性の検討

- ① CXCR3 を強発現させたヒト大腸癌細胞 DLD-1 をヌードマウスの直腸に移植した後、1日目、2週間目、4週間目にこれらのマウスからリンパ節を採取した。得られたリンパ節から DNA を抽出し、ヒトβ-グロビン (human β-globin) 遺伝子の発現を PCR で検出することでリンパ節に含まれる癌細胞の数を推測した。
- ② ヒト大腸癌臨床検体における CXCR3、CXCR4 の発現を免疫染色で検出し、癌の悪性度 (TNM 分類)、リンパ節転移の有無、脈管浸潤の有無、生存率との相関を解析した。
- ③ B16F10 メラノーマ細胞を同系マウス

(C57BL/6) の footpad へ移植した後、偽薬 (placebo) および 2 種類の CXCR3 阻害薬 (TAK-779: 武田薬品、AMG-487: Amgen) を投与した。これらのマウスから膝下リンパ節を採取し、実体顕微鏡下で転移巣の数を計測した。

- ④ B16F10 メラノーマ細胞を移植した C57BL/6 マウスの膝下リンパ節を採取し、H&E 染色を用いて転移メラノーマ細胞の局在を、免疫染色を用いて CXCL10 の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 大腸癌転移における *Aes* 遺伝子の役割の解明

Colon26 細胞と Tet-on システムを使用し、*Aes* 発現誘導株を作成した。浸潤能を *in vitro* のマトリゲル浸潤モデルを用いて測定したところ、*Aes* の発現を誘導すると誘導量依存的に浸潤能が有意に低下することが分かった。また、*Aes* mRNA に対する shRNA を恒常的に発現させて *Aes* の発現を減少させたノックダウン細胞では、浸潤能が上昇することが分かった。このノックダウン細胞をマウス直腸に同所移植したところ、肝臓や肺への転移が有意に増加することが分かった。一方で *in vitro* における細胞の増殖や、移植後の原発巣の大きさには影響がなかったことから、*Aes* は癌細胞の増殖以外の機序によって転移を抑制する、新規の転移抑制遺伝子であることが分かった。

また、ルシフェラーゼレポーターを用いた解析により、*Aes* が Notch シグナルを有意に抑制することを明らかにした。上記のマウス直腸接種モデルの原発巣において、宿主側血管内皮細胞及びマクロファージが Notch リガンドを、癌細胞が Notch レセプターを発現していたことから、これらの細胞間での Notch シグナルの伝達が転移に重要である可能性が示唆された。

さらに、Colon26 細胞を同所移植したマウスに Notch シグナルを遮断する gamma-secretase 阻害剤を投与すると転移が抑制されることが分かった。また、Notch シグナル伝達に不可欠の転写因子である Rbpj を恒常的にノックダウンした細胞の転移能も減少していた。これらの結果から *Aes* 遺伝子は Notch シグナルを抑制することで大腸がんの転移を阻害することが明らかとなった。

臨床標本においても、肝転移巣における AES の発現は同一患者の大腸癌原発巣よりも有意に低下していた (52 症例中 29 症例、56%)。さらに、原発巣における AES の発現消失が、血管内侵入及び肝転移と有意に相関することが分かった。これらのことから、ヒト大腸癌においても AES が遠隔転移を抑制していることが示唆された。

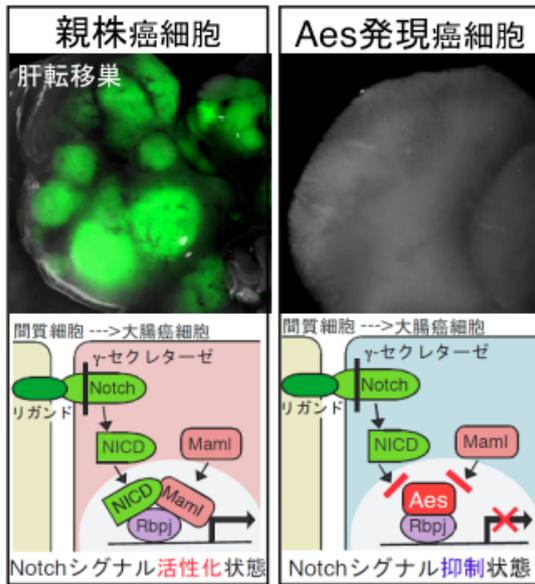


図1 Aes は Notch シグナルを抑制することで大腸がん転移を阻害する。

(2) CXCR3 がリンパ節転移の治療標的となる可能性の検討

本研究の開始までに、マウスメラノーマ細胞 B16F10 を同系マウスへ移植するモデルを用いて、リンパ節高転移性の B16F10 細胞では CXCR3 が発現していること、その発現を抑制するとリンパ節転移率が有意に減少することを見出し、*Cancer Research* 誌に報告した。そこで、CXCR3 とそのリガンドが大腸癌細胞のリンパ節転移に関与していることを示すために、ヒト大腸癌細胞 DLD-1 を用いた解析を行い、CXCR3 は大腸癌細胞のリンパ節転移をも促進すること、CXCR3 は転移先での腫瘍巣形成を促進することを明らかにした。また、臨床標本を用いた解析から CXCR3 を発現する大腸癌は予後が悪いことを見出し、これらの結果を *Oncogene* 誌に報告した。

また、リンパ節転移を最も容易に観察出来る B16F10 細胞を用いて転移先周辺組織の変化を検討したところ、癌をドレナージするリンパ節 (B16F10 を接種した C57BL/6 マウスの膝下リンパ節) においてはリンパ節辺縁洞が拡張すること、これら拡張した辺縁洞内へ癌細胞が流入してくる事を見出した。また、この周囲の T 細胞領域では正常リンパ節と比べ CXCL9、CXCL10 の発現が亢進することが分かった。さらに、これら CXCR3 リガンドはマクロファージやリンパ管内皮細胞に発現すること、原発巣におけるマクロファージはこれらのケモカインを発現せず、リンパ節特異的な発現上昇である事が示唆された。これらの結果から、リンパ節特異的に発現上昇したケモカイン CXCL9、CXCL10 がリンパ節辺縁洞に流入した CXCR3 発現癌細胞の生存、増殖を促進していると考えられた。

さらに、CXCR3 を介したシグナルを抑制す

ることで癌細胞のリンパ節転移を抑制出来る可能性を調べるため、B16F10 メラノーマ細胞を footpad へ移植したマウスに 2 種類の CXCR3 阻害薬 (TAK-779: 武田薬品、AMG-487: Amgen) を投与し、それぞれの効果を検討した。その結果、検討した CXCR3 阻害薬は膝下リンパ節への転移を抑制しうることを、これらの薬剤が転移巣における癌細胞の増殖を抑制していることが明らかとなった (図 2)。興味深いことに、CXCR3 阻害薬は原発巣の大きさには影響を及ぼさなかった。これらの結果は、癌細胞のリンパ節転移において CXCR3 シグナル経路が転移先での癌細胞の増殖に必須であることを示すと共に、CXCR3 阻害薬がリンパ節転移の予防・治療薬となりうる可能性を示唆している点で重要な知見であると考えられる。

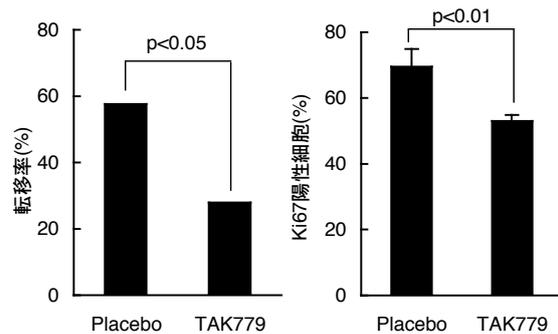


図2 CXCR3 阻害薬はメラノーマ細胞のリンパ節における増殖を抑制し、転移率を低下させる。

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)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Kawada, K., Hosogi, H., Sonoshita, M., Sakashita, H., Manabe, T., Shimahara, Y., Sakai, Y., Takabayashi, A., Oshima, M., Taketo, M.M. Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. *Oncogene* 査読有り, 2007, 26:4679-4688.
2. Guo, X., Oshima, H., Kitmura, T., Taketo, M.M., Oshima, M. Stromal fibroblasts activated by tumor cells promote angiogenesis in mouse gastric cancer. *J. Biol. Chem.* 査読有り, 2008, 283:19864-19871.
3. Oguma, K., Oshima, H., Aoki, M., Uchio, R., Naka, K., Nakamura, S., Hirao, A., Saya, H., Taketo, M.M., Oshima, M. Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor- α in gastric tumour cells. *EMBO J.* 査読有り,

2008, 27:1671-1681.

4. Fujishita, T., Aoki, K., Lane, H.A., Aoki, M., Taketo, M.M. Inhibition of the mTORC1 pathway suppresses intestinal polyp formation and reduces mortality in *Apc^{A716}* mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 査読有り, 2008, 105:13544-13549.

5. Aoki, K., Taketo, M. M. Tissue-specific transgenic, conditional knockout and knock-in mice of genes in the canonical Wnt signaling pathway. Methods Mol Biol. 査読有り, 2008, 468:307-31.

6. Kitamura, T., Biyajima, K., Aoki, M., Oshima, M., Taketo, M. M. Matrix metalloproteinase 7 is required for tumor formation, but dispensable for invasion and fibrosis in SMAD4-deficient intestinal adenocarcinomas. Lab Invest. 査読有り, 2009, 89:98-105.

7. Taketo MM. Role of bone marrow-derived cells in colon cancer: lessons from mouse model studies. J Gastroenterol. 査読有り, 2009, 44:93-102.

8. Taketo, M. M., Edelman, W. Mouse models of colon cancer. Gastroenterology. 査読有り, 2009, 136:780-98. Review.

[学会発表] (計 5 件)

1. Taketo, M. M., Novel Mechanism of Colon Cancer Invasion: Role of Bone-Marrow Derived Cells in *cis-Apc^{+/+}-Smad4^{-/-}* mice. Joint Metastasis Society-AACR Conference on Metastasis. Aug. 3-7, 2008, Vancouver, Canada

2. Taketo, M. M., Keynote Lecture "What animal models tell us about gastrointestinal carcinogenesis". Fifth International Society of Gastroenterological Carcinogenesis Conference. Aug. 31-Sep. 3, 2008, Oxford, UK

3. Taketo, M. M., Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling. Notch and Cancer Meeting Oct. 5-8, 2008, Athens, Greece

4. Taketo, M. M., Mouse Models for Colon Cancer Invasion and Metastasis. AACR Meeting "Mouse Models of Cancer. Jan. 12-15,

2009, San Francisco, CA, USA

5. Sumimasa Arimura, Masahiro Aoki, and Makoto Mark Taketo, Roles of Smoothed (Smo), the major signal transducer of the hedgehog pathway, in the development of intestinal tumors. 2008 AACR Annual Meeting. Apr. 15, 2008, San Diego, CA, USA

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: CXCR3 阻害剤を含有する医薬組成物

発明者: 武藤誠、河田健二

権利者: 国立大学法人京都大学

種類: 特許

番号: 2005219322

取得年月日: 2009 年 1 月 8 日

国内外の別: 外国 (オーストラリア)

[その他]

ホームページ

<http://www4.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 誠 (TAKETO MAKOTO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号: 70281714

(2) 研究分担者

青木 正博 (AOKI MASAHIRO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 60362464

北村 剛規 (KITAMURA TAKANORI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号: 10378622

園下将大 (SONOSHITA MASAHIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号: 80511857

三好 弘之 (MIYOSHI HIROYUKI)

研究者番号: 30362479

(3) 連携研究者

なし