

平成 21 年 4 月 6 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390369
 研究課題名（和文） 転移促進遺伝子CD151のヒト型抗体とRNA干渉によるテトラスパニンと転移の制御
 研究課題名（英文） Inhibition of metastasis and tetraspanin expression by the human monoclonal antibody directed to CD151 and RNA interference
 研究代表者
 三宅 正幸（MIYAKE MASAYUKI）
 財団法人田附興風会・医学研究所 第1研究部・研究員
 研究者番号：90250076

研究成果の概要： siRNA で、CD151 を中心としたインテグリン・テトラスパニン複合構成体を抑制、崩壊させることに成功した。さらに、CD151 のノックアウトを行った後に MRP-1/CD9、KAI1/CD82 の遺伝子治療によるカクテル療法を細胞株で行い、in vitro レベルでは、成功した。しかし、これらの細胞株を、ヌードマウスに生着させ、in vivo で数度のカクテル療法を行ったが、失敗に終わった。スキッドマウスでは、成功したので、この原因は、遺伝子導入におけるウイルスベクターの使用によるウイルス抗原に対する抗体の産生などによると考えた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
2008年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：(1)転移促進遺伝子 (2)CD151 (3)MRP1/CD9 (4)KAI1/CD82 (5)テトラスパニン
 (6)癌転移

1. 研究開始当初の背景

日本では、肺癌は癌の中でも癌死亡原因の第一位を占めるようになってきた。特にこのままの状態では2015年には年間12万人の罹患数にまで増加すると予測されている。しかしながら、大腸癌のようにその遺伝子異常の進行形態と生物学的悪性度との関係は、詳細には解明されていない。肺癌は早期から全身転移をきたしている傾向が強く、これが、その予後不良因子の大きな原因の一つとなっている。これらの点を踏まえ、我々は、**癌転移**

の抑制が肺癌治療において非常に大きな意義があると考え、細胞運動の抑制に関わる物質の同定に注目してきた。その手段として、細胞運動を抑制し、更には**転移能をも制御するモノクローナル抗体**を作製し、これらのエピトープを同定してきた。その結果、世界で最初に、細胞運動抑制因子である228個のアミノ酸配列からなる物質を見出し、これは当時 GenBank に登録されておらず、我々は **Motility Related Protein-1 (MRP-1)** と名付けた。その後、CD9 のクローニングによりこの両者が同一のもので、細胞表面の糖蛋白で

ある膜4回貫通型のテトラスパニンと呼ばれるファミリーに属する蛋白であるということが判明した。このMRP-1を様々な細胞にトランスフェクションした結果、その発現量と運動能は反比例し、MRP-1は細胞運動を抑制し、その認識抗体M31-15はnegativeに働く興味深い抗体であることが判明した。次に、高肺転移株BL6にトランスフェクションしたところ、BL6の運動能、肺転移数は著明に抑制され、転移抑制能も明確になった。中でも、我々から遅れること4年後サイエンス誌上に発表されたKAI1/CD82は同じファミリーに属し、前立腺癌の**転移抑制遺伝子**としての機能を持っていた。このテトラスパニンには、現在31種類の蛋白が同定されており、先に述べたように、MRP-1/CD9とKAI1/CD82の両者は固形癌の癌転移抑制遺伝子としての性格を有する。これまで我々は、この両者の減弱喪失が乳癌、肺癌、膵癌、大腸癌、食道癌等の転移と関連した**予後不良因子**であることを報告してきた。この両者は本来、正常細胞では広く発現しており、細胞接着、運動、シグナル伝達などに関わっているが、癌の進展・転移に伴ってその発現が減弱し、機能異常をきたしてくると考えられる。また、正常細胞ではインテグリン、HB-EGFやテトラスパニンの他のメンバー自身などと**複合構成体**を形成している。これまで我々は、MRP-1/CD9、KAI1/CD82とこれらとの複合構成体は、悪性度が進むほど崩壊消失していくことを発表してきた。つまり、癌化に伴って、これらの複合構成体はその正常な構造が崩壊していき、癌の悪性度が増すにつれ、一層その傾向が鮮明になってくる。その過程の中で転移能を獲得した細胞が発生して来るものと考えられる。ところが、このメンバーに属する**CD151**はこれら2者と異なり、癌の進展と共に細胞膜に出現し、インテグリンファミリー等と強固な複合構成体を構成していき、転移能を獲得し、**転移促進遺伝子**としての性格を持つことを発見した。

2. 研究の目的

MRP-1/CD9やKAI1/CD82とは逆にCD151を高発現させると、CD151はインテグリンファミリーと複合構成体を形成し、それにしたがって、前2者の複合構成体の崩壊を招いていくと考えられる。これまで我々は、癌転移抑制遺伝子MRP-1/CD9、KAI1/CD82のアデノウイルスを用いた遺伝子治療により、癌の転移を抑制することが出来ることを証明してきた。だが実際の治療に用いる場合、メラノーマの治療によってこれだけでは不十分であるということが明らかになった。癌転移促進遺伝子であるCD151を考慮せずに、**MRP-1/CD9、KAI1/CD82のみ**で治療を組み立てたことが、その原因の一つとして考えら

れたので、今回このCD151のノックダウンも同時に行う治療法を考えることにした。

3. 研究の方法

我々は、**MRP-1/CD9、KAI1/CD82**のアデノウイルスによる遺伝子治療だけでなく、CD151のヒト型抗体による抗体治療とRNA干渉によるノックダウンを同時に行うカクテル治療を考えた。まず合成siRNAでの実験結果を確認後、決定したsiRNA配列を元に、数種類のループ配列を組み入れたshRNA配列に対する合成オリゴDNA(shオリゴ)を作製した。この合成オリゴDNAを、RNA polymerase III系プロモーターを搭載したプラスミドベクター組み込み、臨床応用のためにより安定なshRNA発現プラスミドベクターを作製した。また、用いた抗CD151モノクローナル抗体は、我々のところで作製したHM10-8抗体である。更に、肺癌細胞株を用い、基礎的研究も同時に行い、これらの複合構成体全体が、実際のところどのような機能を有し、どのような機序で悪性化とともに、あるものは崩壊していき、あるものは構築されていくのか、詳細にしていった。

4. 研究成果

これまでに我々は、このMRP-1/CD9、KAI1/CD82のトランスフェクションにより増殖抑制がかかる癌細胞株が存在するのを見つけた。これらの株の場合、*in vivo*の治療実験でも同一の現象がおり、何らかの増殖機能を持つ下位遺伝子が存在する可能性が考えられた。そこで、DNAマイクロアレイを用いて、MRP-1/CD9やKAI1/CD82の欠損している母細胞と、これらをtransfectionした恒常発現株の遺伝子を比較することにより**下位遺伝子の発現**、及び、それへの**シグナル伝達機構**を調べて行き、**MRP-1/CD9、KAI1/CD82**の両者が遺伝子段階で**VEGF-A**の発現を制御することを発見した。これまで、一部の癌細胞で**転移抑制遺伝子**のトランスフェクションでありながら、**増殖も抑制される**という矛盾が観察されていた。**MRP-1/CD9、KAI1/CD82**による**VEGF-A**の発現制御は**増殖抑制作用**の一部の問題を解明したわけである。しかし、CD151のRNA干渉によるノックダウンを行っても、**VEGF-A**の発現制御は**成功しなかった**。また、Wntネットワークに対する機能でも、少なくとも**Wnt1**の抑制には**成功しなかった**。また、我々は、一部の複合構成体に対するモノクローナル抗体の作製に成功し、癌の増殖及び転移を抑制することを試みた。その結果、**CD151・インテグリン α 3**複合構成体に対する抗体は*in vivo*で、ある種の細胞株に対しては癌の増殖及び転移を抑制に成功した。さらに、CD151をRNA干渉でノックダウンすることで、CD151を

中心としたインテグリン・テトラスパニン複合構成体を抑制、崩壊させることに成功した。次に、CD151のノックアウトを行った後にMRP-1/CD9、KAI1/CD82の遺伝子治療によるカクテル療法を細胞株で行った。細胞株を用いた *in vitro* レベルでは、成功したので、これらの細胞株を、ヌードマウスに生着させ、*in vivo* で数度のカクテル療法を行ったが、失敗に終わった。免疫不全マウスであるスキッドマウスでは、成功したので、この原因は、遺伝子導入におけるウイルスベクターの使用によるウイルス抗原に対する抗体の産生などによるものと考えられた。そのため、通常の免疫能力を持った動物に対して頻回投与を行うことが困難である可能性が強く、その応用範囲に制限がある。そこで我々は、将来のヒトへの治療応用も考慮して、DNAを結合させたモノクローナル抗体によるイムノジーンによる遺伝子導入を行っていく予定である。

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) Okasaka, T., Usami, N., Mitsudomi, T., Yatabe, Y., Matsuo, K., and Yokoi, K. Stepwise examination for differential diagnosis of primary lung cancer and breast cancer relapse presenting as a solitary pulmonary nodule in patients after mastectomy. *J Surg Oncol.* 1; 98(7):510-514. 2008 査読有

(2) Sugiura, H., Yamada, K., Sugiura, T., Hida, T., and Mitsudomi, T. Predictors of survival in patients with bone metastasis of lung cancer.

Clin Orthop Relat Res. 466 (3):729-36. 2008 査読有

(3) Takeda, T., Hattori, N., Tokuhara, T., Nishimura, Y., Yokoyama, M., and Miyake, M.

Adenoviral Transduction of *MRP-1/CD9* and *KAI1/CD82* Inhibits Lymph Node Metastasis in Orthotopic Lung Cancer Model. *Cancer Res.* 67: 1744-1749. 2007 査読有

(4) Kawamura, J., Shimada, Y., Kitaichi, H., Komoto, I., Hashimoto, Y., Kaganoi, J., Miyake, M., Yamasaki, S., Kondo, K., Imamura, M.

Clinicopathological significance of aminopeptidase N/CD13 expression in human gastric carcinoma.

Hepatogastroenterology. 54 (73):36-40.

2007 査読有

(5) Tanaka, H., Yanagisawa, K., Shinjo, K., Taguchi, A., Maeno, K., Tomida, S., Shimada, Y., Osada, H., Kosaka, T., Matsubara, H., Mitsudomi, T., Sekido, Y., Tanimoto, M., Yatabe, Y., and Takahashi, T.

Lineage-specific dependency of lung adenocarcinomas on the lung development regulator TTF-1. *Cancer Res.*

1;67(13):6007-11. 2007 査読有

(6) Yanagisawa, K., Tomida, S., Shimada, Y., Yatabe, Y., Mitsudomi, T., and Takahashi, T.

A 25-signal proteomic signature and outcome for patients with resected non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 6;99 (11):858-67. 2007 査読有

(7) Fukui, T., Sakakura, N., Mori, S., Hatooka, S., Shinoda, M., Yatabe, Y., and Mitsudomi, T.

Controversy about small peripheral lung adenocarcinomas: how should we manage them? *J Thorac Oncol.* 2(6):546-52. 2007 査読有

(8) Suzuki, T., Matsuo, K., Hiraki, A., Saito, T., Sato, S., Yatabe, Y., Mitsudomi, T., Hida, T., Ueda, R., Tajima, K.

Impact of one-carbon metabolism-related gene polymorphisms on risk of lung cancer in Japan: a case control study.

Carcinogenesis. 28(8):1718-25. 2007 査読有

[学会発表] (計 2 件)

(1) Takeda, T., Hattori, N., Tokuhara, T., Takeda, S., M. Miyake.

Gene Transduction Of RhoA And ROCK-Dominant Negative Form Suppresses Lung Metastasis Of Melanoma. The 2008 International Conference of American Thoracic Society (ATS), 2008, 5, 16-21. Toronto, Canada

(2) Tokuhara, T., Hirai, T., Miyake, M. Suppression of metastasis by human-type monoclonal antibody recognizing aminopeptidase N. The Annual Meeting 2007 of American Association for Cancer Research, 2007. 4. 14-18. Los Angeles, California, U.S.A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 正幸 (MIYAKE MASAYUKI)

財団法人田附興風会・医学研究所 第1研究部・研究員

研究者番号: 90250076

(2)研究分担者

大政 貢 (OMASA MITSUGU)

財団法人田附興風会・医学研究所 第1研究
部・研究員

研究者番号：80379049

(3)連携研究者

光富 徹哉 (MITSUDOMI TETSUYA)

愛知県がんセンター・研究所・研究員

研究者番号：70209807