

平成 22 年 5 月 7 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790295

研究課題名（和文）新規開発ヒト腫瘍環境 3 次元モデルを用いた抗がん剤の最適適用診断

研究課題名（英文）Adaptation of the most suitable anticancer drug by utilizing new developed three-dimensional model mimicked human tumor microenvironment.

研究代表者

津田 真寿美（TSUDA MASUMI）

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30431307

研究成果の概要（和文）：生体内腫瘍環境特異的な癌細胞悪性化因子の解析を進める中で、口腔癌組織特異的に破骨細胞分化因子 RANKL が発現誘導されることを同定し、この RANKL が生体内での口腔癌の悪性度を増悪させる重要因子である可能性を見出した。また、高頻度に肺転移を引き起こすヒト滑膜肉腫をモデルにして、腫瘍細胞と血管内皮細胞との相互作用が腫瘍血管新生に極めて重要であること、また Src ファミリー阻害薬がこの血管新生を有効に抑制することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We identify receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) as a microenvironment-specific factor essential for tumorigenesis *in vivo*, utilizing oral squamous cell carcinoma as a model. In addition, in human synovial sarcoma that frequently occurs pulmonary metastasis, the interaction between the tumor and endothelial cells is important for tumor angiogenesis. Src family kinase inhibitor impaired this angiogenesis effectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：腫瘍生物学、実験病理学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：腫瘍微小環境、抗がん剤

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性腫瘍の治療領域において、近年の分子標的抗がん剤の開発や放射線療法の画期的な技術革新により、一部腫瘍においてはその効果が実証されてきている。しかしその一方で、*in vitro* 基礎研究で著明な抗腫瘍効果

を示した薬剤が、臨床治験において期待する効果を発揮しない事例も多い。

(2) この最大の原因は、腫瘍組織中の癌細胞は、腫瘍微小環境を構成する種々の間質細胞や液性因子との相互作用が要求されることから、単独培養された癌細胞とはその形質

が大きく解離しているためと考える。

(3) 従って、生体内で有効な癌治療法を開発するためには、多数の細胞内外分子と周囲微小環境が複雑に相互作用する腫瘍環境を正確に理解し、腫瘍組織としての癌の特性を理解することが極めて重要となる。

## 2. 研究の目的

上述 1.の現状を受け、本研究では、生体内腫瘍環境特異的な癌細胞悪性化因子を解析する。さらに、ヒト腫瘍組織環境を模倣化した *in vitro* 3次元培養システムを構築し、癌細胞と腫瘍微小環境の相互作用の分子機序を解明する。最終的に腫瘍組織として有効な新規治療標的分子を同定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究課題では、著明な局所浸潤像を示すヒト口腔癌細胞（平成20年度）とヒト滑膜肉腫細胞（平成21年度）を主たる研究対象とし、腫瘍細胞と腫瘍間質との相互作用が腫瘍の特性や悪性化に与える影響を解明した。また、各腫瘍組織において有効な抗がん剤の同定を試みた。

### (2) ヒト口腔組織特異的な癌抗原の同定

口腔扁平上皮癌は頭頸部領域の悪性腫瘍の中で最も頻度が高く、しばしば著明な局所浸潤能を示す。口腔扁平上皮癌が近接する顎骨に広範囲に浸潤した際には外科的骨離断術を施行せねばならず、術後の患者の **quality of life (QOL)** に多大なる影響を及ぼす。従って、こうした患者の QOL の保持・向上のためには、骨離断術に代わる非浸襲性保存的治療法の確立が急務となっている。

申請者らは、従前の研究により、破骨細胞分化因子 RANKL が、口腔癌細胞で発現していることを見出している。本研究では、この RANKL の発現メカニズムの解明、口腔癌の悪性化への関与、さらには抗がん剤の標的分子としての有用性を検討した。

① ヒト口腔癌病理組織を用いて、RT-PCR 法および免疫組織学的検索により、RANKL mRNA および蛋白質の発現の有無、および悪性度との相関を検討した。5 種類のヒト口腔癌細胞株における発現量においても同様に検索し、口腔癌組織と細胞株における発現量の相違を比較検討した。

② 口腔癌細胞株をヌードマウスの異なる部位に接種し、形成された腫瘍組織での RANKL の発現量を検討した。さらに、RANKL の発現量と腫瘍の悪性度との関連を、病理組織学的に検討した。

③ 上記②において、マウスに形成された腫瘍の悪性度が RANKL の発現に依存するか否かを確認するために、*in vitro* 3次元コラーゲンゲル環境内で RANKL 過剰発現口腔癌細胞を長期培養し、マウス腫瘍組織で認められた形質が再現されるかを検討した。

④ 上記③で認められた細胞形質がどのようなメカニズムによって誘導されるのかを検討した。

⑤ 上記の結果を総合的に判断し、RANKL が口腔癌の治療標的分子として有用か否かを検討した。

### (3) ヒト滑膜肉腫における新規治療標的分子の同定とその抑制効果

滑膜肉腫は若年者の四肢関節近傍に頻発する悪性軟部腫瘍で、高頻度に肺や骨髄へ転移する。現在、治療法としては、外科的切除に加え、化学療法や放射線療法が併用されているが、依然として予後不良であり、より有効な新規治療法の確立が必要とされている。

申請者らは、従前の研究により、滑膜肉腫の細胞内ではチロシンキナーゼ Src の活性が亢進していること、*in vitro* 実験系において Src family kinase (SFK) 阻害薬 PP2 が滑膜肉腫細胞の増殖能および運動能を抑制することを明らかとしてきた。本研究では、マウスにおいて全身投与可能な SFK 阻害薬 SU6656 を用いて、マウス xenograft における本薬剤の腫瘍抑制効果、特に腫瘍の生存や増殖、遠隔転移に重要な役割を果たしていると考えられる腫瘍周囲血管新生に対する SU6656 の抑制効果を検討した。最終的に、*in vivo* 滑膜肉腫において、SFK が有効な抗腫瘍効果を発揮するターゲット分子になり得るかを検討した。

① ヒト滑膜肉腫細胞株をヌードマウスの皮下に接種後、SFK 阻害剤 SU6656 を腹腔内投与し、腫瘍形成および周囲組織への浸潤における抑制効果を検討した。

② 上記①で形成された腫瘍において、血管内皮細胞に対するマーカーである CD31 に対する抗体を用いて免疫染色を行い、腫瘍新生血管数および管腔構造形成における SU6656 の抑制効果を検討した。

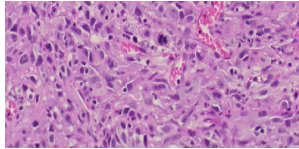
③ 上記②において認められた SU6656 による腫瘍血管新生抑制効果が、どのようなメカニズムによって誘導されるのかを検討した。

④ 上記の結果を総合的に判断し、SFK 阻害薬が滑膜肉腫に対する抗がん剤として有用か否かを検討した。

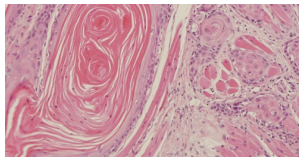
#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト口腔組織特異的な癌抗原の同定

- ①ヒト病理組織検索では、高悪性度の癌ほどRANKLの発現量が高く、かつ浸潤部での高発現が確認された。一方、RANKLは細胞培養条件下では発現が抑制されていることから、cell autonomousな増殖・生存等には不要であった。

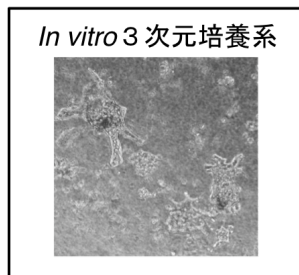


低分化型口腔癌 (RANKL 高発現)



高分化型口腔癌 (RANKL 低発現)

- ②*in vitro*において発現の認められなかった培養細胞を、マウスに移植するとRANKLの発現が再現された。この発現誘導は口腔内環境に特異的であり、腫瘍の増殖能力とも関連した。
- ③RANKLを人為的に過剰発現させた口腔癌細胞株は、*in vitro* 3次元コラーゲンゲル内において高浸潤性の増殖像を示し*in vivo*マ



*In vitro* 3次元培養系

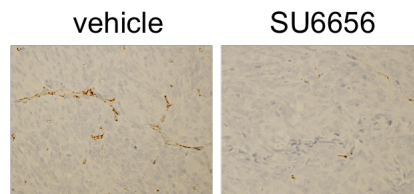
ウス生体内における腫瘍特性と一致した。

- ④RANKLはインテグリンの発現誘導を介してコラーゲンへの接着性を増強させることが明らかとなった。従って、癌細胞が周囲にコラーゲンが多い環境に適応し、コラーゲンへの接着性を増強する上で必要な分子であると予想された。RANKLは細胞膜表面に局在する分子であるため、腫瘍微小環境の変化を感知するセンサーとして機能している可能性も高い。
- ⑤RANKLと拮抗的に作用するOPG (osteoprotegerin)は、コラーゲン存在下特異的に口腔癌細胞の接着性を抑制した。以上

の結果から、RANKLは口腔癌組織特異的に発現誘導される癌抗原であり、口腔癌の悪性度を増悪させる重要因子である可能性を見出した。従って、RANKLは口腔癌の有用な治療標的分子となり得ると期待される。

##### (2) ヒト滑膜肉腫における新規治療標的分子の同定とその効果

- ①ヒト滑膜肉腫細胞株Fuji細胞をヌードマウスの皮下に接種したxenograftモデルでは、SFK阻害薬SU6656の腹腔内投与により腫瘍形成および周囲組織への浸潤が有意に抑制された。
- ②上記①において形成された腫瘍組織において、コントロール群では腫瘍表面での血管新生が旺盛なのに対し、SU6656投与群ではこれが抑制されていた。また、摘出した腫瘍組織をCD31に対する抗体で免疫染色したところ、コントロール群に比べてSU6656投与群では血管管腔構造形成の抑制が認められた。



抗CD31抗体による血管内皮細胞の免疫染色 (茶褐色部分が血管管腔構造)

- ③上記で形成された腫瘍において、コントロール群ではヒト血管内皮細胞増殖因子VEGFのmRNAが豊富に検出されたのに対し、SU6656投与群ではこれが抑制されていた。また、滑膜肉腫細胞の培養上清は、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)の走化能を促進させたが、SU6656処理後はこれが有意に低下した。これにより、ヒト滑膜肉腫細胞が血管内皮細胞を腫瘍組織へ導引するために積極的にVEGFを分泌している可能性が示唆された。
- ④以上の結果から、SFK阻害剤は滑膜肉腫細胞の増殖能・運動性を抑制するのみならず、腫瘍血管新生抑制作用を有していることが明らかとなった。従って、本薬剤は滑膜肉腫の治療において極めて有効であると期待される。

#### 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. T. Watanabe, †M. Tsuda, S. Tanaka, Y. Ohba, H. Kawaguchi, T. Majima, H. Sawa, & A. Minami. The adaptor protein Crk induces Src-dependent activation of p38 MAPK in regulation of synovial sarcoma cell proliferation. *Mol. Cancer Res.* 7(9):1582-92 (2009) †, 研究代表者が corresponding author 【査読有】
2. T. Watanabe, M. Tsuda, Y. Makino, T. Konstantinou, H. Nishihara, T. Majima, A. Minami, S. Feller, & S. Tanaka. Crk adaptor protein induced-phosphorylation of Gab1 on tyrosine 307 via Src is important for organization of focal adhesions and enhanced cell migration. *Cell Res.* 19(5): 638-650 (2009) 【査読有】
3. T. Inuzuka, M. Tsuda, H. Kawaguchi, Y. Higashi, & Y. Ohba. Integral role of transcription factor 8 in the negative regulation of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 69(4): 1678-1684 (2009) 【査読有】

〔学会発表〕（計 23 件）

1. Yamada T, Tsuda M, Kawaguchi H, Totsuka Y, Shindoh M, Ohba Y: RANKL expression induced by the tumor microenvironment promotes epithelial mesenchymal transition and tumor progression *in vivo* The 8<sup>th</sup> Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association (Hawaii, USA, 2/5-9, 2010)
2. Arai R, Tsuda M, Watanabe T, Kawaguchi H, Minami A, Ohba Y : Effect of Src family kinase inhibitor on proliferation and invasion in human synovial sarcoma *in vivo*. 第 3 2 回日本分子生物学会年会、横浜、12/9-12. 2009
3. Yamada T, Tsuda M, Totsuka Y, Shindoh M, Ohba, Y : Requirement for tumor microenvironment-induced RANKL expression in the tumororigenesis *in vivo*. 第 6 8 回日本癌学会総会、横浜、10/1-3. 2009
4. Tsuda M, Watanabe T, Ohba Y, Tanaka S: Development of synovial sarcoma-like tumors in *SYT-SSX1* transgenic *p53* mutant mice. 第 6 7 回日本癌学会学術総会、名古屋、10/28-30. 2008

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.hokudai.ac.jp/~clilab-w/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

津田 真寿美 (TSUDA MASUMI)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：30431307

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：