

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592134

研究課題名（和文） RCAS1 をターゲットとした新たな癌分子標的治療開発に関する研究

研究課題名（英文） Novel cancer therapeutic strategies to target RCAS1

研究代表者

園田 顕三（SONODA KENZO）

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：30294929

研究成果の概要（和文）：

計 15 種類の悪性腫瘍での臨床的予後因子である RCAS1 は正常組織から悪性腫瘍への悪性転化シークエンスにおいてその発現頻度が増加し、複数の悪性腫瘍における分化度、腫瘍径、臨床進行期、浸潤、脈管侵襲、リンパ節転移等と有意な相関を示す。臨床的に腫瘍マーカーとして有用でありアポトーシスを誘導する生物活性を有する RCAS1 は biomarker であるが、生体免疫機構からの逃避と腫瘍間質リモデリングを介して腫瘍進展に寄与していると考えられる。RCAS1 は悪性腫瘍の特性を表現する重要な分子であり、悪性腫瘍に対する標的治療における新たなターゲットとなり得ることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

RCAS1 can induce apoptosis in immune cells including peripheral lymphocytes and natural killer cells after converted to a secreted type by ectodomain shedding. Because RCAS1 not only helps tumor cells to evade immune surveillance but also induces cancer stromal tissue remodeling, RCAS1 is believed to exaggerate aggressive characteristics of human malignancies. Clinically, RCAS1 expression correlates with several pathological variables including tumor size, stage, invasion depth, and lymph node metastasis and is a negative predictor of overall survival in 15 different kinds of cancer. Novel therapeutic strategies against cancer are now under development by targeting an intriguing biomarker RCAS1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、産婦人科学

キーワード：RCAS1、リンパ球アポトーシス、腫瘍間質組織、血管新生、ectodomain shedding、悪性腫瘍、治療標的分子

1. 研究開始当初の背景

RCAS1 は本研究代表者により子宮頸癌細胞株 (SiSo 細胞) から単離された分子で、末梢血 T リンパ球を含む RCAS1 受容体発現細胞にアポトーシスによる細胞死を誘導する。また、ア

ミノ酸 N 末端が細胞内に、C 末端が細胞外に位置した II 型の膜タンパクであり、分泌される際には C 末端に存在する coiled-coil 構造で oligomer を形成する。RCAS1 に関してこれまでに 140 を超える科学論文報告があり、

脳腫瘍、口腔癌、肺癌、胸膜悪性中皮腫、食道癌、胃癌、膵癌、胆嚢癌、胆管癌、大腸癌、消化管間葉系腫瘍、前立腺癌、腎癌、子宮頸癌、子宮体癌を含む計 15 種類の悪性腫瘍での臨床的予後因子であることが報告されている。RCAS1 は正常組織から悪性腫瘍への悪性転化においてその発現頻度が増加し、上述した悪性腫瘍の分化度、腫瘍径、臨床進行期、浸潤、脈管侵襲、リンパ節転移と有意な相関を示すことが認められた (Sonoda K *et al. Front Biosci* 2008; 13; 1106-1116)。RCAS1 は受容体発現細胞にアポトーシスを誘導するが (Nakashima M, Sonoda K *et al. Nat Med* 1999; 5: 928-942)、臨床検体を使用した TUNEL 法による検討では子宮頸癌・体癌に発現する RCAS1 に相関して腫瘍周囲リンパ球にアポトーシスが誘導されていた (Sonoda K *et al. Gynecol Oncol* 2005; 97: 772-779)。同様の知見は脳グリオーマ、口腔癌、肺癌、乳癌、食道癌、胃癌、胆管癌、大腸癌でも得られており、RCAS1 を介して腫瘍細胞が生体内の免疫監視機構から逃避することによって腫瘍の進展に寄与することが想定される。RCAS1 は分泌型となり子宮頸癌では腔分泌液内に検出されるが (Sonoda K *et al. Cancer* 1996; 77: 1501-1509)、子宮癌および卵巣癌患者血清中には健常者に比し高濃度の RCAS1 が分泌され、RCAS1 値の推移は治療後臨床経過と相関することが示された (Sonoda K *et al. Gynecol Oncol* 2006; 103: 924-931, Sonoda K *et al. Oncol Rep* 2007; 17: 623-628)。さらに、子宮癌患者での末梢血リンパ球数が血清 RCAS1 濃度に逆相関して減少していた。これらの結果から、RCAS1 は婦人科癌患者血清中に存在し、臨床的には腫瘍マーカーとして有用であり、アポトーシスを誘導する生物活性を有することから biomarker であることが証明された。RCAS1 が腫瘍マーカーとして有用であるという知見は、これまでに、肺癌、胸膜悪性中皮腫、膵癌、胆嚢癌、胆管癌、パジェット病でも得られている。RCAS1 はアポトーシス誘導以外にも、血管新生によって *in vivo* 腫瘍増殖を促進することが認められた (Sonoda K *et al. Cancer* 110:1979-1990)。実際に子宮頸癌サンプルを使用した解析でも、RCAS1 発現と血管新生因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) 発現および微小血管数が有意な相関を示すことが確認された。これらの結果から、RCAS1 が腫瘍増殖促進や腫瘍・間質相互作用において間質の質的变化を誘導することが考えられるが、子宮頸癌では腫瘍細胞での RCAS1 発現と matrix metalloproteinase-1 発現、laminin-5 発現が相関する一方で、腫瘍間質での vimentin 陽性細胞数の減少が確認された (Sonoda K *et al. Gynecol Oncol* 2005; 99: 189-198)。以上の結果をまとめると、RCAS1

がヒト悪性腫瘍の特性を表現する重要な分子であることが理解される。

2. 研究の目的

上述した研究背景を踏まえて、本研究では

- (1) RCAS1発現が腫瘍間質微小環境に及ぼす影響に関する解析
- (2) RCAS1の分泌機構の解析
- (3) RCAS1をターゲットとした新たな癌分子標的治療の開発

を行うことを目的とした。

RCAS1 研究は本研究代表者の研究から端を発した、我国のオリジナルな研究である。これまでの基礎医学的研究成果は、その究極の目的である RCAS1 を標的とする新たな癌治療の開発を目的として積重ねられてきた。現在の医学研究のトレンドは、「ベンチからベッドへ」という標語に表現されるように基礎医学研究の成果がトランスレーショナルな臨床応用研究へと発展することが重要視されている。従来の癌治療法では十分に満足出来る程には癌治療の成績は向上しておらず、今後とも新たな治療法開発へ情熱を捧げることを継続しなければならない。RCAS1 研究が対癌戦略における基礎研究と臨床研究の架け橋となり、癌患者予後を改善し得る新たな対癌治療法の樹立に帰結することが本研究の究極の目的である。

3. 研究の方法

(1) RCAS1発現が腫瘍間質微小環境に及ぼす影響に関する解析：RCAS1が子宮頸癌間質組織の質的变化を誘導することから、卵巣癌でも同様の所見が得られるか否か免疫組織染色法を用いて後方視的解析を行った。

(2) RCAS1の分泌機構の解析：RCAS1を発現・分泌する子宮頸癌由来SiSo細胞とRCAS1を発現するが分泌しない乳癌由来MCF-7細胞を用いて、RCAS1の分泌およびアポトーシス誘導機構に関して解析を行った。

(3) RCAS1をターゲットとした新たな癌分子標的治療の開発：①抗RCAS1抗体でRCAS1を免疫沈降により除去する試み、②RCAS1特異的siRNA導入によるRCAS1発現抑制の試み、③RCAS1のsheddingに関与するprotease機能抑制の試みに関する有用性につき検討した。

4. 研究成果

(1) RCAS1 発現が腫瘍間質微小環境に及ぼす影響に関する解析：65例の上皮性悪性卵巣腫瘍組織を用いた検討では、47例(陽性率72%)にRCAS1発現を認めた。RCAS1発現は年齢($P=0.0316$)および組織型($P=0.0014$)と有意な相関を示し、粘液性腫瘍において高頻度の発現を認めた。腫瘍間質のビメンチン陽性細胞数はRCAS1発現に相関して減少してお

り ($P=0.0001$)、特に粘液性腫瘍において顕著であった ($P=0.0287$)。 *in vitro* 実験系で線維芽細胞 L cell を RCAS1 で刺激することによって細胞増殖抑制効果 ($P=0.0249$) とウェスタンブロット法でのビメンチン発現低下を認めた。以上から、RCAS1 は卵巣癌のビメンチン陽性細胞数を減少させることによって腫瘍間質のリモデリングを誘導することが示唆された。本研究結果は Sonoda K *et al.* *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19: 838-843 にて論文発表を行った。

(2) RCAS1 の分泌機構の解析：

RCAS1 を発現・分泌する SiSo 細胞を TPA、IL-1 β 、anisomycin、sorbitol、H₂O₂、UV、EGF、endothelin、thrombin により刺激すると RCAS1 分泌が亢進した。この結果から phorbol ester により PKC- δ を介した PKC- δ pathway、Ras-MAPK pathway、GPCR 以降の transactivation pathway を介して RCAS1 が分泌されることが明らかとなった。RCAS1 を発現するが分泌しない MCF-7 細胞では受容体発現細胞 K562 にアポトーシスが誘導されず、分泌型 RCAS1 濃度依存性にアポトーシスが誘導された。これらの結果から RCAS1 は ectodomain shedding 機構により膜型から分泌型に変換されることによってアポトーシス誘導活性を獲得することが示された。生体の発生、分化、組織の生理学的機能維持に関わる growth factor、interleukin、tumor necrosis factor、Fas ligand 等の分子は、ectodomain shedding 機構により細胞膜から切断され分泌型として機能することから、RCAS1 がこれらの分子同様に生体にとって重要な分子であることが想定された。本研究結果は Sonoda K *et al.* *Exp Cell Res* 2010; 316: 1795-1803 にて論文発表を行った。

(3) RCAS1 をターゲットとした新たな癌分子標的治療の開発：

これまでの研究成果に基づき、RCAS1 をターゲットとした分子標的治療の開発を開始した。

①RCAS1 抗体を用いた RCAS1 機能抑制：子宮頸癌、子宮体癌および卵巣患者血清を用いた *in vitro* 実験系では血清中に存在する RCAS1 により RCAS1 受容体発現 K562 細胞の細胞増殖抑制効果が WST-1 法を用いた解析によって認められた。抗 RCAS1 モノクローナル抗体を使用し RCAS1 を免疫沈降除去することにより K562 細胞の細胞増殖抑制効果が減弱したことから、抗体が分子標的治療として有用であることが示唆された。

②RCAS1 の発現を抑制する特異的 RNA 干渉：腎線維芽細胞 COS-7 に RCAS1 遺伝子を導入することで、ヌードマウス上での腫瘍径の増大、血管新生因子である VEGF の発現増加を誘導することを明らかにした。一方で、RCAS1 発現を特異的に抑制する siRNA を SiSo および

子宮体癌由来 HOUA 細胞株に導入したところ増殖抑制効果を認めた。以上より RCAS1 特異的 RNA 干渉が分子標的治療として有用であることが示唆された。

③RCAS1 の shedding に関与する protease および細胞内シグナル伝達機構の阻害：RCAS1 が分泌型に変換されることによってアポトーシス誘導活性を獲得する結果から、shedding に関与する protease の機能阻害が有効であることが示唆された。

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 10 件)

- ① Kenzo Sonoda.
RCAS1 is a promising therapeutic target against cancer: its multifunctional bioactivities and clinical significance. *Expert Review of Obstetrics and Gynecology*. 2012; 7 (3): 123-129.
(査読有)
- ② 園田顕三.
RCAS1 分子を標的とした婦人科がん治療法の開発.
産婦人科の実際「特集：婦人科悪性腫瘍の治療開発とそのシーズ」. 2012; 61(2): 229-234.
(査読無)
- ③ Kenzo Sonoda.
Novel therapeutic strategies to target RCAS1, which induces apoptosis via ectodomain shedding. *Histology Histopathology*. 2011; 26: 1475-1486.
(査読有)
- ④ 園田顕三、和氣徳夫.
婦人科がん と Molecular Biology-Overview.
産科と婦人科「特集：婦人科がんの Molecular Biology」. 2011; 78 (1): 21-26.
(査読無)
- ⑤ Tatsuhiro Ohgami, Kiyoko Kato, Hiroaki Kobayashi, Kenzo Sonoda, Takafumi Inoue, Shinichiro Yamaguchi, Tomoko Yoneda, Norio Wake.
Low-dose mithramycin exerts its anti-cancer effect via the p53 signaling pathway and synergizes with nutlin-3 in gynecologic cancers.

Cancer Science. 2010; 101: 1387-1395.
(査読有)

- ⑥ Shinji Ogawa, Hiroaki Kobayashi, Satoshi Amada, Hideaki Yahata, Kenzo Sonoda, Koichiro Abe, Shingo Baba, Masayuki Sasaki, Tsunehisa Kaku, Norio Wake.
Sentinel node detection with ^{99m}Tc phytate alone is satisfactory for cervical cancer patients undergoing radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy.
International Journal of Clinical Oncology. 2010; 15: 52-58.
(査読有)
- ⑦ Kenzo Sonoda.
Expression of activated signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) as a predictor of poor prognosis in cervical cancer. Expert Review of Obstetrics and Gynecology. 2010; 5 (2): 161-164.
(査読有)
- ⑧ Kenzo Sonoda, Shingo Miyamoto, Manabu Nakashima, Norio Wake.
Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells induces apoptosis via ectodomain shedding. Experimental Cell Research. 2010; 316: 1795-1803.
(査読有)
- ⑨ Kenzo Sonoda, Shingo Miyamoto, Hiroaki Kobayashi, Shinji Ogawa, Kaoru Okugawa, Shuichi Taniguchi, and Norio Wake.
The level of RCAS1 expression is inversely correlated with the number of vimentin-positive stromal cells in epithelial ovarian cancer. International Journal of Gynecological Cancer. 2009; 19 (5): 838-843.
(査読有)
- ⑩ Hiroshi Yagi, Fusanori Yotsumoto, Kenzo Sonoda, Masahide Kuroki, Eisuke Mekada, Shingo Miyamoto.
Synergistic anti-tumor effect of paclitaxel with CRM197, an inhibitor of HB-EGF, in ovarian cancer. International Journal of Cancer. 2009; 124: 1429-1439.
(査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 西中川 拓也、遠城寺 宗近、園田 顕三、中島 学
RCAS1による細胞死誘導機構の解析
第 69 回日本癌学会
2010 年 9 月 24 日
大阪市
- ② Kenzo Sonoda
New therapeutic modalities by targeting RCAS1 which induces apoptosis via ectodomain shedding mediated by ADAM9
Molecular targets and cancer therapeutics
2009 年 11 月 18 日
米国ボストン市
- ③ 西中川 拓也、遠城寺 宗近、園田 顕三、中島 学
RCAS1による細胞死誘導機構の解析
第 68 回日本癌学会学術総会
2009 年 10 月 1 日
横浜市
- ④ Kenzo Sonoda, Shingo Miyamoto, Manabu Nakashima, Hiroaki Kobayashi, Eisuke Mekada, Norio Wake
RCAS1 induces apoptosis in cells expressing its putative receptor via ectodomain shedding mediated by ADAM9
100th Annual Meeting of American Association for Cancer Research
2009 年 4 月 19 日
米国デンバー市
- ⑤ 園田顕三、宮本新吾、小林裕明、和氣徳夫
RCAS1のshedding分泌機構におけるkey protease同定解析
第 61 回日本産科婦人科学会
2009 年 4 月 5 日
京都市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/gynob/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

園田 顕三 (SONODA KENZO)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：30294929

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし