

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 5月25日現在

機関番号：16101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22700882
 研究課題名（和文） 悪性胸膜中皮腫の浸潤に注目した治療標的分子の網羅的探索研究
 研究課題名（英文） Genome-wide exploration of molecular targets for invasion of malignant pleural mesothelioma cell

研究代表者
 柿内 聡司（KAKIUCHI SOJI）
 徳島大学・病院・講師
 研究者番号：50380100

研究成果の概要（和文）：悪性胸膜中皮腫の浸潤にかかわる分子を同定するため、まず高浸潤能を有する細胞株を樹立し、親株と遺伝子発現プロファイルを比較することによって、浸潤にかかわる可能性のある遺伝子群を抽出した。うち、複数株で親株と比較し発現抑制のみられた遺伝子 X に注目した。遺伝子 X の発現抑制で増殖能、遊走能に変化はないものの浸潤能が亢進し、in vivo においても同所移植モデルマウスの生存期間が短縮し、遺伝子 X が膜性胸膜中皮腫の格好の標的分子となりえる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Genome wide gene expression analysis was performed to compare the human malignant mesothelioma (MPM) cells and their derived cells which had higher invasive capacity. Among the dozens of candidate genes, we focused on gene X, which was commonly down-regulated among highly invasive cells. By knocking down of gene X, invasiveness was accelerated, but proliferation and migration activities were not changed in parental cells. In orthotopic implantation model of MPM, the survival was statistically significantly shorter in gene X knock down group than scramble group, suggesting that gene X might be a target gene for a new treatment against the invasion of MPM.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-------------|-----------|-------------|
| 2010年度 | 1,600,000 円 | 480,000 円 | 2,080,000 円 |
| 2011年度 | 1,400,000 円 | 420,000 円 | 1,820,000 円 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 円 | 900,000 円 | 3,900,000 円 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：悪性胸膜中皮腫、浸潤、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫は主にアスベスト暴露を原因として胸膜に発生する悪性腫瘍で、過去のアスベスト使用量と発症に要する期間との関係から今後急増が危惧されている。

本疾患は遠隔臓器への転移は比較的稀で、

周辺臓器への浸潤を特徴とする。周辺臓器への浸潤は病期の進行だけでなく、拘束性障害による呼吸困難や疼痛などにより QOL を阻害する主たる要因である。

本疾患に対しては胸膜肺全摘術、放射線療法、化学療法もしくはこれらを組み合わせた

集学的治療が行われているが、その成績は十分なものではなく、新たな治療法の開発が急務となっている。

2. 研究の目的

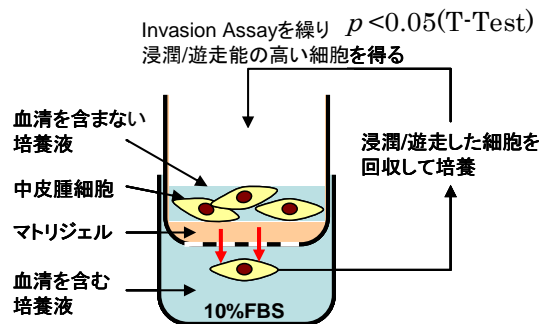
本研究は悪性胸膜中皮腫の特徴である“浸潤”に注目し、悪性胸膜中皮腫細胞の周辺臓器への浸潤に関わる分子を同定し、そのメカニズムの解明と浸潤を標的とした新たな治療法開発を目的としている。

3. 研究の方法

1) *in vitro* selection 法による高浸潤能を有する悪性胸膜中皮腫細胞株の樹立

まず、悪性胸膜中皮腫細胞の浸潤のメカニズムの解明のため、*in vivo* で造腫瘍能のあるヒト悪性胸膜中皮腫細胞 MSTO-211H, NCI-H290, Y-Meso-14 をもちいて invasion assay を行い、マトリジェルを浸潤し遊走した細胞を回収、培養し、これを3~5回繰り返すことによって親株と比較し浸潤能の高い細胞株(MSTO-211H/Inv3, NCI-H290/Inv5, Y-Meso-14/Inv3)を樹立した(図1)。この手法を *in vitro* selection 法と名付けた。

図1 *in vitro* selection 法による高浸潤株の作成



2) 網羅的遺伝子発現解析による悪性胸膜中皮腫細胞の浸潤能に関係する遺伝子群の同定

次に、高い浸潤能の原因となる分子を網羅的に探索するため、Affimetrix Gene Chip (Human Genome U133A 2.0 Array) をもちいて3組の親株と高浸潤能を有する子株の遺伝子発現プロファイルを比較し、発現の変動している遺伝子抽出した。

3) 候補遺伝子の機能解析

抽出された複数の浸潤関連候補遺伝子について安定高発現株、安定発現抑制株を作成し、*in vitro* での増殖能、浸潤能、および *in vivo*

で造腫瘍能や組織学的所見などを親株と比較した。

4) 臨床検体での検討

ここまでの検討で悪性胸膜中皮腫の浸潤との関与が示唆された分子について、臨床検体を用いてその発現を免疫染色にて確認し、予後との相関を検討した。

4. 研究成果

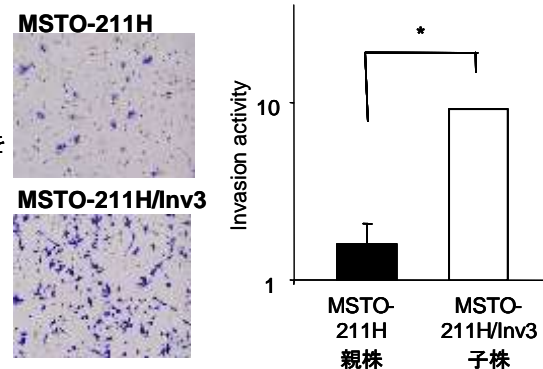
1) *in vitro* selection による高浸潤能を有する悪性胸膜中皮腫細胞株の樹立

invasion assay を繰り返すことによって得られた、親株と比較し浸潤能の高い細胞株(MSTO-211H/Inv3, NCI-H290/Inv5,

Y-Meso-14/Inv3)は invasion assay にて親株に比し、3, 2-9.4 倍の浸潤能を示した(図2)。

一方、樹立した高浸潤能を有する細胞株は親株と比較し、*In vitro* で増殖能に差はなかった(MTT アッセイ、data not shown)。

図2 invasion assay でマトリジェルを超え浸潤した MSTO-211H(親株)と MSTO-211H/Inv3 (*in vitro* selection で作成した高浸潤株)



2) 網羅的遺伝子発現解析による悪性胸膜中皮腫細胞の浸潤能に関係する遺伝子群の同定

Affimetrix Gene Chip (Human Genome U133A 2.0 Array) をもちいて親株と比較し高真珠株で発現の変動している244遺伝子を同定した。うち、3組で共通でした発現変動の見られた遺伝子はなく、2組の細胞株(Y-MESO-14, NCI-H290 およびその子株)で共通して、親株と比較し高浸潤株で発現が低下していた遺伝子 X を以下の対象とした(現在論文未投稿につきここでは X とする)。

3) 候補遺伝子の機能解析

遺伝子 X は悪性腫瘍との関連の報告は少ないが、TIMP3 など細胞外マトリクス関連分子

との Interaction が報告されており、ECM remodeling への関与が示唆された。また angiogenesis antagonist との報告もあり、血管新生への関与も示唆される遺伝子である。

まず、NCI-H290 に shRNA 導入にて遺伝子 X 安定発現抑制株を作成した。Scramble と比較して遊走能の変化ないが、浸潤能が有意に亢進し、%Invasion が約 6 倍まで上昇がみられた(図 3)。

図 3 遺伝子 X 発現抑制による浸潤能の亢進

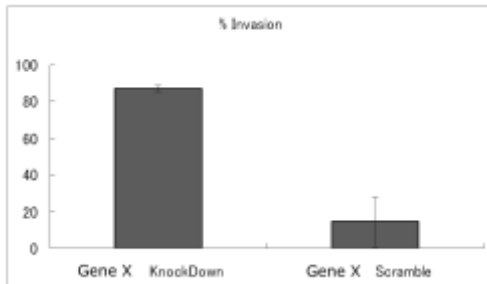
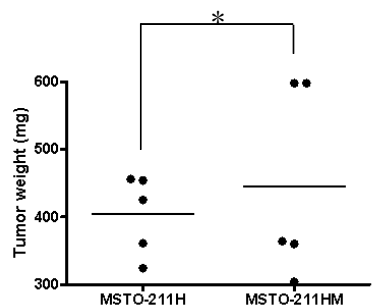
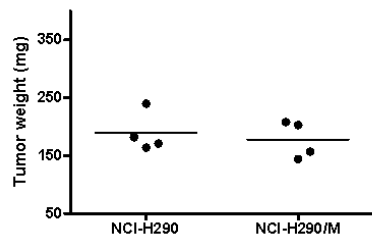
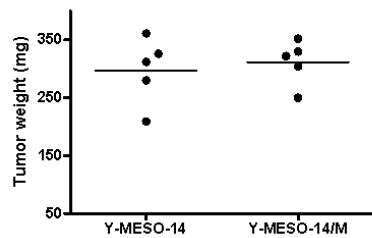
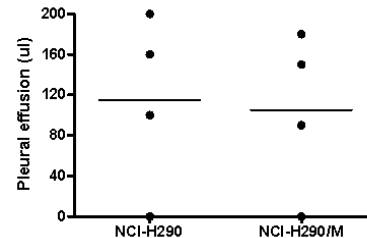
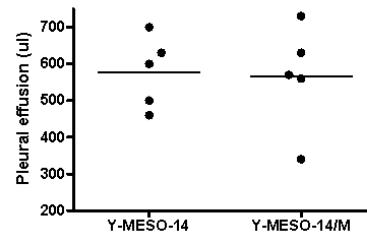


図 4 同所移植 MPM モデルマウスにおける親株と遺伝子 X 発現抑制株の造腫瘍能・胸水貯留量

A. Tumor weight

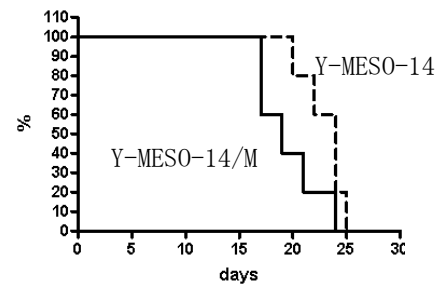


B. Pleural effusion



* MSTO-211H は胸水産生せず。

図 5 同所移植 MPM モデルマウスにおける親株接種群と遺伝子 X 発現抑制株接種群の生存期間



SCID マウスへの同所移植では Y-MESO-14、NCI-H290 の両株の遺伝子 X 発現抑制株

Y-MESO-14/M、NCI-H290/M において腫瘍重量、胸水量に有意差は見られなかったが、有意に生存期間が短縮することを確認した(図 4, 5)。

In vivo で浸潤能を定量的に評価することは困難だが、浸潤部位での RhoC などの細胞運動関連遺伝子や PLAU などの ECM リモデリングにかかわる遺伝子の発現亢進を認め、浸潤能の亢進が示唆された (data not shown)。

なお、遺伝子 X の発現が親株、子株間で変化のなかった MSTO-211H については遺伝子 X の発現抑制によって造腫瘍能の亢進を認め

た。臨床検体における遺伝子 X のコードする蛋白 X の発現を免疫染色にて確認したところ、上皮型 MPM より肉腫型 MPM で発現が高頻度である傾向が見られたが有意ではなかった。予後との相関に関しては現在検討中である。

以上より、さらなる検討が必要ではあるが、遺伝子 X は悪性胸膜中皮腫の浸潤にかかわることが示され、治療標的分子としての可能性が示唆された。

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 8 件)

- 1) Miyake K, Tani K, Kakiuchi S, Suzuka C, Toyoda Y, Kishi J, Tezuka T, Yuasa S, Hanibuchi M, Aono Y, Nishioka Y, Sone S. Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (gefitinib) augments pneumonitis, but attenuates lung fibrosis in response to radiation injury in rats. 査読あり J Med Invest. 2012;59(1-2):174-85.
- 2) Dat le T, Matsuo T, Yoshimaru T, Kakiuchi S, Goto H, Hanibuchi M, Kuramoto T, Nishioka Y, Sone S, Katagiri T. Identification of genes potentially involved in bone metastasis by genome-wide gene expression profile analysis of non-small cell lung cancer in mice. Int J Oncol. 査読あり. Epub 2012 Jan 27S DOI: 10.3892/ijo.2012.1348.
- 3) Gabr AG, Goto H, Hanibuchi M, Ogawa H, Kuramoto T, Suzuki M, Saijo A, Kakiuchi S, Trung VT, Sakaguchi S, Moriya Y, Sone S, Nishioka Y. Erlotinib prevents experimental metastases of human small cell lung cancer cells with no epidermal growth factor receptor expression. Clin Exp Metastasis. 査読あり 2012 Mar;29(3):207-16.
- 4) Goto H, Hanibuchi M, Sakaguchi S, Kanematsu T, Kakiuchi S, Tomimoto H, Azuma M, Tezuka T, Tada H, Miki Y, Nakamura T, Sone S, Nishioka Y. Investigation of the outpatient chemotherapy for lung cancer patients in Tokushima University Hospital. J Med Invest. 査読あり 2011 Aug;58(3-4):219-26.
- 5) Ogino H, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Trung VT, Goto H, Ikuta K, Yamada T, Uehara H, Tsuruoka A, Uenaka T, Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yano S, Nishioka Y, Sone S. E7080 suppresses hematogenous

multiple organ metastases of lung cancer cells with nonmutated epidermal growth factor receptor. Mol Cancer Ther. 査読あり 2011 Jul;10(7):1218-28.

- 6) Ali AH, Takizawa H, Kondo K, Matsuoka H, Toba H, Nakagawa Y, Kenzaki K, Sakiyama S, Kakiuchi S, Sekido Y, Sone S, Tangoku A. 5-Aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis of pleural malignant tumor. Lung Cancer. 査読あり 2011 Oct;74(1):48-54.
- 7) Kishi J, Nishioka Y, Kuwahara T, Kakiuchi S, Azuma M, Aono Y, Makino H, Kinoshita K, Kishi M, Batmunkh R, Uehara H, Izumi K, Sone S. Blockade of Th1 chemokine receptors ameliorates pulmonary granulomatosis in mice. Eur Respir J. 査読あり 2011 Aug; 38(2):415-24.
- 8) Van TT, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Sato S, Kuramoto T, Goto H, Mitsuhashi A, Nishioka Y, Akiyama S, Sone S. The therapeutic efficacy of S-1 against orthotopically implanted human pleural mesothelioma cells in severe combined immunodeficient mice. Cancer Chemother Pharmacol. 査読あり 2011 Aug;68(2):497-504.

[学会発表] (計 0 件)

[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]

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿内 聡司 (KAKIUCHI SOJI)

徳島大学・病院・講師

研究者番号: 50380100