

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591950

研究課題名(和文) 進行食道癌に対するミッドカインを標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapies targeting esophageal cancer using Midkine inhibitors

研究代表者

猶本 良夫 (NAOMOTO, YOSHIO)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00237190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：米国 Cincinnati Children's Medical Center との共同開発したMidkine阻害剤：MDK#3を用いて、食道癌細胞、非小細胞肺癌細胞に対する抗腫瘍効果を解析した。MDK#3はMidkine発現のある食道癌および非小細胞肺癌株に対し、その増殖を抑制し、immunoblot解析とTunel染色からcaspase-3活性の増強とapoptosisの誘導が確認された。一方で当該阻害剤は、Midkine発現の無いヒト線維芽細胞株に対し、その増殖抑制効果は低値であった。上記検討により、新規Midkine阻害剤を用いた食道癌、肺癌に対する補助療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Midkine is a heparin-binding growth factor that is highly expressed in many malignant tumors. Therefore, the inhibition of Midkine is considered a potential strategy for cancer therapy. In the present study, we demonstrate a novel small molecule compound: MDK#3 that targets Midkine. MDK#3 suppressed the cell growth of Midkine-positive esophageal cancer cells and pulmonary adenocarcinoma cells. However, the inhibitor did not reduce the cell viability of normal human lung fibroblast cells. MDK#3 increased caspase-3 activity and apoptosis in MDK positive pulmonary adenocarcinoma cell. These results imply that inhibition of Midkine with MDK#3 provides a potential therapeutic approach for the treatment of esophageal cancer and lung cancer that are driven by Midkine.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、消化器外科学

キーワード：食道癌 肺癌 Midkine

## 1. 研究開始当初の背景

Midkine は塩基性の低分子量タンパク質で、ヘパリン結合型サイトカインの一種である。正常組織における Midkine の発現は低値である一方、食道癌をはじめとする多くの癌種においてその発現の増強が認められ (左図 1) また癌の進展に関与することが知られている (Muramatsu T. et al. J Biochem. 132:359-371, Kadomatsu K et al. Cancer Lett. 204:127-43. 2004)。

さらに Midkine 遺伝子のプロモータ領域を使って、癌特異的に下流遺伝子を発現させることが可能である (Curiel DT et al. Cancer Res. 60:4305-4310. 2000)。我々は米国 Cincinnati Children's Medical Center の Whitsett A. Jeffrey 教授らと共同研究を行い、Midkine プロモータを用いた cell base assay により Luciferase 活性を測定し、44000 種の化合物ライブラリーより Midkine の特異的阻害剤の screening を終了した。

## 2. 研究の目的

我が国において、食道癌は増加の一途をたどっており、進行食道癌 5 年生存率は現在においても 40% 程度に留まっている。

また本邦における肺癌死亡数は、癌死亡の約 2 割に達している。本研究において、Midkine 標的阻害薬を使用し、Midkine を発現する食道癌、非小細胞肺癌細胞株に対する抗腫瘍効果を解析することでこれらの疾病に対する新規標的療法開発を目指す。

## 3. 研究の方法

研究初年度において、Midkine 阻害剤の *in vitro* における食道癌および肺癌への抗腫瘍性また細胞死誘導効果の検討及び機序の解析を行った。

### A: 食道癌および非小細胞肺癌株における Midkine 阻害剤の抗腫瘍性の検討

- 1) Immunoblot 法による Midkine 発現量の解析
- 2) 臨床標本における Midkine 発現の解析
- 3) MTT assay 法による cell viability 阻害効果の解析。
- 4) FACS による apoptosis の検出。

### B: Midkine 阻害剤の作用機序の解析

特異的抗体および Immuno blot 法を用い MDK#3 の抗腫瘍効果誘導機序の解析を行った。

平成 24 年度以降、Midkine 阻害剤の正常細胞・組織障害の検討を行うとともに、抗癌剤・分子標的薬剤と併用効果の検討を行った。さらに *in vivo* での抗腫瘍効果を解析した。

### C: 正常細胞・組織障害の評価

正常ヒト線維芽細胞における Midkine 阻

害剤の誘導する増殖抑制効果また細胞死を MTT assay、flow cytometry にて解析する。さらにマウスを用い MDK#3 の腹腔内投与後の肝機能また体重の変化を計測した。

### D: 他種分子標的薬剤と併用効果の検討

Midkine 発現癌細胞株を使用し、MDK#3 と MEK inhibitor との併用効果を解析した。

### E: *in vivo* における抗腫瘍効果の解析

Midkine 発現癌細胞株を使用し、MDK#3 と MEK inhibitor との併用効果を解析した。MDK#3 の therapeutic efficacy を評価するために担癌マウスにおける抗腫瘍効果を調べた。

## 4. 研究成果

### A: 食道癌および非小細胞肺癌株における Midkine 阻害剤の抗腫瘍性の検討

特異的抗体および Immuno blot 法による解析結果、食道癌細胞: TE-8、TTn、非小細胞肺癌株: H441、H520 に Midkine 発現が認められた。

一方で、非小細胞肺癌株: A549、ヒト正常肺線維芽細胞株: NHLF では発現は認められなかった。当院での非小細胞肺癌切除症例 80 例においておよそ 70% に Midkine 発現が免疫染色法にて観察された。Midkine 阻害剤 MDK#3 は、Midkine 発現を有する癌細胞株: TE-8、TTn、H441、H520 の細胞増殖を抑制したが、非発現株である A549、NHLF においてその増殖能を変化させなかった。FACS による PI 染色を用いた細胞周期解析により、MDK#3 は Midkine 陽性肺腺癌株: H441 において subG0/G1 population を増加させた。一方で、この変化はヒト正常細胞で Midkine の発現の無い NHLF にて認められなかった。

このことより、MDK#3 は Midkine 発現のある癌細胞に apoptosis を誘導し、正常細胞に対し副作用を誘導しない可能性が示された。

### B: Midkine 阻害剤の作用機序の解析

特異的抗体および Immuno blot 法による解析を行った結果、MDK#3 は、H441 細胞において PI3 kinase および AKT のリン酸化を抑制し、caspase-3 および PARP の cleavage を誘導した。このことから当該阻害剤の抗腫瘍効果は PI3 kinase-Akt pathway を阻害による caspase を介した apoptosis であることが明らかとなった。

### C: 正常細胞・組織障害の評価

Midkine 阻害剤: MDK#3 投与後の正常ヒト線維芽細胞を用いた FACS 解析によ

り H441 に誘導された subG0/G1 population の増加は認められず、また Hoechst33342 染色においてクロマチン凝集などの apoptosis を示唆する変化は認められなかった。

またマウスに対し MDK#3 を 9mg/kg で腹腔内へ投与後（隔日 3 回投与）、肝機能障害、体重減少などの有害事象は認められなかった。このことより MDK#3 は Midkine を発現する癌細胞を標的とし、低細胞・組織障害性であることが示された。

#### D: 他種分子標的薬剤と併用効果の検討

Midkine 発現癌細胞株を使用し、MDK#3 と MEK inhibitor との併用効果を解析した。H441 細胞において MEK inhibitor は、MDK#3 の増殖抑制効果、また clonogenic survival を抑制した。

#### E: *in vivo* における抗腫瘍効果の解析

Nude mice (BALBc nu/nu) に H441 細胞を接種して作製した xenograft において、MDK#3 の腹腔内投与群（週 3 回 9mg/kg）および週 5 回 9mg/kg は control 群に比し、有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。またこのとき肝機能障害や、体重減少といった有害事象は認められなかった。

現在 MEK 阻害剤との併用効果につき、解析を行っている。

#### 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 1 件）

Hao H, Maeda Y, Fukazawa T, Yamatsuji T, Takaoka M, Bao XH, Matsuoka J, Okui T, Shimo T, Takigawa N, Tomono Y, Nakajima M, Fink-Balduf IM, Nelson S, Seibel W, Papoian R, Whitsett JA, Naomoto Y. PLoS One. 2013 Aug 16;8(8):e71093(査読有り)

〔学会発表〕（計 3 件）

深澤拓也、前田豊、山辻知樹、高岡宗徳、森田一郎、瀧川奈義夫、猶本良夫。Midkine 阻害剤を用いた非小細胞肺癌に対する新規治療法開発。第 54 回 日本肺癌学会総会 2013 年 11 月 21 日 於東京都千代田区

深澤拓也、山辻知樹、前田豊、瀧川奈義夫、高岡宗徳、森田一郎、中島元夫、ジェフリー・ウィットセット、猶本良夫。肺腺癌に対する Midkine を標的とした新規治療法の開発。第 113 回日本外科学会学術集会 2013 年 4 月 11 日 於福岡県博多

Takuya Fukazawa, Yutaka Maeda, Huifang Hao, Tomoki Yamatsuji, Munenori Takaoka, Nagio Takigawa, and Yoshio Naomoto. Development of novel targeted therapies for non-small cell carcinoma by novel Midkine inhibitors. AACR Annual Meeting 2013. 2013 年 4 月 8 日 於米国ワシントン DC.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕  
出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.kawasaki-m.ac.jp/med/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

猶本良夫 (NAOMOTO YOSHIO)  
川崎医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00237190

##### (2) 研究分担者

山辻知樹 (YAMATSUJI TOMOKI)  
川崎医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：40379730

深澤 拓也 (FUKAZAWA TAKUYA)  
川崎医科大学・医学部・講師  
研究者番号：20379845

高岡 宗徳 (TAKAOKA MUNENORI)  
川崎医科大学・医学部・講師  
研究者番号：50548568

(3)連携研究者

中島 元夫 (NAKAJIMA MOTOWO)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・客員教授  
研究者番号：50548568