

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591902

研究課題名(和文)細胞接着阻害因子を標的として新規癌治療薬の開発

研究課題名(英文)New target of the extra cellular matrix protein against cancer

## 研究代表者

谷山 義明(Taniyama, Yoshiaki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座准教授

研究者番号：60372611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌はわが国及び世界において女性の中で最も頻発する癌であり、世界的な問題である。特に、プロゲステロン、エストロゲン、HER2という標的受容体を持たない乳癌がトリプルネガティブ乳癌(TNBC)と呼ばれており、現在その治療法はない。我々はTNBCがペリオスチン(PN)遺伝子が過剰発現することを見出し、この中和抗体を独自に作製して原発巣および肺転移巣への転移を抑制することを確認した。PNの乳癌転移の機序として網羅的な共役蛋白質の解析を行い、PN蛋白質がWnt蛋白質と結合しWntシグナルを増強させることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Breast cancer occurs the most frequently in women of the world. The breast cancer without the receptors of progesterone, estrogen and HER2 is called triple negative breast cancer (TNBC), and we don't have no drugs for it. We confirmed that TNBC secretes periostin (PN) protein excessively, and made PN neutralizing antibody originally. Pn antibody inhibited the growth of primary focus and metastasis for lung. I found that PN protein combines with Wnt and promoted Wnt signal as a mechanism of breast cancer increasing by PN.

研究分野：癌転移

キーワード：トリプルネガティブ乳癌 癌転移 中和抗体 Wnt シグナル

1. 研究開始当初の背景

乳癌や悪性黒色腫は転移性の強い癌であり、本邦でもその治療に難渋する難治性癌である。近年、これらの癌で血中のペリオスチン(PN)が高値であることが報告されている。我々は独自にPN中和抗体を作成し、悪性黒色腫や乳癌の転移モデルにおいて、PN中和抗体が原発巣縮小効果を持つこと、肺転移を著明に抑制すること、骨浸潤を抑制することを確認し国際特許出願を済ませている。

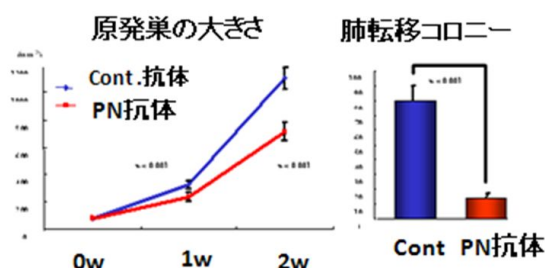
また、エストロゲン、プロゲステロン、HER2などの治療標的が存在しない乳癌がトリプルネガティブ乳癌と呼ばれており、癌幹細胞形質が高く、治療法がないため予後が極めて悪い。一方、1086名の乳癌症例の解析によるとリンパ節転移症例では免疫染色での原発巣でのPN発現が強いこと、トリプルネガティブ乳癌では非トリプルネガティブ乳癌と比べて原発巣でのPNの発現が強いこと、原発巣でのPNの発現が独立した生命予後の危険因子であることが報告されている。

さらに、MCF-7ヒト乳癌細胞にPN遺伝子を過剰発現させたところマウスの乳癌転移モデルにおいて著明に転移を増殖させること、乳癌細胞の未分化性が増すこと、その未分化になった乳癌細胞が脂肪細胞や骨細胞に分化誘導可能であることが報告されている。

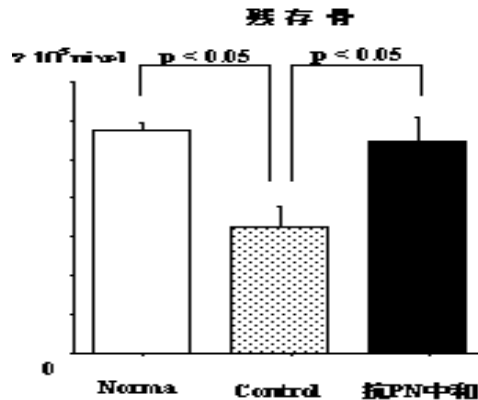
また、PNの乳癌転移促進のメカニズムとして、Wnt蛋白とPN蛋白が共役することによって乳癌のWntシグナルが促進し、転移が促進すること、PNKOマウスにてその転移が抑制されることが報告されている。

4T1マウス乳癌にPN中和抗体を投与すると抗体濃度を上昇させると乳癌細胞が根クローシスを誘導することを確認している。また、MTSアッセイによって4T1乳癌細胞の増殖を評価したところ、PN中和抗体投与にて、乳癌の増殖は著明に抑制されていた。

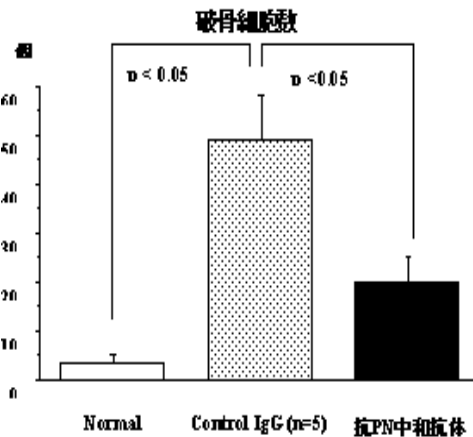
さらに我々は4T1マウス乳癌モデルにおいてPN中和抗体が、原発巣抑制作用だけでなく著明な肺転移抑制作用を有していることを確認している。



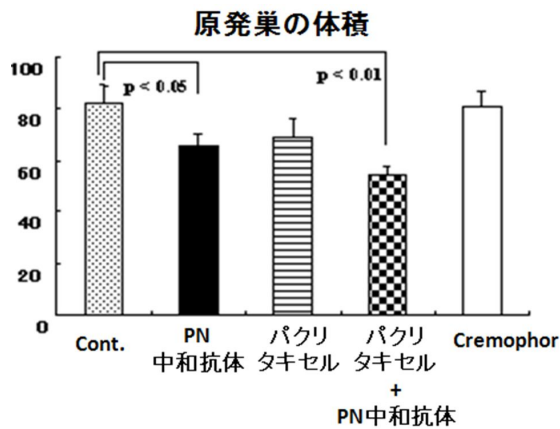
また、マウス乳癌細胞の骨への浸潤は有意に抑制されており、破骨細胞の数は有意に抑制されていた。(下図)



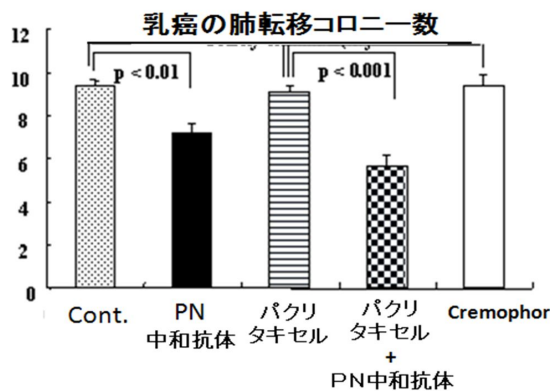
マイクロCTによる骨量の評価にてPN中和抗体は有意に乳癌細胞の骨浸潤および骨量の減少を抑制していることを確認している。(下図)



さらに、既存の抗癌剤との併用効果を評価したところ、下記に示すように、原発巣に関してはPN中和抗体と同様にパクリタキセルの投与にても縮小効果を確認できたが、併用することによってさらに強い原発巣抑制効果を認めた。(下図)



次に肺への転移を評価したところ、既存の化学療法であるパクリタキセルには転移抑制効果を認めなかったが、PN 中和抗体とパクリタキセルの併用にて相乗効果を認めた。(下図)



上記のことからヒト・トリプルネガティブ乳癌の標的としてPNは適しており、われわれがマウス4T1乳癌モデルでPN中和抗体の作用を確認していることから、ヒト・トリプルネガティブ乳癌の重症免疫不全マウスへのを用いた肺転移モデルで検証する意義が考えられる。

## 2. 研究の目的

ヒト・トリプルネガティブ乳癌の肺転移モデルを構築してマウス・モノクローナル抗体にて転移抑制効果があるかを比較検討する。

### PNKO マウス及び、乳癌細胞の PNKO

を作成し癌悪性化の機序を明らかにする。分泌蛋白であるPNは線維芽細胞や癌細胞から分泌され、癌微小環境に影響し癌悪性化に寄与している。PNのメカニズムの1つとして、我々はPNKOマウスが骨髓細胞の虚血部位への浸潤を抑制し、血管新生

抑制作用を持つことをすでに確認しており、実際の癌転移モデルを用いてこのメカニズムを解明する。

また、ヒト・トリプルネガティブ乳癌MDA-MB-231細胞を用いてPNをSiRNAで抑制して、Wntシグナルの状況を比較検討する。

臨床の乳癌サンプルの原発巣を免疫染色してPN発現の有無を検討し、その後の他臓器転移の有無を比較検討する。

## 3. 研究の方法

ヒト・トリプルネガティブ乳癌であるMDA-MN231細胞を重症免疫不全マウス(NOG)の乳腺部に移植する肺転移モデルを作製し、PN中和抗体を投与した。

一方、PN蛋白質と共役する蛋白質を網羅的に解析し、PNによる乳癌転移の機序を解析する。

大阪大学医学部内分泌腫瘍外科の乳癌サンプルを用いて、原発巣を免疫染色してPNの発現の有無を評価し、その後の他臓器転移との関係を解析する。

## 4. 研究成果

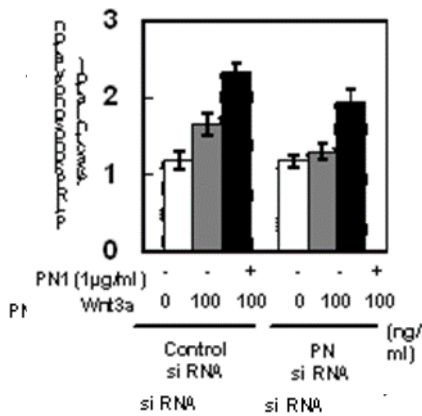
MDA-MB-231乳癌細胞を同所移植し、PN中和抗体あるいは、コントロールIgG抗体を投与したところ、PN中和抗体群で原発巣の縮小および肺転移を著明に抑制することを確認した。

PNKOマウスについては乳癌モデルに必要なBALB/cマウスにBLAK6マウスからのバックグランドの変換を行い、2年間以上かけて戻し交配することに成功した。現在、少数例ではあるがPNKOマウスにて4T1マウス乳癌肺転移モデルでの原発巣の縮小効果および、肺転移抑制効果を確認している。

Crisper/cas9のゲノム編集技術を用いてPNKO細胞を構築しているがなかなか思うように乳癌細胞のKOが完成していない。

一方、網羅的にPN蛋白質と結合する蛋白を解析した上でWnt3a蛋白がPN1蛋白質に結合することを見出した。そこで、我々は数種類のPN SiRNAを作製しPNの遺伝子レベルでの抑制ができることを確認した上でWntシグナルへの作用検討した。

また、網羅的探索の結果PNとWnt3aが結合することを見出した。



上記のように、PNのSiRNAをかけるとWntで刺激しても下流のLRP6がリン酸化されない。またこれにPN1を刺激するとWnt3aのシグナルがレスキューされることが明らかとなった。

これによってPNはWntシグナルを介して肺転移することが明らかとなった。

また、大阪大学医学部・内分泌腫瘍外科の乳癌の原発巣のサンプルの解析によって乳癌症例の原発巣の検体を用いてPNが強発現している症例で原発巣の除去後、他臓器転移していることがあきらかとなった。

以上のことから、ヒト乳癌トリプルネガティブ乳癌の肺転移モデルにおいてPN中和抗体は原発巣と転移巣の抑制を認め、その機序としてWnt3aシグナルの抑制効果が考えられた。また、臨床の乳癌症例においても原発巣のPN陽性症例で遠隔期の転移が促進していることが証明された。

これより、あらたな乳癌治療法として原発巣でPNの発現の強い症例でPN中和抗体を併用することによって他臓器への転移が抑制できる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0件)

なし

〔学会発表〕(計0件)

なし

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

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 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cgt.med.osaka-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷山 義明(YOSHIAKI, Taniyama)

大阪大学大学院医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号: 60372611

(2)研究分担者

森下 竜一(MORISHITA, Ryuichi)

大阪大学大学院医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号: 40291439

(3)連携研究者

野口 眞三郎(NOGUCHI, Sinzaburo)

大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 10303942