

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659403

研究課題名(和文) 肺がん脳転移のMetastasis initiating cell

研究課題名(英文) Metastasis initiating cell of lung cancer brain metastases

研究代表者

北 賢二(KITA, Kenji)

金沢大学・がん進展制御研究所・助手

研究者番号：80625252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：緑色蛍光タンパク及び発光酵素遺伝子を導入した肺がんを含むヒトがん細胞株を作製し、SCIDマウスの脳内に移植して脳腫瘍(脳転移)の継時的増大をモニタリングできるin vivoイメージングモデルを確立した。これらヒト肺がん細胞株は種々の血管新生関連因子を発現していたが、ヒトがん細胞株の脳への生着率と血管新生関連因子産生量に相関がみられなかった。さらに、in vivoイメージングモデルにおいて、VEGFを高発現した高転移能細胞株において抗VEGF抗体による治療を行ったが、脳腫瘍形成は抑制されなかった。以上より、脳転移形成はVEGFによる血管新生のみならず、種々の因子で制御されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We transfected eGFP and luciferase genes into human cancer cell lines, including lung cancer cells, and established in vivo imaging model of brain metastasis (brain tumor) with these cells by intracranial inoculation. These cancer cells produced various angiogenesis-related molecules, but there was no correlation between tumorigenicity in the brain and angiogenesis-related molecules. In the in vivo imaging model, anti-VEGF antibody did not inhibit tumor progression of VEGF-high producing cancer cells. These results suggest that brain metastasis may be regulated multiple factors in addition to VEGF-induced angiogenesis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺がん 脳転移

### 1. 研究開始当初の背景

肺がんは悪性度が高く、多臓器転移を形成することが治療の最大の障壁である。特に脳転移は、神経症状により QOL 低下を来す深刻な状態であり、単発転移に対する定位能照射が適応となる場合以外はそのコントロールは極めて困難である。従って、肺がんの脳転移に対する有効な治療法開発は急務の課題である。我々の教室では、マウスの内頸動脈より腫瘍細胞を接種することで再現性の高い脳転移モデルを確立し、脳転移形成には拡張血管形成が必須であり(Yano S et al, Cancer Res, 60: 4959, 2000)、治療標的となることを報告してきた(Fidler IJ, Yano S, et al, Lancet Oncol, 3:53, 2002)。

幹細胞は、自己複製能をもち、多分化能を持つ細胞の総称である。幹細胞は骨髄以外にも肝、神経、心筋、肺などにも存在することが明らかになってきている。一方、がん幹細胞は一部白血病細胞が造血系幹細胞の性格を持ち高腫瘍性であることから提唱されている概念であるが、神経膠芽腫や肝がん、大腸がん、乳がんなどの固形がんに加え、肺がんにおいてもその存在が報告されてきた。がん幹細胞は造腫瘍性が高いため、腫瘍の発生のみならず転移の起源となるという考え方もある。しかし、がん幹細胞の形質の保持には原発臓器のニッチという微小環境が必須であることから、異なる微小環境に形成される転移はがん幹細胞より分化の進んだ前駆細胞が起源になるとの考え方もでき、我々はこのような metastasis initiating cells (MIC)が存在すると仮説を立てた。

がん幹細胞は抗がん剤抵抗性であり、正常幹細胞と異なる表面マーカーも明らかではないため、特異的治療の開発が非常に困難であることが予想されている。しかし、MIC が存在しがん幹細胞と異なる形質を有していれば MIC 特異的な治療戦略を立てることが出来るため、本研究を着想するに至った。

### 2. 研究の目的

肺がんにおいて脳転移は QOL を低下させ、治療法開発が課題となっている。また、がん幹細胞という概念が白血病細胞において提唱され、転移においても起源と成り得るという考え方がある。肺がんにおいてもその存在が報告されていることから、がん幹細胞より分化の進んだ転移の起源となる前駆細胞 (metastasis initiating cells: MIC) が存在するという仮説を立てた。本研究では脳転移における MIC の存在を同定しがん幹細胞および正常幹細胞との表現型の差異を明らかにする。さらに、MIC が脳において転移巣を形成する際に必須のニッチとの相互作用も明らかにし、治療標的を特定することを目的としている。

### 3. 研究の方法

(1) in vitro におけるヒトがん細胞株に対する薬剤感受性の検討：分子標的薬による細

胞増殖抑制効果を MTT Assay にて確認した。  
(2) in vivo イメージングモデルの作製：ヒトがん細胞株 PC14PE6 (肺がん)、KM12SM (大腸がん)、LC319/bone2 (肺がん)、NUGC4 (胃がん) に緑色蛍光タンパク (EGFP) 及び発光酵素 (Luciferase) 遺伝子を導入した。それら細胞株を SCID マウスの頭蓋内に移植し、継続的な発光強度変化を in vivo イメージングにより確認した。

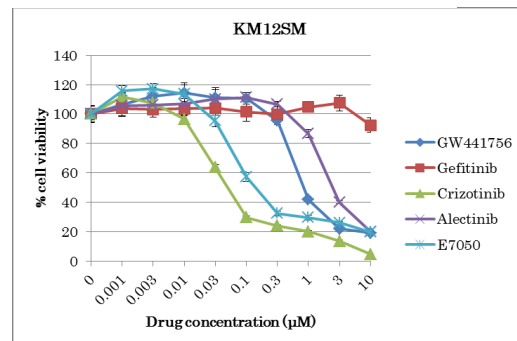
(3) 各細胞株上清中における血管新生関連因子の測定：ヒトがん細胞株 5 株 PC-9 (肺がん)、PC14PE6、KM12SM、LC319/bone2、NUGC4 について、血管新生関連因子の産生量を ELISA により測定した。

(4) in vivo における血管内皮増殖因子 (VEGF) 阻害薬による治療効果の検討：KM12SM/ELuc-EGFP を SCID マウス頭蓋内に移植し、VEGF を阻害する薬剤 (モノクローナル中和抗体) を投与することで治療効果を検討した。

### 4. 研究成果

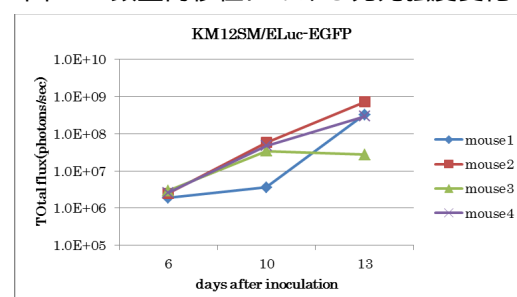
(1) in vitro におけるヒトがん細胞株に対する薬剤感受性の検討：高転移性細胞株 KM12SM に対して Crizotinib、E7050 が増殖抑制効果を示すことを明らかにした。

図 1. KM12SM における薬剤感受性



(2) in vivo イメージングモデルの作製：EGFP 及び Luciferase 遺伝子を導入した KM12SM/ELuc-EGFP を SCID マウス頭蓋内に移植し、発光強度を in vivo イメージングで解析した所、継続的に増大していることを確認した。以上により、in vivo における治療実験をイメージングで解析可能にした。

図 2. 頭蓋内移植における発光強度変化



(3) 各細胞株上清中における血管新生関連因子産生量の測定：脳への生着率と血管新生関連因子に相関はなかった。また、高転移能を持つ細胞株で VEGF 濃度が比較的高いことを明らかにした。以上より、in vivo において VEGF を阻害することにより治療効果を期待できることが示唆された。

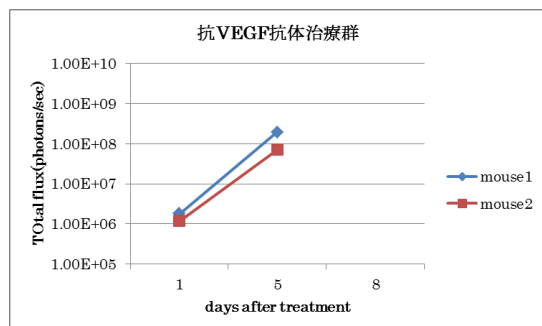
Table 1. 各細胞株上清中における血管新生関連因子濃度

細胞名	bFGF (pg/ml)	CXCL8/IL-8 (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	Angiopoietin-2 (pg/ml)
PC14PE6	19.6	70.6	1115.3	730.6
KM12SM	159.9	< 31.3	536.9	< 46.9
PC-9	32.2	40.0	273.9	< 46.9
LC319/bone2	971.9	< 31.3	407.5	< 46.9
NUGC4	19.8	< 31.3	43.0	< 46.9

(4) in vivo における血管内皮増殖因子 (VEGF) 阻害薬による治療効果の検討：抗 VEGF モノクローナル抗体治療群では治療効果が見られなかった。この結果より脳腫瘍及び脳転移では、VEGF は治療標的となり難いことが示唆された。

以上の結果から、MIC の同定という当初の目的には至らなかったが、マウス頭蓋内移植モデルにおいて、VEGF は治療標的の可能性が低く、脳転移に対する治療標的を特定するために今後さらに検討を進めていきたい。

図 3. in vivo における抗 VEGF 抗体の効果



## 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 6 件)

- (1) Nanjo S, Nakagawa T, Takeuchi S, Kita K, Fukuda K, Nakada M, Uehara H, Nishihara H, Hara E, Uramoto H, Tanaka F, Yano S, In vivo imaging models of bone and brain metastases and pleural carcinomatosis with a novel human EML4-ALK lung cancer cell line., *Cancer Sci*, 査読有, 106(3):244-52, 2015 Mar, doi: 10.1111/cas. 12600.

- (2) Li Q, Wang W, Machino Y, Yamada T, Kita K, Oshima M, Sekido Y, Tsuchiya M, Suzuki Y, Nan-Ya K, Iida S, Nakamura K, Iwakiri S, Itoi K, Yano S, Therapeutic activity of glycoengineered anti-GM2 antibodies against malignant pleural mesothelioma. *Cancer Sci*. 査読有, 106(1):102-7. 2015 Jan, doi: 10.1111/cas.12575.
- (3) Tanimoto A, Yamada T, Nanjo S, Takeuchi S, Ebi H, Kita K, Matsumoto K, Yano S, Receptor ligand-triggered resistance to alectinib and its circumvention by Hsp90 inhibition in EML4-ALK lung cancer cells. *Oncotarget*, 査読有, 5(13):4920-4928, 2014
- (4) Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Nanjo S, Ishikawa D, Sano T, Kita K, Nakamura T, Matsumoto K, Suda K, Mitsudomi T, Sekido Y, Uenaka T, Yano S, Combined therapy with mutant-selective EGFR inhibitor and Met kinase inhibitor for overcoming erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer. *Mol Cancer Ther*. 査読有, 11(10):2149-57. 2012 Oct doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0195.
- (5) Koizumi H, Yamada T, Takeuchi S, Nakagawa T, Kita K, Nakamura T, Matsumoto K, Suda K, Mitsudomi T, Yano S. Hsp90 inhibition overcomes HGF-triggering resistance to EGFR-TKIs in EGFR-mutant lung cancer by decreasing client protein expression and angiogenesis. *J Thorac Oncol*. 査読有, 7(7):1078-85. 2012 Jul doi: 10.1097/JTO.0b013e3182519a2c.
- (6) Yamada T, Takeuchi S, Nakade J, Kita K, Nakagawa T, Nanjo S, Nakamura T, Matsumoto K, Soda M, Mano H, Uenaka T, Yano S, Paracrine receptor activation by microenvironment triggers bypass survival signals and ALK inhibitor resistance in EML4-ALK lung cancer cells. *Clin Cancer Res*. 査読有, 1;18(13):3592-602. 2012 Jul doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2972.

〔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〕  
ホームページ等

<http://syuyounaika.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北 賢二 (KITA, Kenji)  
金沢大学・がん進展制御研究所・助手  
研究者番号：80625252

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし