

# 研究報告書

## 「癌の転移前診断の確立と治療をめざして」

研究タイプ: 大挑戦型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 平塚(中村) 佐千枝

### 1. 研究のねらい

がんは、昭和56(1981)年から我が国の死亡原因の第1位である。がんの統計(財団法人がん研究振興財団)によると男性、女性ともに、おおよそ2人に1人が一生のうちにがんと診断され、男性ではおおよそ4人に1人、女性ではおおよそ6人に1人ががんで死亡すると言われている。がんは、発生した場所(原発巣)に留まっているならば比較的治療しやすいが、悪性化した癌は、原発巣から離れて、血管を通して他の組織へ転移する特徴があり、これが癌治療を難しくしている。現在は、転移してしまった癌そのものに対する治療が中心である。

癌細胞が転移するにあたって、転移しやすい臓器があることは古くから知られた現象である。しかし、癌細胞は転移先をどのように選ぶのかについてはよく分かっていない。古典的に主な原因は、解剖学的な血行動態によるものと考えられてきた。近年、癌が転移する前に、すでに遠隔の臓器に転移に有利な土壌が形成されることが明らかになってきた。原発癌よりのサイトカイン、ケモカインなどの液性蛋白の分泌、低酸素誘導蛋白、エクソソーム、核酸によって、肺、肝臓、リンパ節などにおいて炎症類似反応が引き起こされ、転移前に転移予定先に、転移に有利な土壌を作り出す現象-転移前土壌が形成される。この血中の液性因子は、転移予定臓器の血管を網羅的に流れて、刺激することが予想されるが、実際の癌の転移は、1つの臓器の中でも数個にとどまり、数えきれないほどの転移形式をとらない。このことより、転移前の臓器では、1つの臓器の中でも転移しやすい局所部位(focal area)があり、それは転移する前に決定されていることをマウス担癌モデルを用いて最近発見した。さらに、focal area では透過性が亢進しており、炎症様である。この部位の炎症反応関連遺伝子を同定して抑制し、focal area を消失させることが転移の抑制につながることをマウスを用いた動物レベルでめざす。また大挑戦型として、ヒトのレベルでの本現象の解明を最終目標としている。癌を有する患者さんにおいて、転移前あるいは微小転移の段階で、マウスと同様に肺に炎症類似反応が認められるか、限局性なのか、検出するための指標を何にするのか、転移前に制御可能なのかを含めた転移前診断、治療をめざす。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

癌が転移する前の時点で、離れた他の臓器の局所に、転移するのに有利な“転移予定地”を形成することが、マウスを用いた研究で明らかになってきている。しかしマウスの実験レベルでも、癌の転移がなぜ臓器の特定の局所におきるのか、そのメカニズムの詳細は不明であった。さらにこれまで、そのような“転移予定地”が形成される現象がヒトにおいて確

認められたことはなかった。

現在までに我々は、担癌マウス(皮下や乳腺組織などに癌を実験的に移植して定着させたマウス)に青色の色素を静脈内投与すると、局所の血管から血管内の青色色素が漏れ出す現象(血管透過性の亢進)が起き、転移前の肺の局所に濃い青色のスポットが形成され、その部位に転移が起こることを見出している。今回この現象がどのような分子メカニズムにより生じているのか確かめるため、スポット形成した部位とそうでない部位より、RNA をそれぞれ抽出して網羅的に遺伝子発現を比較した。発現に差があった遺伝子の中で、血管透過性の亢進による炎症様反応に関係すると考えられる受容体 CCR2 という分子に着目した。CCR2 と、CCR2 に結合するリガンドである CCL2、それぞれの遺伝子欠損マウスを用いて担癌マウスを作製し、血管透過性の上昇をみたところ、両方の遺伝子欠損マウスの肺では、スポット状の濃い青色となった部位は殆ど見られなかった。次に、血管透過性の亢進と癌の転移に関係があるかを調べた。野生型(遺伝子の正常な型)の担癌マウスに、蛍光色素で標識した癌細胞を静脈から入れると、肺の血管透過性が亢進している局所に一致して癌細胞が集まるのが観察されたが、そのような現象は CCL2 や CCR2 の遺伝子欠損した担癌マウスでは認められず、結果として癌の転移は抑制された。そして S100A8 と SAA3 が CCL2-CCR2 システムの調節を受けていることを見だし、このカスケードの最下流で、自然免疫反応で中心的な役割を果たしている TLR4/MD-2 複合体の MD-2 遺伝子が欠損した担癌マウスでも、血管透過性の亢進抑制を伴った、癌細胞の転移抑制が認められた。さらに、転移を伴う悪性の癌で亡くなった患者さんの肺の転移のない部分に、担癌マウスでみられた“転移予定地”と大変良く似た炎症性反応が起きている局所が存在する可能性を見いだした。今後、ヒトにおいて、癌転移の予測や予防的な治療の可能性につながる事が示唆された。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A (マウスレベルにおける“転移予定地の形成のメカニズムの解明)

#### 1. CCL2-CCR2 システムは転移前の肺に透過性亢進部位をつくりだす

担癌マウスに青色の色素(EB:エバンスブルー)を静脈内投与すると、転移が起きる前の肺の局所に、血管透過性亢進部位である青色のスポットが形成される。今回その現象がどのような分子メカニズムにより生じているのか確かめるため、スポット形成した部位とそうでない部位より、RNA をそれぞれ抽出して網羅的に遺伝子発現を比較した。そして、発現に差があった遺伝子の中で、血管透過性の亢進に関与している可能性の高い炎症反応に関係すると考えられる受容体分子である CCR2 に着目した。そしてこの CCR2 と、CCR2 のリガンドである CCL2 それぞれの遺伝子欠損マウスを用いて担癌マウスを作製した。そして、それらの担癌マウスの静脈内に青い色素を注射し血管透過性を見たところ、野生型(遺伝子の正常な型)では局所性の血管透過性亢進部位を認めたが、CCL2 と CCR2 遺伝子欠損担癌マウスの肺では、透過性スポットはほとんど認められなかった。

#### 2. CCL2-CCR2 システムによりコントロールされている透過性亢進部位に癌細胞は好んで集まりやすい

血管透過性亢進部位と、癌細胞の転移に関係があるかを調べた。野生型の担癌マウスに、蛍光色素で標識したがん細胞を静脈から入れると、肺の血管透過性が上昇している局所に一致してがん細胞が集まるのが観察された。しかし、この現象は CCL2 や CCR2 の遺伝子欠損担癌マウスでは認められず、結果として癌の転移は抑制された。

### 3. 透過性亢進部位を作り出すのは、S100A8 と SAA3 である

以前、私たちは炎症に関わる S100A8、SAA3 という蛋白が転移前の肺全体において上昇していることを明らかにしてきた。この分子の蛋白発現が透過性亢進部位においてどうなっているかを調べたところ、いずれの分子も透過性亢進部位で発現上昇していた。また S100A8 SAA3 と CCL2-CCR2 との関わりを見るために、担癌マウスにした CCL2 遺伝子欠損マウスの肺を調べたところ、これらのマウスにおいて SAA3 の発現は抑えられていた。このことより、CCL2-CCR2 によって SAA3 の発現調整が行われていることが分かった。次に透過性亢進部位を実際に形成しうる分子の特定を行った。候補蛋白を哺乳類細胞を用いて作製し、腹腔および肺における透過性を測定した。まずアッセイ系として確立され、見やすい腹腔透過性亢進実験を行うと、ポジティブコントロールである血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)と同様以上に S100A8、SAA3により血管透過性誘導を認めた。一方 CCL2では強い誘導を認めなかった。このことより、CCL2-CCR2-S100A8-SAA3 の一連の反応の中で、血管透過性を強く誘導したのは S100A8-SAA3 であることが示され、S100A8 と SAA3 は肺に透過性亢進を誘導できることが示された。

### 4. S100A8-SAA3-MD-2 カスケードは透過性亢進と転移に関与する

このカスケードの下流の SAA3 の受容体である TLR4/MD-2 複合体についても調べた。S100A8 や SAA3 の受容体である TLR4/MD-2 は自然免疫反応で中心的な役割を果たしていることが知られている。SAA3 による透過性誘導に関しては、腹腔透過性システムを用いて調べると、腹腔内 EB の濃度は MD-2 欠損マウスで減弱した。担癌にした MD-2 欠損マウスは、野生型と比べて肺の血管透過性の亢進は抑制され肺では肉眼的にも青色のスポットは認められなかった。最終的に、担癌 MD2 欠損マウスでは静注した癌細胞の肺への集積が抑制された。

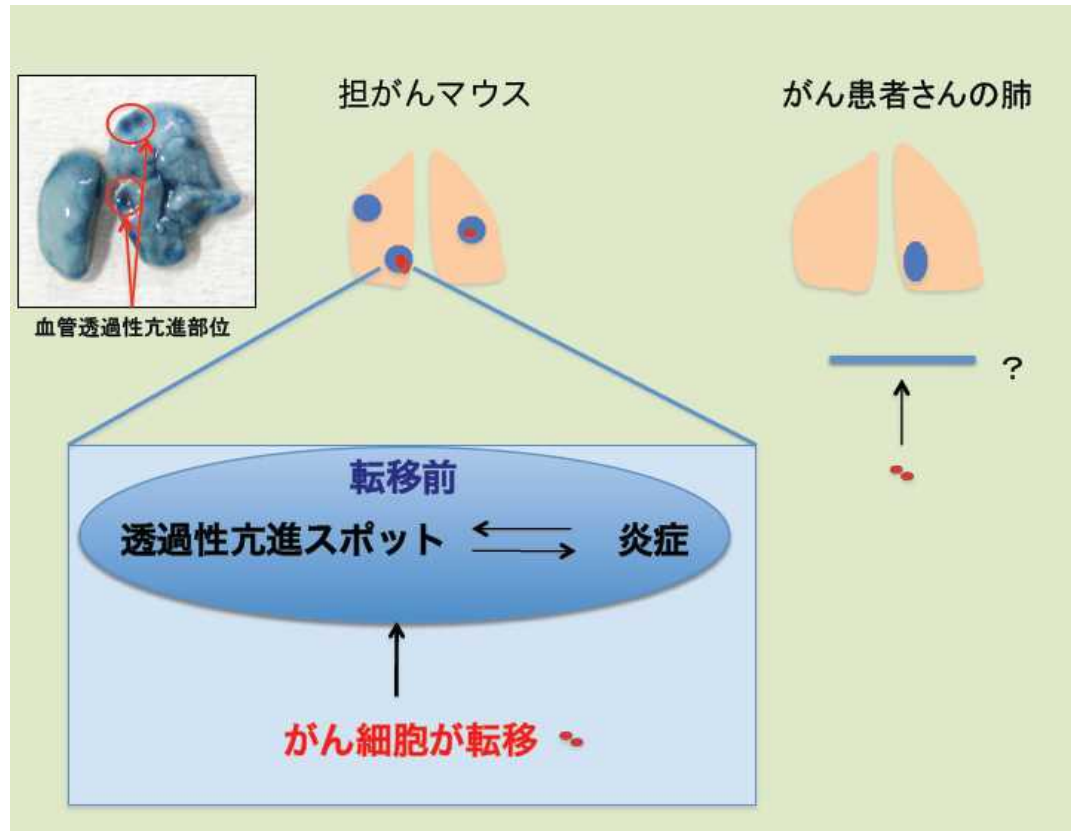
以上のことから、原発癌による CCL2 が血液を介して”転移予定地”で局所的に発現する CCR2 に作用し、その刺激によって産生された S100A8 や SAA3 が TLR4/MD-2 複合体に作用して、血管内皮細胞の血管透過性を局所的に上昇させ、癌の転移を促進するというメカニズムが明らかになった。

## 研究テーマ B (ヒトレベルでの転移予定地の可能性の検索)―大挑戦項目

### 5. 担癌の患者さんにおいて、転移前の肺の透過性亢進部位が存在する可能性

マウスの肺の血管透過性の亢進部位では CCR2 の高い発現が認められるが、同時にフィブリノーゲンが検出される。フィブリノーゲンは炎症反応に伴う血管透過性が亢進した部位で産生されることが知られている。そこで、転移を伴う癌で亡くなった患者さんの肺を調

べたところ(13人)、明らかな転移を認めていない肺の局所においても、フィブリノーゲンの発現が認められた血管に一致して、CCR2 と S100A8 の発現が上昇していることを確認した。なお、この臨床材料を用いた研究は、事前に研究倫理審査委員会の承認を受け実施した。



### 3. 今後の展開

本研究は大挑戦型研究課題であり、最終目標は癌転移の予防である。今回のマウスを用いた研究で、原発癌は自然免疫に関係する因子の力を使用して、離れた場所にある転移前の肺にスポット状の血管透過性の亢進部位を作り出し、この部分に積極的に転移することが分かった。転移を伴う悪性のがんで亡くなった患者さんの転移のない部分に、担癌マウスでみられた“転移予定地”と大変良く似た炎症性反応が起きている局所が存在する可能性を見いだした。そのため、さらにヒトにおいて詳細な分子疫学的な研究を行うことにより、本研究が将来には患者さんにおけるがん転移の予測や、ごく早期の転移の検査を可能とするような、予防的な治療に発展することが期待される。

具体的にはマウスレベルで認めた透過性亢進に関与する分子を指標として、癌の患者さんの肺において上昇している遺伝子をスクリーニングし、感度の良いマーカーとして使用できる分子、生物学的機能を有して治療効果を期待できる分子を検索する。また転移前炎症をおこしている部位の検出方法と消失方法についても検討する予定である。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

- 1) マウスレベルでの転移予定地のメカニズムの解析は一定の到達目標を達成した。具体的には、転移予定地の透過性亢進部位の消失を、関連する遺伝子欠損マウスを用いて確認し、この消失が転移抑制につながる結果を得た。研究の進め方については、マウスレベルでは、複数の遺伝子欠損マウスで転移予定地の消失を確認することができ、ヒトへ応用可能な指標も得た。
- 2) ヒトレベルで転移予定地の存在の可能性の検索、その部位の消失を目指すために、ヒトサンプルを用いた候補遺伝子のスクリーニングは完了した。マウスで確認する為の遺伝子欠損マウス、ヒト化マウスの作製を試みた。マウスからヒトレベルへの移行は大挑戦ではあるが、ヒトへの移行を発展させる必要がある。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

転移性の癌を移植したマウスにおいて、転移の前に転移予定臓器において血管透過性の亢進が見られることを見出し、転移予定局所における環境の変化と炎症反応を解析した。その結果、移植した原発癌組織より分泌されたCCL2が、将来転移予定部位である肺血管組織において高発現するCCR2を刺激してS100A8やSAA3を発現させ、それらが血管内皮のTLR4/MD-2複合体に作用して血管透過性を亢進させ、その後の転移巣の形成に重要であることをマウスで見事に示したことは高く評価される。担癌マウスモデルにおいては、血管透過性の亢進が起きている、CCR2高発現部位ではフィブリノーゲンの発現がみられる。ヒト癌患者の肺組織においても、フィブリノーゲンの発現と一致してCCR2とS100A8が発現亢進している部位を見だし発表した。

本研究は大挑戦型課題であり、癌転移の予防のための転移前診断を目標としている。ヒト患者組織を用いた詳細な分子疫学的な検討を行い、転移予定組織(局所)を利用し、転移に関連する候補遺伝子のスクリーニングを完了し、候補遺伝子の機能を確認するための研究を進めている。現時点では研究課題の最終目標までの到達には道半ばであるが、転移予定組織に関連する遺伝子明らかになれば、転移前診断のマーカーの同定や転移予定局所の消失(転移抑制)が可能になり、対癌療法の新たな武器となる成果となると期待している。

## 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. 1. Hiratsuka S, Ishibashi S, Tomita T, Watanabe A, Akashi-Takamura S, Murakami M, Kijima H, Miyake K, Aburatani H, Maru Y. Primary tumours modulate innate immune signalling to create pre-metastatic vascular hyperpermeability foci. Nature Communications (2013) 4, Article number: 1853 doi:10.1038/ncomms2856

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件



(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

平塚 佐千枝, 転移前の肺における局所性転移土壌の解析,  
日本がん分子標的治療学会、2016、

平塚 佐千枝, 自然免疫シグナルによる転移予定臓器における転移前土壌の形成、第 73 回  
日本癌学会学術総会シンポジウム 2014

平塚 佐千枝, 転移前の肺における局所透過性亢進部位の解析、第 22 回日本がん転移学  
会学術集会総会シンポジウム 2013.

Hiratsuka S. “Innate immune system mediates focal metastasis” (Brisbane) シンポジウム  
September, 2012.

著作物

平塚 佐千枝 (2016) 医学のあゆみ 転移のプラットフォーム、転移前土壌を形成するサイト  
カイン、医歯薬出版株式会社 (平塚 佐千枝監修)、東京

平塚 佐千枝 (2015) 月刊(細胞)分子細胞生物学講座「血管透過性と癌の転移」  
ニュー・サイエンス社、東京

平塚 佐千枝 丸義朗 2014 転移予定臓器の転移前の土壌. がん転移の機構 メディカル・サ  
イエンス・ダイジェスト(佐谷 秀行監修)ニュー・サイエンス社

新聞発表

日本経済新聞 がん肺への転移解明 2013.5.15

読売新聞 がん細胞血管に穴あけ転移 2013.5.17