

ID No.	223
研究課題名	MT1-MMP および MT1-MMP と相互作用する分子群によるがんの悪性形質獲得の分子機序の解明と臨床応用
研究代表者	鍋島 一樹 (福岡大学・教授)
研究組織 受入教員 研究分担者	清木 元治 (東京大学医科学研究所・教授) 宮本 新吾 (福岡大学・教授) 吉里 俊幸 (福岡大学・准教授) 四元 房典 (福岡大学・講師) 植田 多恵子 (福岡大学・助教) 南 星旭 (福岡大学・大学院生) 宮田 康平 (福岡大学・大学院生) 濱崎 慎 (福岡大学・講師) 青木光希子 (福岡大学・助教) 古賀 佳織 (福岡大学・助教) 鬼塚 美樹 (福岡大学・技師)
研究報告書	
本研究 HB-EGFプロジェクトに関しては、1)理化学研究所長田抗生物質研究室の有するケミカルアレイを用いた新たなHB-EGF阻害物質の探求・同定、2)HB-EGF発現調節遺伝子の同定、3)MT1-MMPおよびHB-EGFを介したEMT(epithelial-mesenchymal transition)のヒト卵巣癌組織における実証について取り組む予定としていた。 その中で、2)に関して、卵巣癌のなかでも難治性な明細胞腺癌を用いて、HB-EGF 発現調節遺伝子の同定を行った。卵巣癌明細胞腺癌細胞株を用いて、2次元培養条件下の細胞とマトリゲルを用いた3次元培養条件下の細胞、SCID MOUSE 上で形成された腫瘍から抽出したRNAを比較して、発現アレイ、microRNAアレイ、CGHアレイの3つのアレイシステムを利用しHB-EGF発現に関わる遺伝子の探索を行った。この中で、発現アレイの結果により、HB-EGFの発現亢進とともに血管新生に関わる遺伝子群の亢進を認めた。 また、近年、代謝と癌増殖機構の間で共通の遺伝子ネットワークや転写因子が存在することが報告されてきている。HB-EGFは脂質代謝異常においても重要な分子であることから、卵巣癌細胞株を用いてHB-EGFの発現に関与する脂質代謝異常関連遺伝子の同定を行った。卵巣癌細胞株にHB-EGFを安定的に高発現させ、マイクロアレイで解析した。その結果、発現亢進している脂質代謝関連遺伝子として酸化LDLの受容体であるCD36を認めた。一方でPPARγ作動薬を高濃度で使用するとPPARγの転写活性の抑制及びCD36の発現抑制を認めた。そこで、HB-EGF特異的抑制剤であるCRM197とPPARγ作動薬は<i>in vitro</i>及び<i>in vivo</i>において卵巣癌細胞株の抗腫瘍効果を示し、CRM197とPPARγ作動薬の併用により相乗的抗腫瘍効果を認めた。これらの結果より、卵巣癌においてCD36を中心とする脂質代謝経路はHB-EGFのautocrine loopに作用し、HB-EGFの発現を亢進させ、卵巣癌増殖機構に寄与	

していることが明らかになった。

今後の予定としては、3次元培養条件下で培養した卵巣癌細胞株や、CRM197を投与した患者検体を用いて、HB-EGFの発現に関わるmicroRNAや遺伝子、更にはCRM197感受性を示す遺伝子群の探索を行い、HB-EGFの発現に関わる遺伝子群の診断ミニアレイの作製を行う予定としている。

本研究 Emmprin プロジェクトに関しては、多機能性の原因になっていると考えられる、Emmprinと複合体を形成している分子の同定が主たる目的であった。今回、FLAG-tagged full sized emmprin 発現細胞（胃癌細胞株 TMK-1 および類上皮肉腫細胞株 FU-EPS-1 細胞）に cross-linker (BS3) を作用させて emmprin 膜蛋白複合体を形成させ、lysis buffer にて可溶化後に、FLAG affinity chromatography を用いて複合体を精製した。得られた抽出複合体を Western blotting にて確認すると、BS3 処理群でのみ抗 emmprin 抗体と反応する 76 kDa バンドを認めたので、このバンドと BS3 非処理サンプルの同部位を切り出し、質量分析器にて解析した（東大医科学研究所 越川直彦准教授、尾山大明博士の協力により施行）。BS3 処理後の 76 kDa の複合体サンプルからは 431 分子断片が、BS3 無処理サンプルからは 787 分子断片が得られ、emmprin (basigin/CD147) は前者のみに含まれていた。複合体(+)サンプルのみに認められた 130 分子から、分析上確からしさの低い分子や核内分子を除外し、さらに分子量にてスクリーニングを行い、約 10 程度の分子に絞り込んだ。さらに第 2 回目解析では、BS3 処理群でのみ抗 emmprin 抗体と反応する 150 kDa バンドも認めており、同様に約 20 程度の分子への絞り込みを行った。これらの分子の emmprin との複合体形成について確認作業を継続すると共に、さらに、免疫沈降による複合体解析も行っており、網羅的複合体解析のための材料を整えつつある。

成果発表 <論文>

1. Yotsumoto F, Kuroki M, Miyamoto S. Biological characteristics of ovarian cancer. *Nihon Rinsho*. Jun;70 Suppl 4:488-92, 2012
2. Kasai N, Kobayashi K, Shioya S, Yoshikawa Y, Yotsumoto F, Miyamoto S, Mekada E, Enokizono J. Soluble heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) detected by newly developed immuno-PCR method is a clear-cut serological biomarker for ovarian cancer. *Am J Transl Res*. 4(4):415-21, 2012.
3. Fukuoka M, Hamasaki M, Koga K, Hayashi H, Aoki M, Kawarabayashi T, Miyamoto S, Nabeshima K. Expression patterns of emmprin and monocarboxylate transporter-1 in ovarian epithelial tumors. *Virchows Arch*. 461(4):457-66, 2012.
4. Tsunoda T, Ota T, Fujimoto T, Doi K, Tanaka Y, Yoshida Y, Ogawa M, Matsuzaki H, Hamabashiri M, Tyson DR, Kuroki M, Miyamoto S, Shirasawa S. Inhibition of phosphodiesterase-4 (PDE4) activity triggers luminal apoptosis and AKT dephosphorylation in a 3-D colonic-crypt model. *Mol Cancer*. 25;11:46, 2012.
5. Ueda T, Maehara M, Takahashi Y, Nakayama N, Kondo H, Shirota K, Yoshizato T, Miyamoto S. Clinical significance of cell-free and concentrated ascites re-infusion therapy for advanced and recurrent gynecological cancer. *Anticancer Res*. 32(6):2353-7, 2012.

6. Miyata K, Yotsumoto F, Nam SO, Kuroki M, Miyamoto S. Regulatory mechanisms of the HB-EGF autocrine loop in inflammation, homeostasis, development and cancer. *Anticancer Res.* 32(6):2347-52, 2012.
7. Ota T, Doi K, Fujimoto T, Tanaka Y, Ogawa M, Matsuzaki H, Kuroki M, Miyamoto S, Shirasawa S, Tsunoda T. KRAS up-regulates the expression of miR-181a, miR-200c and miR-210 in a three-dimensional-specific manner in DLD-1 colorectal cancer cells. *Anticancer Res.* 32(6):2271-5, 2012.
8. Nojiri T, Yoshizato T, Fukami T, Obama H, Yagi H, Yotsumoto F, Miyamoto S. Clinical significance of amphiregulin and epidermal growth factor in colostrum. *Arch Gynecol Obstet.* 286(3):643-7, 2012.
9. Ishitsuka K, Kunami N, Katsuya H, Nogami R, Ishikawa C, Yotsumoto F, Tanji H, Mori N, Takeshita M, Miyamoto S, Tamura K. Targeting Bcl-2 family proteins in adult T-cell leukemia/lymphoma: in vitro and in vivo effects of the novel Bcl-2 family inhibitor ABT-737. *Cancer Lett.* 28;317(2):218-25, 2012.
10. Mogi A, Koga K, Aoki M, Hamasaki M, Uesugi N, Iwasaki A, Shirakusa T, Tamura K, Nabeshima K. Expression and role of GLUT-1, MCT-1, and MCT-4 in malignant pleural mesothelioma. *Virchows Arch.* 462: 83-93, 2013
11. Fukuoka M, Hamasaki M, Koga K, Hayashi H, Aoki M, Kawarabayashi T, Miyamoto S, Nabeshima K. Expression patterns of emmprin and monocarboxylate transporter-1 in ovarian epithelial tumors. *Virchows Archiv* 461: 457-466, 2012
12. Okazaki I, Nabeshima K. Introduction: MMPs, ADAMs/ADAMTSs Research Products To Achieve Big Dream. *Anticancer Agents Med Chem.* 12(7):688-706, 2012