

## 腫瘍動態制御研究分野

### <研究スタッフ>

教授:	松本邦夫	助教:	中村隆弘
研究員:	中山瑞穂	研究員:	鈴木芳典
大学院生:	徐慶	大学院生:	小松義継
大学院生:	藤川雅崇	技術補佐員:	丹保智佳子
事務補佐員:	端谷 泉		

### <研究概要>

HGF (hepatocyte growth factor) は Met チロシンキナーゼを受容体として生理活性を発揮する。HGF は上皮-間葉相互作用を介した形態形成、肝臓や腎臓をはじめとする組織の再生を担う一方、癌の浸潤・転移に深く関与する。私達は癌-間質相互作用を介した癌悪性化における HGF-Met 系の意義と NK4 (HGF アンタゴニスト・血管新生阻害分子) による制癌研究、バーチャル技術を用いた HGF-Met 系阻害剤の創薬研究、HGF-Met 系を介した組織再生(肝再生など)の制御と治療の研究などを行っている。

### <今年度の主な成果と今後の計画>

#### 1. NK4 の血管新生阻害機構の研究

癌の浸潤・転移阻止を目指して、HGF-Met 系阻害分子として NK4 を初めて見出した。その後、NK4 は血管新生阻害作用を有することを明らかにしたが、そのメカニズムが不明であった。そこで、NK4 の血管新生阻害機構を明らかにするための研究を進めた。NK4 は血管内皮細胞における fibronectin の cell-associated assembly を阻害し、これによりインテグリン-Rac 系シグナルを阻害することによって増殖を抑制した。一方、siRNA によって Met 受容体をノックダウンした内皮細胞においても依然として NK4 による血管新生阻害作用が認められ、血管新生阻害には Met 受容体とは異なる NK4 結合分子の関与が考えられた。NK4 固相化カラムによる部分精製、SDS-PAGE、質量分析を用いて血管内皮細胞膜の NK4 結合分子を複数同定した。共局在の解析、siRNA によるノックダウンによる NK4 活性の阻害などによって NK4 の血管新生阻害を担う分子が perlecan であることをつきとめた。Perlecan は複数の細胞外マトリックスと結合し血管新生に必須の基底膜の構築に関与する。したがって、NK4 は perlecan への結合を介して fibronectin などの構築を阻害し、これによってインテグリン-Rac 系シグナルを阻害することによって bFGF や VEGF など、HGF 以外の血管新生因子によって誘導される血管新生をも阻害することが明らかになった。NK4 の血管新生阻害機構が明らかになったことで2機能性制癌分子としての NK4 の特徴と意義がいつそう明確になった。

#### 2. NK4 による制癌研究: 悪性中皮腫の浸潤性成長阻害と悪性黒色腫の肺転移阻害

悪性胸膜中皮腫の発症にはアスベスト暴露が関与し、胸膜などへの極めて活発な浸潤性成長を特徴としている。ヒト悪性中皮腫の浸潤性成長における HGF-Met 系の意義、移植モデルでの悪性中皮腫に対する NK4 の制癌作用について解析した。その結果、ヒト悪性中皮腫に対して HGF が細胞の遊走やコラーゲングル内での3次元浸潤を促す一方、NK4 は Met 活性化、細胞遊走、コラーゲングル内浸潤を阻害した。さらに、ヒト悪性中皮腫をの皮下移植モデルで NK4 遺伝子治療の制癌作用を調べた結果、主に血管新生阻害を介して腫瘍の成長を阻害することを明らかにした。悪性胸膜中皮腫に対する制癌剤としての NK4 の有用性

が明らかになった。また、肺癌ならびに悪性黒色腫に対して NK4 遺伝子治療が高効率に肺転移を阻害することを明らかにした。臨床試験に向けて、NK4 遺伝子治療臨床研究への協力、組換え NK4 タンパク質の製造・血中安定化・徐放性製剤の研究を進めている。上記に加え、同研究所の矢野教授の研究で NK4 が gefitinib 耐性を克服すること、平尾教授の研究で脳腫瘍の癌幹細胞の活発な浸潤性に HGF-Met 系活性化が重要な役割を担うことなども明らかにされた。

## 2. HGF-Met 受容体系を標的とするインシリコ分子創薬研究

タンパク質-化合物ドッキング計算などのバーチャル技術やタンパク質結晶解析の研究者と協力し、HGF-Met 阻害作用をもつ低分子化合物による創薬研究を進めている。約 3,000,000 化合物を出発として HGF-Met 系に対する阻害活性をもつリード化合物を数個見出すとともに、リード化合物と標的タンパク質との共結晶構造の解析に成功した。今後、リード化合物-標的タンパク質複合体の結晶構造解析に基づく最適化と *in vitro/in vivo* 薬効評価を進める予定である。

## 3. Kremen の生理機能の研究

Kremen (Krm) は中村助教によって新規受容体様分子として見出され、その後 Wnt シグナル制御に関与することが明らかにされたが、生理機能は不明である。そこで、Wnt シグナルや癌細胞形質の制御における Krm の生理機能の解析を進めている。

## 4. HGF による疾患治療の基礎研究

医学系研究科機能再建学の富田教授・土屋准教授と共同で、HGF が骨延長促進作用、靭帯の損傷・断裂などに対する再生・治癒促進作用をもつことが明らかになった。

<論文>

1. Kishi, Y., Kuba, K., **Nakamura, T.**, Wen, J., **Suzuki, Y.**, Mizuno, S., Nukiwa, T., **Matsumoto, K.**, and Nakamura, T. Systemic NK4 gene therapy inhibits tumor growth and metastasis of melanoma and lung carcinoma in syngeneic mouse tumor models. *Cancer Sci.*, 100: 1351-1358, 2009.
2. Sakai, K., **Nakamura, T.**, **Matsumoto, K.**, and Nakamura, T. Angioinhibitory Action of NK4 involves impaired extracellular assembly of fibronectin mediated by perlecan-NK4 association. *J. Biol. Chem.*, 284: 22491-22499, 2009.
3. **Nakamura, T.**, Sakai, K., Nakamura, T., and **Matsumoto, K.** Anti-cancer approach with NK4: Bivalent action and mechanisms. *Anti-Cancer Agent Med. Chem.*, 10: 36-46, 2010.
4. **Suzuki, Y.**, Sakai, K., Ueki, J., Xu, Q., **Nakamura, T.**, Shimada, H., Nakamura, T., and **Matsumoto, K.** Inhibition of Met/HGF receptor and angiogenesis by NK4 leads to suppression of tumor growth and migration in malignant pleural mesothelioma. *Int. J. Cancer*, in press.

<共同研究による論文>

1. Fukuta, K., Adachi, E., **Matsumoto, K.**, and Nakamura, T. Different reactivities of enzyme-linked immunosorbent assays for hepatocyte growth factor. *Clinica Chimica Acta*, 402: 42-46, 2009.
2. Liu, K.X., Kato, Y., **Matsumoto, K.**, Nakamura, T., Kaku, T., Sugiyama, Y. Characterization of the enhancing effect of protamine on the proliferative activity of hepatocyte growth factor in rat hepatocytes. *Pharm. Res.*, 26: 1012-1021, 2009.
3. Kamimoto, M., Mizuno, S., **Matsumoto, K.**, Nakamura, T. Hepatocyte growth factor prevents multiple organ injuries in endotoxemic mice through a heme oxygenase-1-dependent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 380: 333-337, 2009.
4. Egami, T., Ohuchida, K., Miyoshi, K., Mizumoto, K., Onimaru, M., Toma, H., Sato, N., **Matsumoto, K.**, Tanaka, M. Chemotherapeutic agents potentiate adenoviral gene therapy for pancreatic cancer. *Cancer Sci.*, 100: 722-729, 2009.
5. Kubota, T., Fujiwara, H., Matsumura, A., Taiyoh, H., Ichikawa, I., Okamoto, K., **Matsumoto, M.**, Nakamura, T., and Otsuji, E. NK4, an HGF antagonist, prevents hematogenous pulmonary metastasis by inhibiting adhesion of CT26 cells to endothelial cells. *Clin. Exp. Metastasis*, 26: 447-456, 2009.
6. Kanai, M., Funakoshi, H., Takahashi, H., Hayakawa, T., Mizuno, S., **Matsumoto, K.**, and Nakamura, T. Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice. *Mol. Brain*, 2: 8, 2009.

7. Kadoyama, K., Funakoshi, H., Ohya-Shimada, W., **Nakamura, T., Matsumoto, K.**, Matsuyama, S., Nakamura, T. Disease-dependent reciprocal phosphorylation of serine and tyrosine residues of c-Met/HGF receptor contributes disease retardation of a transgenic mouse model of ALS. *Neurosci. Res.*, 65: 194-200, 2009.
8. Kubota, T., Taiyoh, H., Matsumura, A., Murayama, Y., Ichikawa, D., Okamoto, O., Fujiwara, H., Ikoma, H., Nakanishi, N., Kikuchi, S., Ochiai, T., Sakakura, C., Kokuba, Y., **Suzuki, Y., Matsumoto, K.**, Nakamura, T., and Otsuji, E. Gene transfer of NK4, an angiogenesis inhibitor, induces CT26 tumor regression via tumor-specific T-lymphocyte activation. *Int. J. Cancer.*, 125: 2879-2886, 2009.
9. Tamase, A., Muraguchi, T., Naka, K., Tanaka, S., Kinoshita, M., Hoshii, T., Ohmura, M., Ooshio, T., Nakada, M., Sawamoto, K., **Matsumoto, K.**, Oshima, M., Asano, M., Saya, H., Okano, H., Suda, T., Hamada, J., and Hirao, A. Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 106(40): 17163-17168, 2009.
10. Wang, W., Li, Q., **Matsumoto, K.**, Kayano, Y., Matsumoto, I., Oda, M., Watanabe, G., Nishioka, Y., Sone, S., and Yano, S. Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Clin. Cancer Res.*, 15(21): 6630-6638, 2009.
11. Nakase, J., Kitaoka, K., **Matsumoto, K.**, and Tomita, K. Facilitated tendon-bone healing by local delivery of recombinant hepatocyte growth factor in rabbits. *Arthroscopy*, 26: 84-90, 2009.
12. Yamada, T., **Matsumoto, K.**, Wang, W., Li, Q., Nishioka, Y., Sekido, Y., Sone, S., and Yano, S. Hepatocyte growth factor reduces susceptibility to an irreversible epidermal growth factor receptor inhibitor in EGFR-T790M mutant lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 16: 174-183, 2010.

#### <和文著書・総説>

1. 福田一弘、**松本邦夫**、中村敏一：“新規がん分子標的薬—NK4(HGF アンタゴニスト/血管新生阻害分子)の開発—”、「バイオ医薬開発技術とシーズ」山本重夫監修・(株)、pp. 66-78、シーエムシー出版、2009.
2. **中村隆弘**、**松本邦夫**：“HGF”、「炎症・再生医学事典」、松島剛治・西脇徹編、pp. 518-521、朝倉書店、2009.
3. **中山瑞穂**、**松本邦夫**：“細胞増殖因子”、遺伝子医学 MOOK 別冊「ますます重要になる細胞周辺環境の科学技術」田畑泰彦編、pp. 231-237、メディカルドゥ、2009.
4. **中村隆弘**、櫻間晴子、中村敏一、**松本邦夫**：“HGF 研究の進展と制癌剤開発”、がん分子標的治療、Vol. 7、pp. 92-101、メディカルレビュー社、2009.
5. **鈴木芳典**、**松本邦夫**：“癌の発生，浸潤，転移における腫瘍関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast) の役割”、Surgery Frontier, 16: 68-72(466-470) 、2009.

### <招待講演>

1. 松本邦夫: “HGF-Met 系を介した組織再生の制御と創薬”, 第 24 回岡山 Vascular Biology 研究会、2009 年 3 月 18 日 (岡山)
2. 松本邦夫: “HGF-Met 受容体系を標的とする分子標的薬の開発”、技術情報協会セミナー (No. 910137) 「がん分子標的薬における製薬企業への開発事例と各癌種別に見る臨床現場で求められる新薬」、2010 年 10 月 29 日 (東京)

### <国内学会発表>

1. 鈴木芳典、酒井克也、中村敏一、松本邦夫: HGF-Met 系を介したヒト悪性中皮腫細胞の遊走制御と Met 細胞外領域遺伝子変異. 第 68 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 3 日 (横浜)
2. 酒井克也、岡清正、中村隆弘、松本邦夫、中村敏一: NK4 によるプロテオグリカン結合を介したフィブロネクチン構築阻害. 第 68 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 3 日 (横浜)
3. 大場宏明、窪田健、藤原斉、松村篤、村山康利、岡本和真、市川大輔、菊池正二郎、落合登志哉、阪倉長平、松本邦夫、中村敏一、大辻英吾: CT26 細胞に対する NK4 遺伝子導入による 5-FU のアポトーシス増強作用の検討. 第 68 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 3 日 (横浜)
4. 窪田健、大場宏明、松村篤、村山康利、岡本和真、藤原斉、菊池正二郎、市川大輔、落合登志哉、阪倉長平、松本邦夫、中村敏一、大辻英吾: 血管新生阻害剤、NK4 遺伝子導入による CT26 腫瘍拒絶と腫瘍特異的免疫誘導のメカニズムの検討. 第 68 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 3 日 (横浜)
5. 松村篤、窪田健、藤原斉、大場宏明、村山康利、岡本和真、市川大輔、菊池正二郎、落合登志哉、阪倉長平、松本邦夫、中村敏一、大辻英吾: HGF/c-Met シグナルを介した VEGF 発現調節のメカニズムの検討. 第 68 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 3 日 (横浜)
6. 鈴木芳典、酒井克也、中村隆弘、中村敏一、松本邦夫: ヒト悪性中皮腫細胞のコラーゲンゲル内浸潤性増殖における HGF-Met 系の役割と NK4 による阻害. 第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日 (神戸)
7. 酒井克也、岡清正、中村隆弘、松本邦夫、中村敏一: NK4 による血管新生阻害作用の解析 - プロテオグリカン結合を介したフィブロネクチン構築阻害. 第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日 (神戸)