

RCAS1 をターゲットとした新規がん分子標的治療開発に関する研究

九州大学病院 産科婦人科

講師 園田 顕三

はじめに

本研究申請者が RCAS1 を認識する 22-1-1 モノクローナル抗体を作製し⁽¹⁾、1999 年に RCAS1 がその受容体発現細胞にアポトーシスによる細胞死を誘導することを Nature Medicine 誌に報告して以来⁽²⁾、RCAS1 に関する科学論文が急速に増加し、現在までに 140 を超える科学論文報告が存在します。臨床的には、RCAS1 発現は子宮頸癌、子宮体癌を含む脳腫瘍、口腔癌、肺癌、胸膜悪性中皮腫、食道癌、胃癌、膵癌、胆嚢癌、胆管癌、大腸癌、消化管間葉系腫瘍、前立腺癌、腎癌といった計 15 種類の悪性腫瘍での臨床的予後因子であることが報告されています^(3, 4)。RCAS1 は正常組織から悪性腫瘍への悪性転化シークエンスにおいてその発現頻度が増加し、悪性腫瘍の分化度、腫瘍径、臨床進行期、浸潤、脈管侵襲、リンパ節転移と有意な相関を示すことが認められました⁽⁵⁻⁷⁾。RCAS1 は受容体発現細胞にアポトーシスを誘導しますが、臨床検体を使用した TUNEL 法による検討では子宮頸癌に発現する RCAS1 に相関して腫瘍周囲リンパ球にアポトーシスが誘導されていました⁽⁸⁾。同様の知見は脳グリオーマ、口腔癌、肺癌、乳癌、食道癌、胃癌、胆管癌、大腸癌でも得られており、RCAS1 を介して腫瘍細胞が生体内の免疫監視機構から逃避することによって、腫瘍の進展に寄与することが想定されています。さらに、肺癌、消化器癌、婦人科癌等で血清や胸水中に RCAS1 が分泌され、臨床経過や患者予後と相関することが報告されてきました⁽³⁾。本研究申請者は子宮癌、卵巣癌患者を対象とした検討を行い、血清 RCAS1 値の推移が臨床経過に相関し、血清中の RCAS1 がアポトーシスを誘導する生物活性を有し、子宮癌患者での末梢血リンパ球数が血清 RCAS1 濃度に逆相関して減少していたことから RCAS1 が biomarker であることを証明しました^(9, 10)。RCAS1 が腫瘍マーカーとして有用であるという知見は、これまでに、肺癌、胸膜悪性中皮腫、膵癌、胆嚢癌、胆管癌、パジェット病でも得られています。

RCAS1 が悪性腫瘍の進展に寄与する機序に関して研究が行われてきましたが、RCAS1 は腫瘍間質でのプロテアーゼやビメンチンの発現を変化させ、血管新生を誘導するといった間質の質的変化を惹起することで腫瘍の増殖、浸潤、転移を亢進させる一方で^(11, 12)、免疫担当細胞であるリンパ球や NK 細胞にアポトーシスを誘導し腫瘍細胞が生体の免疫監視機構から逃避することが明らかとなっています⁽²⁾。これらの事象の中で RCAS1 により誘導される血管新生については、細胞内シグナル伝達機構に於いて TGF- β 、MAPK の一つである ERK1/2 による HIF1- α の活性化や、Akt3 のリン酸化を介した VEGF が関与していることが本研究申請者等により報告されています⁽¹³⁾。さらに、本研究申請者による研究の結果、RCAS1 は ectodomain shedding により分泌されることが明らかとなりました^(11, 14)。個体の発生、分化、組織の生理学的機能維持に関わる増殖因子やインターロイキン等の分子は、この shedding 機構により細胞膜から切断され活性化分泌型として機能することが既に報告されていますが、RCAS1 がこれらの分子同様に生体内で重要な機能を担っていることが推測されます。実際、ヒト

以外にもマウスとイヌで RCAS1 遺伝子が単離されましたが、アミノ酸配列の相同性が 96%以上と高く、種を超えて保存されていることが明らかとなっています⁽³⁾。個体の発生、組織の分化やアポトーシス等に関与する他の分子同様に shedding 機構によって分泌されることも併せて考えると、RCAS1 は生物学的に極めてユニークな分子であることが理解されます。

RCAS1 は悪性腫瘍の特性を説明し得るユニークな生物活性を有する分子ですが、これまでの研究成果を踏まえて、RCAS1 の生物学的活性に関する基礎的解析を更に推進し、RCAS1 をターゲットとした悪性腫瘍に対する新たな分子標的治療の開発を行うことを本研究の目的としました。

方法

本研究では以下の事項に関して研究を行いました。

(1) RCAS1 の発現・分泌機構に関する解析：これまでの研究結果により、RCAS1 が ectodomain shedding 機構により分泌型となることが明らかとなっています。本研究では、shedding に関与する細胞内シグナル伝達系および protease を同定することを目的とし、shedding 分泌機構が RCAS1 の生物活性に与える影響についても解析を行いました。

(2) RCAS1 受容体の単離と細胞内シグナル伝達機構の解析：本研究では、RCAS1 受容体の単離を試みました。未だ単離されていない RCAS1 受容体を単離し細胞内シグナル伝達機構を解析することは、今後の標的治療開発において極めて重要な研究項目となります。

(3) RCAS1 をターゲットとした新たな分子標的治療の開発：上記の実験成果を踏まえ、臨床応用可能な新しい分子標的治療をトランスレーショナルに開発することを目標とし、治療実験モデルの開発・樹立を試みます。その内容としては、① RCAS1 発現の調節、② RCAS1 機能の変調誘導が候補として挙げられます。

結果

(1) RCAS1 の発現・分泌機構に関する解析：RCAS1 を発現かつ分泌する子宮頸癌細胞株 SiSo と RCAS1 を発現するが分泌しない乳癌細胞株 MCF-7 細胞を使用し、ectodomain shedding を誘導する種々の刺激 (phorbol ester、IL-1 β 、EGF、anisomycin、GPCR ligand 等) を加えた結果、RCAS1 が SiSo 細胞において PKC- δ 、Ras-MAPK および transactivation pathway を介して分泌されることが明らかとなりました。RCAS1 はその受容体発現細胞である赤白血病細胞株 K562 にアポトーシスを誘導しますが、アポトーシス誘導に関して検討したところ、膜型ではなく分泌型 RCAS1 によって誘導されることが主体となっていました。RCAS1 によりアポトーシスが誘導される分子機構に関しては、p38 MAPK のリン酸化、ミトコンドリアからの cytochrome c の放出等を経て caspase の活性化が生じることが明らかとなりました。以上の結果から RCAS1 が shedding 機構によって分泌型へ変換されることによって RCAS1 機能が修飾を受けることが明らかとなりました。shedding 機構を誘導する protease に関し

ては現在解析中ですが、microarray 解析の結果 ADAM family に属する分子が主要な役割を担っていることが想定されています。protease の発現パターンと RCAS1 分泌動態についても、細胞株や腫瘍組織サンプルを用いて解析中です。

(2) RCAS1 受容体の単離と細胞内シグナル伝達機構の解析：RCAS1 受容体の単離を試みる方法としては複数がありますが、今回は short hairpin RNA ライブラリーを使用しました。本法は RCAS1 によりアポトーシスが誘導されることから受容体を発現している K562 細胞株に short hairpin RNA ライブラリーを遺伝子導入し、RCAS1 によるアポトーシス抑制効果を確認するものです。現在までの解析の結果、RCAS1 受容体候補分子と考えられる分子が複数同定されました。今後これらの分子の発現を細胞株および腫瘍組織で確認し、生物学的機能を検定する実験を行います。これらの解析を行うことによって、アポトーシス誘導に関与する細胞内シグナル伝達機構の解析が可能となり、単離された RCAS1 受容体以降の細胞内シグナル伝達機構に関しても、リン酸化タンパクの同定や他液性因子等のシグナル伝達機構とのクロストークに関する解明が進展します。未だ単離されていない RCAS1 受容体を単離・解析することは、今後の標的治療開発において極めて重要な研究課題となります。

(3) RCAS1 をターゲットとした新たな分子標的治療の開発：RCAS1 を認識する 22-1-1 モノクローナル抗体を使用して RCAS1 を免疫沈降法で除去することによって、RCAS1 により誘導されるアポトーシスが減弱することが認められました。また、RCAS1 特異的 siRNA を作成し、SiSo 細胞株と子宮体癌細胞株 HOUA に導入したところ、RCAS1 発現が減弱しました。さらにこれらの細胞をヌードマウス皮下に移植し増殖を確認したところ、RCAS1 特異的 siRNA が導入された細胞では親株に比較し有意に増殖が抑制されていました。以上の結果からモノクローナル抗体による分泌型 RCAS1 の除去や siRNA による RCAS1 発現調節を効果的に施行することによって、RCAS1 をターゲットとした新たな分子標的治療の開発が可能となることが示唆されました。今後は① RCAS1 に対するより効果的な新規モノクローナル抗体の作製、② RCAS1 発現抑制を目的とした効率の良い特異的 siRNA 導入システム開発、③ RCAS1 受容体および細胞内シグナル伝達機構の阻害、および④ RCAS1 の shedding 分泌機構に関与するプロテアーゼ機能の調節等についても研究を推進していきます。

考察

RCAS1 研究は本研究申請者の研究から端を発した、我国のオリジナルな研究です。現在、増殖因子受容体を標的とした治療薬や、細胞内の増殖あるいは細胞死に関与するシグナル伝達系分子を標的とした治療薬の開発が進行していますが、これらの治療薬では十分な抗腫瘍効果を得ていないのが現状です。早期に発見された悪性腫瘍であれば、手術、放射線、化学療法といった従来の治療法を集学的に活用することで治療可能ですが、進行・再発症例では新規の標的治療を用いても十分にコントロールすることが出来ないことがこの背景に存在します。したがって、がん細胞の特性とより強く相関する新規標的分子の探索が必要不可欠ですが、既にその細胞生物学的活性が明らかとなっている分子ほど臨床的速効性を有することになります。この側面からも上述したユニークな生物活性を有する RCAS1 は当に有望な標的分子と考えられます。現在の医学研究では「ベンチからベッドへ」と表記さ

れる基礎研究の成果を臨床へトランスレーショナルに応用することが重要視されています。この「ベンチからベッドへ」と標記されるコンセプトの下で多くの革新的技術が臨床の場に導入されています。独創性の高い RCAS1 研究が対がん戦略における基礎研究と臨床研究の架け橋となり、がん患者予後を改善し得る新たな治療法の樹立に帰結することを期待しています。

要約

RCAS1 の生物学的機能解析を基にした新規がん標的治療を開発することを目的として本研究を遂行しました。がん制圧を現実化する治療開発には多大な時間と労力を要しますが、人類の福祉に貢献すべく今後とも更なる努力を注がなければなりません。

参考文献

1. Kenzo Sonoda, Manabu Nakashima, Tsunehisa Kaku, Toshiharu Kamura, Hitoo Nakano. A novel tumor-associated antigen expressed in human uterine and ovarian carcinomas. *Cancer* 77: 1501-1509, 1996.
2. Manabu Nakashima, Kenzo Sonoda, Takeshi Watanabe. Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nat Med* 5: 938-942, 1999.
3. Kenzo Sonoda, Shingo Miyamoto, Manabu Nakashima, Norio Wake. Biological role of the unique molecule RCAS1: A bioactive marker that induces connective tissue remodeling and lymphocyte apoptosis. *Front Biosci* 13: 1106-1116, 2008.
4. Kenzo Sonoda. Novel therapeutic strategies to target RCAS1, which induces apoptosis via ectodomain shedding. *Histol Histopathol* 26: 1475-1486, 2011.
5. Kenzo Sonoda, Tsunehisa Kaku, Toshiharu Kamura, Manabu Nakashima, Takeshi Watanabe and Hitoo Nakano. Tumor-associated antigen 22-1-1 expression in the uterine cervical squamous neoplasia. *Clin Cancer Res* 4: 1517-1520, 1998.
6. Kenzo Sonoda, Tsunehisa Kaku, Toshio Hirakawa, Hiroaki Kobayashi, Satoshi Amada, Kunihiro Sakai, Manabu Nakashima, Takeshi Watanabe, Hitoo Nakano. The clinical significance of tumor-associated antigen RCAS1 expression in the normal, hyperplastic, and malignant uterine endometrium. *Gynecol Oncol* 79: 424-429, 2000.
7. Kenzo Sonoda, Shingo Miyamoto, Toshio Hirakawa, Tsunehisa Kaku, Manabu Nakashima, Takeshi Watanabe, Kohei Akazawa, Takuji Fujita, Hitoo Nakano. Association between RCAS1 expression and clinical outcome in uterine endometrial cancer. *Br J Cancer* 89: 546-551, 2003.
8. Kenzo Sonoda, Shingo Miyamoto, Toshio Hirakawa, Hiroshi Yagi, Fusanori Yotsumoto, Manabu Nakashima, Takeshi Watanabe, Hitoo Nakano. Association between RCAS1 expression and microenvironmental immune cell death in uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol* 97: 772-779, 2005.
9. Kenzo Sonoda, Shingo Miyamoto, Toshio Hirakawa, Hiroshi Yagi, Fusanori Yotsumoto, Manabu Nakashima, Takeshi Watanabe, Hitoo Nakano. Clinical significance of RCAS1 as a biomarker of uterine cancer. *Gynecol Oncol* 103: 924-931, 2006.

10. Kenzo Sonoda, Shingo Miyamoto, Fusanori Yotsumoto, Hiroshi Yagi, Manabu Nakashima, Takeshi Watanabe, Hitoo Nakano. Clinical significance of RCAS1 as a biomarker of ovarian cancer. *Oncol Rep* 17: 623-628, 2007.
11. Kenzo Sonoda, Shingo Miyamoto, Toshio Hirakawa, Hiroshi Yagi, Fusanori Yotsumoto, Manabu Nakashima, Takeshi Watanabe, Hitoo Nakano. Invasive potency related to RCAS1 expression in uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol* 99: 189-198, 2005.
12. Kenzo Sonoda, Shingo Miyamoto, Hiroaki Kobayashi, Shinji Ogawa, Kaoru Okugawa, Shuichi Taniguchi, Norio Wake. The level of RCAS1 expression is inversely correlated with the number of vimentin-positive stromal cells in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 19: 838-843, 2009.
13. Kenzo Sonoda, Shingo Miyamoto, Ayano Yamazaki, Hiroaki Kobayashi, Manabu Nakashima, Eisuke Mekada, Norio Wake. Biologic significance of RCAS1 as a pivotal regulator of tumor growth via angiogenesis in human uterine cancer. *Cancer* 110: 1979-1990, 2007.
14. Kenzo Sonoda, Shingo Miyamoto, Manabu Nakashima, Norio Wake. Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells induces apoptosis via ectodomain shedding. *Exp Cell Res* 316: 1795-1803, 2010.