

総 説

肺癌多臓器転移モデルによる転移の分子機構解明と治療への応用

矢野 聖 二

徳島大学医学部生体防御腫瘍医学講座分子制御内科学分野

(平成15年3月17日受付)

(平成15年3月24日受理)

はじめに

肺癌は年々増加しており、現在わが国の悪性新生物による死亡原因の第1位となっている。

肺癌の死亡率が高い最大の要因は、早い段階で形成される転移である。真の早期癌であれば手術で治癒が期待できるが、肺癌の70~80%の方が診断時にすでに進行癌であり、多くの症例が遠隔転移を有している。しかも、その転移は多臓器にわたるため治療をさらに困難にしている。

近年研究の進歩により、転移の分子機構も徐々に解明されてきた。まず、原発巣で遺伝子変化により癌化がおこり、増殖因子や血管新生により増殖する。さらに、周囲に浸潤し脈管系に進入したのち、遠隔臓器に運ばれる。そこで血管内皮に接着し、浸潤、増殖を繰り返し転移巣を形成する。転移はこれらの過程がすべて成し遂げられた場合のみ生じるものであり、*in vivo* 環境でないと再現できない現象である。よって、転移研究には *in vivo* モデルの確立が必要であり、我々も独自の転移モデルを構築し分子機構の解明や新規治療法の開発を目標に解析を進めている。本稿では、我々の転移モデルを用いた解析で得られた成績を紹介し、基礎研究からいかに臨床に情報を発信できるかについて考察したい。

肺癌の多臓器転移モデルの作製

臨床的な治療目標は生存期間の延長であるが、多臓器転移をきたすことが多い肺癌ではすべての病巣のコントロールが必要となる。癌増殖には宿主との相互反応が重要だが、臓器微小環境は臓器ごとに異なるため、多臓器転移の制御には異なる微小環境における癌細胞増殖の分子機構の解明が必要である。多臓器転移モデルを作製す

るために、SCID マウスに静注する系を試みたが、ヒトの肺癌細胞株はマウスでは非常に tumorigenicity が低く腫瘍ができない。そこで、SCIDマウスにマウスIL-2R β 鎖抗体を腹腔内投与しNK細胞を除去した後、腫瘍細胞を静注することで100%のマウスに多臓器転移が形成されるモデルを作成した¹⁾。

このモデルにおいては、小細胞癌株はおもに肝、腎、リンパ節転移を形成し、SBC-5細胞はさらに肺や骨にも転移を形成する²⁾。腺癌は肺転移や癌性胸水を³⁾、扁平上皮癌は肝や腎転移する(図1)。このパターンは臨床の肺癌の転移パターンと非常によく似通っており、臨床を反映したモデルであると考えられる。これら細胞株の種々のサイトカイン産生や接着分子発現を検討しているが、転移パターンを規定する因子は未だ特定できていない。

このモデルを使って、まず肺癌細胞が転移先で臓器特異的な分子を発現するのかを検討した。SBC-5の肺、肝、腎、骨の転移結節の癌細胞からRNAを回収し、cDNAマイクロアレイで遺伝子発現を検討した。興味深いことに、SBC-5の遺伝子発現パターンは臓器ごとに異なっており、癌細胞の遺伝子発現が臓器微小環境により修飾される可能性が示唆された。

癌細胞に対するサイトカイン遺伝子導入による転移パターンの変化

つぎに、臓器微小環境を修飾するようなサイトカインの遺伝子導入を行った癌細胞の転移形成が臓器により異なるかを検討した。

まず、マクロファージの活性化因子であるM-CSFを肺癌細胞株に遺伝子導入した場合、遺伝子導入株の *in vitro* における増殖能、M-CSF以外のサイトカイン産

| 組織型 | 細胞株 | 転移形成 | | | | |
|-------|------------|------|-----|----|---|------|
| | | 骨 | 肺 | 肝 | 腎 | リンパ節 |
| 小細胞癌 | H69 | - | - | ++ | + | +++ |
| | H69/VP | - | - | ++ | + | +++ |
| | SBC 3 | - | - | ++ | + | ++ |
| | SBC 5 | ++ | + | ++ | + | + |
| 腺癌 | PC 14 | - | +++ | + | + | - |
| | A549 | - | ++ | - | - | - |
| 扁平上皮癌 | RERF-LC-AI | - | - | ++ | + | - |



図1 NK細胞除去SCIDマウスにおけるヒト肺癌細胞株の転移モデル

生能, CD44など接着分子発現は親株と比較し変化が見られなかったが, 皮下移植モデルにおいては, 遺伝子導入株の M-CSF の発現量に応じて増殖が抑制された。しかし, 多臓器転移モデルでは, 肝転移やリンパ節転移は抑制されたが, 腎転移は抑制されなかった⁴⁾(図2)。

M-CSF 遺伝子導入により癌細胞の転移パターンが変化したメカニズムを解析するために, M-CSF により活性化される標的細胞であるマクロファージが各臓器にどれくらい存在するのかを抗スカベンジャーレセプター受容体抗体を用いた免疫染色で検討した。常在マクロファージとして肺胞マクロファージや肝クッパー細胞が知られているが, 我々の検討でもマクロファージは肺や肝には多数存在するが腎には少なく(図3), M-CSF 遺伝子導入によっても腎臓で転移が抑制されなかったのはマクロファージ数が少ないためであろうと推定された。

また, 抗炎症性サイトカインである IL 10を肺腺癌細胞に導入した場合, *in vitro* における増殖能は変化しなかったが, 皮下移植モデルにおいて, IL 10導入株では

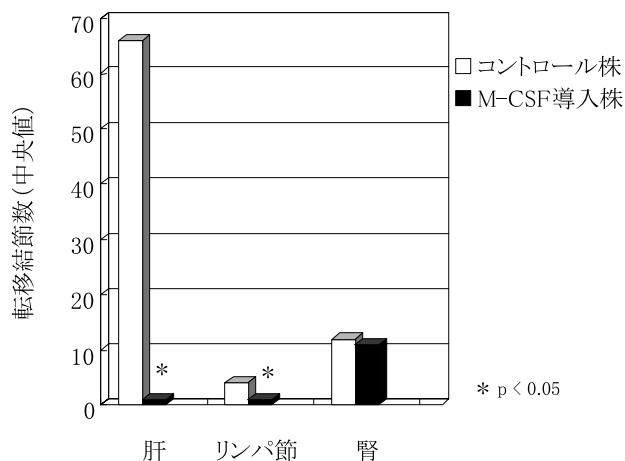


図2 M-CSF 遺伝子導入による転移抑制効果の臓器間格差

増殖が有意に抑制された。しかし, 多臓器転移モデルでは肺転移は有意に抑制されるものの腎転移は抑制されず, 臓器により転移抑制効果に格差がみられた。これについては, IL 10がマクロファージの VEGF 産生を抑制し血

スカベンジャーレセプター陽性
マクロファージ数/HPF

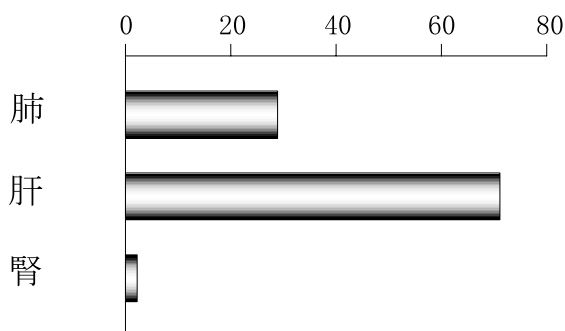


図3 常在マクロファージ数の臓器間格差

管新生を抑制することが報告されており⁵⁾、腎臓ではマクロファージが少ないため転移抑制が起こらなかったのではないかと推測している。以上の結果から、臓器微小環境の違い(マクロファージの数やおそらく質的な違い)によって、サイトカイン遺伝子導入による抗転移作用には臓器間格差が生じうる可能性が示唆された。

分子標的薬による転移抑制の臓器間格差

近年、癌進展に関与する因子に対し選択的に作用するいわゆる分子標的薬が数多く開発されている(表1)。従来の抗癌剤が核酸合成・修復や細胞分裂に関わる分子に作用し、殺細胞的に癌細胞を傷害するのにに対し、分子標的薬はがんの増殖・浸潤・転移にかかわる分子に pin point に作用し癌増殖をコントロールする薬剤であり癌細胞への特異性が高いと考えられている。以前は分子標的薬の効果は cytostatic で副作用がないと思われていたが、EGF 受容体阻害薬のように薬剤によっては腫瘍縮小効果も得られ、重篤な副作用も起こりうる事が明らかとなってきた。

我々は、分子標的薬として最も先行して臨床開発された MMP (マトリックスメタロプロテアーゼ) 阻害薬を用い、その治療効果は臓器微小環境により修飾されるか否かを我々の転移モデルにおいて検討した。

肺転移を形成する PC14PE6, H226は MMP 2または MMP 9を高発現していた。担癌マウスに腫瘍細胞接種当日から連日 MMP 阻害薬 (ONO 4817) を 1%混餌食として投与した。ONO 4817による MMP 阻害により、肺転移モデルにおいて MMP 活性の高い細胞株の肺転移は抑制された。興味深いことに、多臓器転移モデルにお

表1 肺癌に対する分子標的薬

| 分類 | Code | | 開発段階 | 併用療法 |
|--------------------------|-------------------------|-------------|----------------------|------------------|
| EGF 受容体阻害薬 | ZD1839 (ゲフィチニブ) | NSCLC | 承認 | |
| | OSI 774 | NSCLC | Phase III | |
| | IMC C225 | NSCLC | Phase II | CDDP |
| CDK 阻害薬 | Fravopiridol | NSCLC | Phase I/II | TXL |
| 抗 HER 2 抗体 | Trastuzumab (Herceptin) | NSCLC | Phase II Phase II | CBDCA + TXL |
| Farnesyl transferase 阻害薬 | L 778 ,123 | Solid tumor | Phase I/II | TXL |
| | R115777 | Solid tumor | Phase I/II | GEM, CPT 11 |
| 血管新生阻害薬 | Thalidomide | NSCLC | Phase III | CBDCA + TXL + RT |
| | Endostatin | Solid tumor | Phase I | |
| VEGF 受容体阻害薬 | SU5416 | NSCLC | Phase I/II | GEM + CDDP |
| | ZD6474 | NSCLC | Phase II | CBDCA + TXL |
| MMP 阻害薬 | Marimastat | SCLC | Phase III | |
| | | NSCLC | Phase III | |
| | Prinomastat | NSCLC | Phase III | GEM + CDDP |
| | CGS27023 | NSCLC | Phase III | |

いては MMP を発現していない株の腎転移とリンパ節転移は抑制されなかったが、肝転移は抑制された(表2)。Film in situ zymography (FIZ) 法を用いて *in vivo* の MMP (gelatinase) 活性を検討した結果を加味すると、1) 肺においては肺実質の MMP 活性はなく、腫瘍自身が発現する MMP が転移形成及び MMP 阻害薬の反応性に重要である、2) 肝においては肝実質が高い MMP 活性を有し MMP 発現の低い腫瘍の転移形成を促進している、3) 腎の MMP 発現は弱く、腫瘍細胞自身の MMP 発現が弱い場合 MMP 阻害薬の転移抑制効果がみられないことが推察された⁶⁾。

転移モデルにおける検討から臨床への提言

我々のモデルにおける検討では、MMP 阻害薬の肝転移抑制効果は7日目までに治療を開始した場合にのみ有意であり、MMP 阻害薬は転移形成の早い段階にのみ抑制効果を発揮するものと思われる⁶⁾(表3)。MMP 阻害薬については米国を中心に既に臨床試験が実施されている。Prinomastat や Marimastat などが進行期症例に対し、化学療法との併用効果が検証されたが有効性は証明

されなかった^{7,8)}。

一方、われわれは MMP を発現している PC14PE6 の肺転移モデルにおいて、MMP 阻害剤は微小転移巣が形成された後から投与を開始しても化学療法と併用することで有意な生存期間延長効果が得られることを報告している⁹⁾(図4)。

こうした基礎的検討から発信できる臨床へのメッセージとしては、腫瘍の MMP 発現は heterogenous と考えられるため、腫瘍内に MMP 活性がみられる腫瘍のみを対象とし可能な限り腫瘍量の少ない段階で投与を開始(化学療法との併用が望ましい)すれば MMP 阻害薬の治療効果が期待できるということである。具体的には、臨床的には限局性であるが微小転移が既に形成されている可能性の高いⅢ期症例に対し、手術により腫瘍の減量を行うとともに MMP 発現の有無を解析し、MMP 高発現の症例に対する手術後アジュバントとして用いるのが最適と考えられる。しかし、いかに MMP 発現を評価するのか、MMP 阻害薬が *in vivo* において作用しているか否かを判定するサロゲートマーカーの設定、MMP 阻害薬の投与期間の設定など解決されなければならない問題が山積しているのも事実である。

表2 MMP 阻害薬の転移抑制効果と臓器間格差

| 細胞株 (MMP 2発現) | 治療 | 転移結節: Median (Range) | | | |
|-------------------|---------|----------------------|--------------|----------|---------|
| | | 肺 | 肝 | 腎 | リンパ節 |
| PC14PE6 (+++) | Control | 13 (3-19) | | | |
| | MMP 阻害剤 | 4*(2-17) | | | |
| SBC 3/DOX () | Control | | 7(10-150) | 1(0-4) | 4(0-8) |
| | MMP 阻害剤 | | 4(6-102) | 0(0-3) | 4(0-7) |
| RERF-LC-A1 () | Control | | 12(73 > 150) | 3(18-49) | 3(0-12) |
| | MMP 阻害剤 | | 7(21 > 150) | 21(9-44) | 3(0-9) |

* p < 0.05

表3 投与開始時期の違いによる MMP 阻害薬の肝転移抑制効果の減弱

| 治療期間 | 肝転移数 (中央値) | 肝重量 (g) (中央値) |
|----------|---------------|------------------|
| コントロール | 99 | 5.44 |
| Day 1~28 | 81 | 2.77 |
| Day 3~28 | 84 | 2.63 |
| Day 7~28 | 89 | 2.45 |
| Day14~28 | 100 | 4.53 |

NK 細胞除去 SCID マウスに SBC 3/DOX 細胞を静注。
MMP 阻害薬 (ONO 4817) は上記の期間投与。
28日目に肝転移数と肝重量を測定。

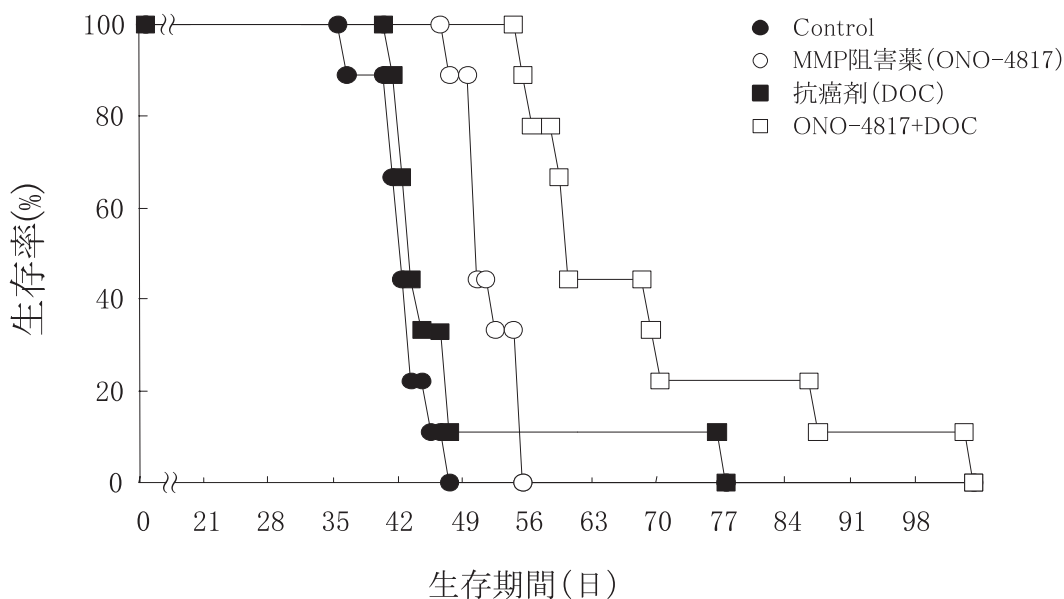


図4 MMP 阻害薬と化学療法併用による肺転移担癌マウスの生存期間延長

おわりに

我々は、転移の分子機構の解明から新規治療法の開発を目標に、臨床を反映した多臓器転移モデルを用いてトランスレショナルリサーチを行っている。マウスを用いたモデルで得られた情報が必ずしも即臨床にあてはめることができるわけではないが、新たな治療法が臨床に導入されるためにはこうした前臨床試験の成績が必要不可欠であり、今後も常に臨床応用を念頭においた解析を進めていきたい。

文 献

- 1) Yano, S., Nishioka, Y., Izumi, K., Tsuruo, T., *et al.* : Novel metastasis model of human lung cancer in SCID mice depleted of NK cells. *Int. J. Cancer* 67 : 211-217, 1996
- 2) Miki, T., Yano, S., Hanibuchi, M., Sone, S. : Bone metastasis model with multiorgan dissemination of human small-cell lung cancer (SBC 5) cells in natural killer cell-depleted SCID mice. *Oncol. Res.*, 12 : 209-217, 2000
- 3) Yano, S., Nokihara, H., Hanibuchi, M., Parajuli, P., *et al.* : Model of malignant pleural effusion of human lung adenocarcinoma in SCID mice. *Oncol. Res.*, 9 : 573-579, 1997
- 4) Yano, S., Nishioka, Y., Nokihara, N., Sone, S. Macrophage colony-stimulating factor-gene transduction into human lung cancer cells differentially regulates metastasis formations in various organ microenvironments of NK-cell depleted SCID mice. *Cancer Res.*, 57 : 784-789, 1997
- 5) Huang, S., Xie, K., Bucana, D.C., Ullrich, S.E., *et al.* : Interleukin 10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells : potential inhibition of angiogenesis. *Clin. Cancer Res.*, 12 : 1969-1979, 1996
- 6) Shiraga, M., Yano, S., Yamamoto, A., Ogawa, H., *et al.* : Organ heterogeneity of host-derived matrix metalloproteinase expression and its involvement in multiple-organ metastasis by lung cancer cell lines. *Cancer Res.*, 62 : 5967-5973, 2002
- 7) Shepherd, F.A., Giaccone, G., Debruyne, C., *et al.* : Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial of Marimastat in Patients with Small Cell Lung Cancer (SCLC) Following Response to First-Line Chemotherapy : an NCIC-CTG and EORTC Study. *Proceeding Am. Soc. Clin. Oncol.*, 20 : 11a, 2001
- 8) Smylie, M., Mercier, R., Aboulafia, D., *et al.* : Phase III Study of the Matrix Metalloproteinase (MMP) Inhibitor Prinomastat in Patients Having Advanced Non-Small

- Cell Lung Cancer(NSCLC) Proceeding Am. Soc. Clin. Oncol., 20 : 1228a 2001
- 9) Yamamoto, A., Yano, S., Shiraga, M., Ogawa, H., *et al.* : A Third generation matrix metalloproteinase (MMP)Inhibitor(ONO 4817)combined with docetaxel suppresses progression of lung-micrometastasis of MMP expressing tumor cells in nude mice. Int. J. Cancer ,103 : 822 828 2003

Analysis of molecular pathogenesis of lung cancer metastasis using with multiple-organ metastasis models, and application for novel therapeutic modality

Seiji Yano

Department of Internal Medicine and Molecular Therapeutics, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima, Japan

SUMMARY

Lung cancer is a leading cause of malignancy-related death worldwide, and over 90% of deaths from lung cancer can be attributed to metastases. To explore molecular pathogenesis of lung cancer, we recently established multiple-organ metastasis models of human lung cancer cells in SCID mice depleted of NK cells. The pattern of metastasis in our models is similar with that observed in lung cancer patients. Using our models, we have shown that overexpression of cytokines, such as macrophage colony-stimulating factor and interleukin-10, resulted in organ-specific inhibition of metastasis by human lung cancer cell lines, suggesting differential regulation of metastasis by organ microenvironment. We further demonstrated that expression of human cancer cells were heterogenous, and that anti-metastatic effect of MMP inhibitor, a molecular targeted drug, could be organ specific, consistent with the results in recent clinical trials. Further intensive analyses using clinically relevant metastasis models (e.g., multiple-organ metastasis models) are warranted for establishment of novel, effective treatment for lung cancer metastasis.

Key words : lung cancer, metastasis, organ environment, heterogeneity, molecular targeted drug