

平成30年 5月30日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21359

研究課題名(和文) 微小乳頭肺腺癌の生物学的特性の解明と腫瘍特異的マーカーの獲得

研究課題名(英文) Elucidation of biological properties and acquisition of tumor-specific marker for micropapillary predominant lung adenocarcinoma

研究代表者

長塩 亮 (Nagashio, Ryo)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：40618568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺の微小乳頭腺癌(MPPAC)の生物学的特性の解明とその鑑別マーカー獲得のため、MPPAC細胞株の癌幹細胞様細胞を樹立し、2次元電気泳動法による解析を行った。同定されたタンパク質であるNAP1L1について、肺癌における診断的有用性を評価するため、肺癌組織を用いて免疫染色を行った。その結果、腺癌でのNAP1L1発現は分化度、腫瘍径、病理学的ステージ、リンパ節転移、リンパ管侵襲、血管侵襲、そして予後不良と有意に相関していた。多変量解析の結果からNAP1L1は独立した予後不良因子であった。以上より、NAP1L1は腺癌の悪性度や予後予測マーカーとして有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the biological properties of lung micropapillary predominant adenocarcinoma (MPPAC) and to acquisition of differential bio-marker for lung AC, we performed proteome analysis using MPPAC-4F cells established as cancer stem cell-like cell. Of the identified proteins, we focused on NAP1L1. To evaluate the diagnostic utility of NAP1L1 in lung cancer, immunohistochemistry was performed using lung cancer tissues. As a result, NAP1L1 expression in AC significantly correlated with poorer differentiation, tumor size, higher pathological stage, N factor, lymphatic invasion, vascular invasion, and poorer prognosis of AC patients. Furthermore, multivariate analysis confirmed that NAP1L1 expression increased the hazard of death after adjusting for the other clinicopathological factors. These findings suggest that NAP1L1 expression seems to be an independent and significant predictor of poorer survival of AC patients.

研究分野：疾患プロテオミクス

キーワード：肺腺癌 微小乳頭肺腺癌 プロテオミクス 癌幹細胞 NAP1L1 診断マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は代表的な難治性癌であり、我が国において男性癌死の第1位、女性も第2位である。肺癌の内、非小細胞癌は約8割を占め、その5割以上、特に女性は約7割が腺癌である。新たにWHOに加わった微乳頭腺癌(MPPAC)は線維や血管の芯を持たないmicropapillary pattern(MPP)を示す成分を含み、それが少量でも存在すると早期にリンパ管侵襲や転移を起こすため予後不良である。しかしながら、MPPACの予後不良に関連するタンパク質の同定や、遺伝子の発現などは未だに不明である。本研究ではMPPAC細胞株と肺腺癌由来A549細胞株の差異をより詳細に比較検討するため、両細胞株よりtotal RNAを抽出し、GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0を用いた遺伝子発現アレイ解析を行った。A549細胞に比してMPPAC細胞で高い発現を示す遺伝子群を見てみると神経系の細胞に発現している遺伝子やより幼若な細胞に発現を示すステムセルマーカーなどに差が認められた。

## 2. 研究の目的

近年、増加傾向にある肺腺癌のうち、MPPACは、その成分が少量でも早期に高度のリンパ管侵襲や転移を来し、予後不良であることが知られているがMPP成分と高い浸潤能や転移能との関連における分子メカニズムは未だ不明である。申請者は、MPPACの高い脈管侵襲能や転移能における分子メカニズムを解明するために、当研究室で樹立し保有しているMPPAC細胞株を用いた遺伝子発現アレイ解析とMPPAC細胞に対しiPS化の技術を応用することで、癌幹細胞様細胞の樹立し、その癌幹細胞様細胞を用いたプロテオーム解析を行った。その結果、肺腺癌の悪性度に寄与する因子を同定し、MPPACの生物学的特性を明らかにすること、さらに診断に有用なマーカーを探索することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) MPPAC細胞と非MPPAC細胞の遺伝子発現の比較

MPPAC細胞と非MPPAC細胞における遺伝子発現量を比較するために、GeneChipを用いた遺伝子発現アレイ解析を行った。

### (2) iPS化の技術を応用した癌幹細胞様細胞の樹立

山中4因子をMPPAC細胞に導入することで癌幹細胞様の細胞株を樹立する。樹立した細胞株は幹細胞マーカーの特徴であるALP活性測定や幹細胞マーカーの染色性にて癌幹細胞性の評価を行った。

### (3) 親株と癌幹細胞様細胞を用いたプロテオーム解析

樹立した癌幹細胞様細胞株とその親株のタンパク質を用いた二次元電気泳動法によるプロテオーム解析により、両者で発現量の異なるタンパク質を同定した。

### (4) 肺癌組織を用いた鑑別診断、予後予測マーカーとしての評価

両者で発現量に相違のあるタンパク質として同定されたマーカー候補タンパク質に対する抗体を購入し、肺癌組織を用いた免疫染色により、鑑別診断マーカー、予後予測マーカーとしての評価を行った。

### (5) 発現量に差のあったタンパク質の細胞株を用いた浸潤・転移能との関連性の評価

マーカー候補として有望なタンパク質について増殖や浸潤・転移との関連性を評価するためsiRNAを用いて、増殖能(MTS assay)や創傷治癒アッセイ(Wound healing assay)、3次元コラーゲンゲルを用いた細胞の浸潤能の評価(Transwell assay)を行った。その結果からマーカー候補タンパク質の浸潤・転移能への関連性を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) MPPAC細胞と非MPPAC細胞の遺伝子発現の比較

MPPAC細胞と非MPPAC細胞の遺伝子発現の比較を行うため、A549、LC2/ad、及びMPPAC細胞からtotal RNAを抽出し、GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0を用いた遺伝子発現アレイ解析を行った。その結果、A549とLC2/adでは発現せず、MPPACのみで発現していた遺伝子は1430個検出され、神経内分泌特性と関わり深いINSM1やASCL1といった遺伝子の他、ステムセル関連の遺伝子が高発現していた。また、同じ細胞株のtotal RNAを用いてmicroRNA array解析を行った。その結果、MPPACのみに発現が認められたmicroRNAは34種、MPPACのみに発現が認められなかったmicroRNAは26種であった。MPPAC細胞で高発現していたmicroRNAには肺腺癌でRhoGDI1やALCAMを標的として浸潤や転移を促進するmiR-483-5pなども含まれていた。

### (2) iPS化の技術を応用した癌幹細胞様細胞の樹立

MPPACの発生のメカニズムや起源などの生物学的特性を明らかにすること、また新規の肺腺癌の診断マーカーの獲得を目的として、山中4

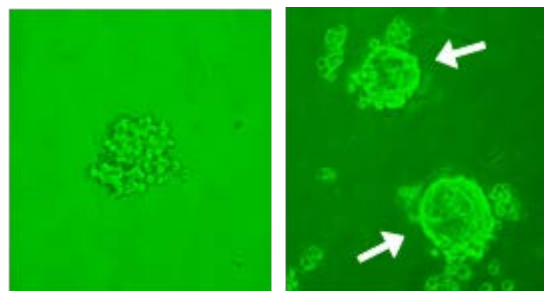


図1. 超低接着ディッシュを用いた胚葉体形成能の確認。矢印は胚葉体を示す。

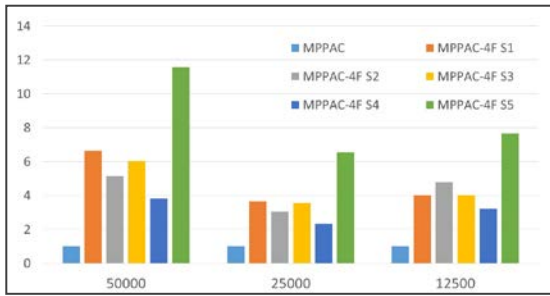


図 2. ALP 活性測定の結果。縦軸は ALP 活性の相対値、横軸は使用した細胞数を表す。

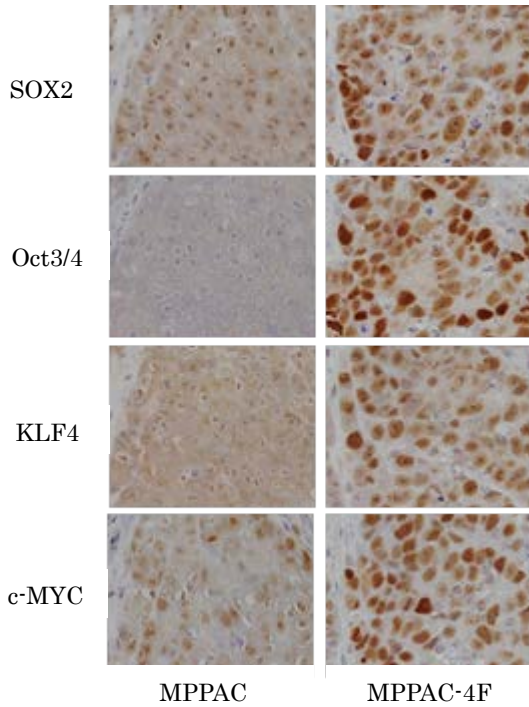


図 3. マウス移植腫瘍における山中 4 因子の発現。左：MPPAC、右：MPPAC-4F。

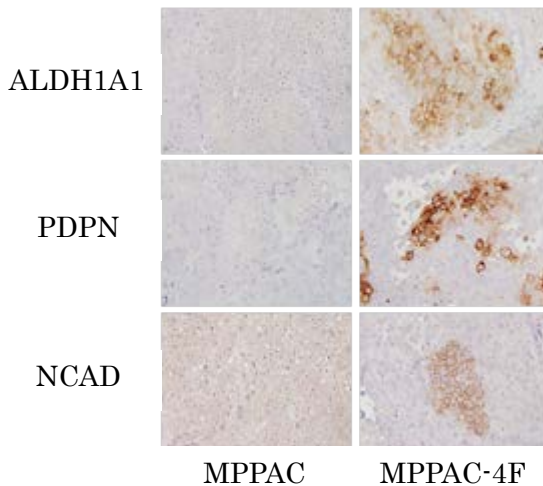


図 4. 各種マーカーの発現の確認。左：MPPAC、右：MPPAC-4F。

因子である Sox2、KLF4、Oct3/4、c-Myc を MPPAC 細胞にウイルスベクターを用いて導入することで、MPPAC の癌幹細胞様細胞を樹立した(図 1)。これら 4 因子を加えた細胞は親株である MPPAC 細胞に比べ、癌幹細胞性の指標とな

るアルカリフォスファターゼ活性やアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ABCG2、nestin といった幹細胞関連マーカーの発現が高く、また肺の発生の初期にしか発現しない podoplanin を発現していたことから、この細胞を癌幹細胞様の特徴を有する MPPAC-4F 細胞として樹立した(図 2-4)。この MPPAC-4F 細胞と親株である MPPAC 細胞を比較することで、癌幹細胞の特徴を示すタンパク質が同定可能であると考えた。

### (3) 親株と癌幹細胞様細胞を用いたプロテオーム解析

両者のタンパク質を用いた 2 次元電気泳動法による発現解析を行った結果、両者で発現量に 1.2 倍以上の差を認めたタンパク質スポットは 96 個存在した。これらのタンパク質スポットは質量分析装置を用いてタンパク質を同定した(図 5)。

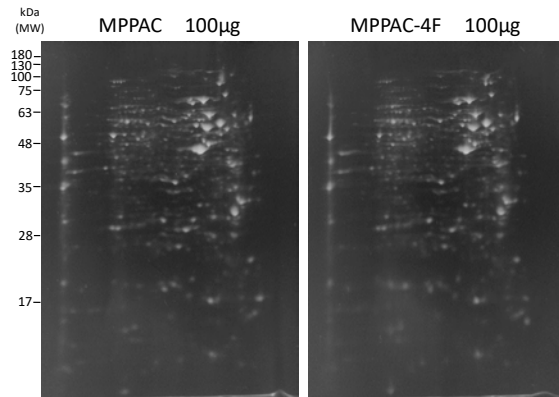


図 5. 二次元電気泳動法によるタンパク質発現量の比較。左：MPPAC、右：MPPAC-4F。

### (4) 肺癌組織を用いた鑑別診断、予後予測マーカーとしての評価

同定されたタンパク質の中で、MPPAC-4F 細胞で高発現していた Cofilin-1、NAP1L1、ARF1、ZFAND3 に着目し、肺癌組織マイクロアレイを用いて肺腺癌における発現を免疫染色法にて評価した。Cofilin-1 は核陽性と分化度に関して有意な相関が認められた。また、NAP1L1 発現は分化度、腫瘍径、病理学的ステージ、胸膜浸潤、リンパ管浸潤、血管浸潤と有意な相関が認められた。さらに、ARF1 発現はリンパ節転移とリンパ管浸潤で有意な相関が認められた。一方、ZFAND3 発現は臨床病理学的因子と有意な相関が認められないものの、ZFAND3 高発現群が低発現群に比べ有意に予後不良であることが分かった。多くの臨床病理学的因子との高い相関性を示した NAP1L1 について、予後との関連を調べるため、多数例の新たなコホートの肺癌組織を用いて NAP1L1 発現と臨床病理学的因子との関係性を検証した。その結果、肺癌組織マイクロアレイを用いた場合と同様に NAP1L1 発現は分化度、病理学的ステージ、リンパ節転移、胸膜浸潤、リンパ管浸潤、血管浸潤と有意な相関を示した(表 1)。また、肺腺癌症例を NAP1L1 染色スコアの中央値を境に 2 群に分けて予後を評価したところ、NAP1L1 低発現群に

表1.肺腺癌におけるNAP1L1発現と臨床病理学的因子との相関

	n	染色スコア	陽性率	p値	
年齢	<65	77	3.8	96.1	0.43512
	≥65	70	3.4	95.7	
性別	男	83	3.6	94	0.91463
	女	64	3.7	98.4	
喫煙歴	0	68	3.5	98.5	0.45792
	1	79	3.7	93.7	
分化度	WD	78	2.9	93.6	<b>0.00014</b>
	MD,PD	69	4.4	98.6	
腫瘍径	<2cm	31	2.7	96.8	<b>0.01882</b>
	≥2cm	115	3.9	95.7	
stage	I	88	2.8	94.3	<b>0.00001</b>
	II,III	59	4.8	98.3	
T因子	1	72	3.1	93.1	0.03249
	2,3,4	75	4.1	96	
N因子	-	108	3.1	94.4	<b>0.00001</b>
	+	39	5.1	100	
胸膜浸潤	-	98	3.5	95.9	0.39542
	+	49	3.9	95.9	
肺内転移	0	138	3.5	95.7	<b>0.02955</b>
	1	9	5	100	
リンパ管侵襲	-	79	2.9	93.7	<b>0.00019</b>
	+	43	4.7	97.7	
血管侵襲	-	77	2.8	94.8	<b>0.00008</b>
	+	54	4.7	96.3	

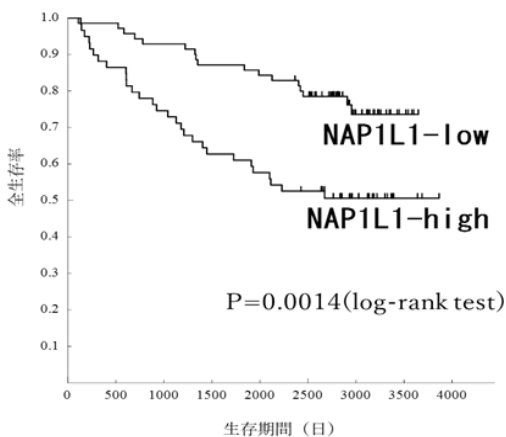


図 6. 肺腺癌患者の生存曲線

表2.Cox回帰比例ハザード分析による多変量解析

臨床病理学的因子	HR	95%CI	p値	
NAP1L1 スコア	低発現vs高発現	2.461	1.22~4.96	0.0118
年齢	<65歳 vs ≥65歳	n/d	n/d	n/d
性別	男性 vs 女性	n/d	n/d	n/d
喫煙歴	無しvs有り	n/d	n/d	n/d
分化度	中・低 vs 高	n/d	n/d	n/d
腫瘍径	<5cm vs ≥5cm	13.83	5.88~32.53	<0.0001
病理学的 stage	I vs II-IV	n/d	n/d	n/d
胸膜浸潤	無しvs有り	n/d	n/d	n/d
肺内転移	無しvs有り	2.50	1.13~5.51	0.0235
リンパ管転移	無し vs 有り	n/d	n/d	n/d
リンパ管侵襲	無しvs有り	3.00	1.30~6.91	0.0097
血管侵襲	無しvs有り	n/d	n/d	n/d

\*HR:ハザード比, CI:信頼区間, n/d: not done

比して、高発現群では有意に予後不良であった(図 6)。さらに、COX 比例ハザード回帰モデルを用いた多変量解析の結果、NAP1L1 発現は独立した予後不良因子であることも分かった(表 2)。

### (5) 発現量に差のあったタンパク質と浸潤・転移能との関連性の評価

NAP1L1 発現と肺腺癌における悪性度との関係を明らかにすることを目的として、siRNA を用いて NAP1L1 の発現抑制実験を行った。初めに siRNA 処理条件の至適化を行うため、リアルタイム定量 RT-PCR 法、並びにウエスタンブロット法による確認を行い、NAP1L1 の発現が十分に抑制される処理濃度と処理時間を決定した。次にその条件を用いて、細胞の増殖能を測定するた

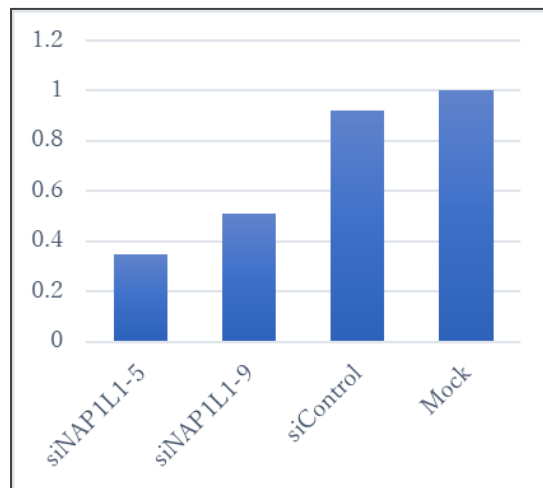


図 7. Wound healing assay  
コントロール細胞に比べ NAP1L1 発現を抑制した細胞では遊走能が低下している

めの MTS アッセイと細胞の遊走能(運動能)の変化を調べるための Wound healing assay (創傷治癒アッセイ)、さらに浸潤能との関連についてはボイデンチャンバーを用いた細胞浸潤アッセイを行った。MTS アッセイでは、NAP1L1 発現を抑制していないコントロール細胞に比して、NAP1L1 の発現を抑制した細胞では有意な増殖速度の低下を認めた。また、創傷治癒アッセイでは、コンフルエントな状態の単層培養細胞に一定の幅の引っかき傷をつけ、その後、傷の修復具合を測定し比較したところ、コントロール細胞に比べ NAP1L1 の発現を抑制した細胞では有意に遊走能が低下していた(図 7)。さらに、細胞浸潤アッセイにおいてもコントロール細胞に比べ、浸潤能が有意に低下していた。これらのことから、NAP1L1 は肺腺癌の診断マーカーとしてだけでなく、増殖能や遊走能、そして浸潤能に寄与している可能性が示唆された。NAP1L1 は MPPAC-4F 細胞の培養上清タンパク質を用いたウエスタンブロット法の結果から、培養上清中への NAP1L1 の分泌が確認されており、今後、血清診断マーカーとしての有用性についても検討していく。

以上のことから、NAP1L1 は MPPAC 特異的なマーカーとはならないが、有用な予後予測マーカーであり、浸潤や転移など癌の悪性度を規定する分子メカニズムにおいて重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

(1) Nagashio R, Oikawa S, Yanagita K, Hagiuda D, Kuchitsu Y, Igawa S, Naoki K, Satoh Y, Ichinoe M, Murakumo Y, Saegusa M, Sato Y. Prognostic significance of G6PD expression and localization in lung adenocarcinoma. *Biochim Biophys Acta*. 2018, in press. (査読有り)

DOI: 10.1016/j.bbapap.2018.05.005

- (2) Yanagita K, **Nagashio R**, Jiang SX, Kuchitsu Y, Hachimura K, Ichinoe M, Igawa S, Fukuda E, Goshima N, Satoh Y, Murakumo Y, Saegusa M, Sato Y. Cytoskeleton-Associated Protein 4 Is a Novel Serodiagnostic Marker for Lung Cancer. *Am J Pathol*. 2018, in press. (査読有り)  
DOI: 10.1016/j.ajpath.2018.03.007
- (3) Matsumoto T, **Nagashio R**, Ryuge S, Igawa S, Kobayashi M, Fukuda E, Goshima N, Ichinoe M, Jiang SX, Satoh Y, Masuda N, Murakumo Y, Saegusa M, Sato Y. Basigin expression as a prognostic indicator in stage I pulmonary adenocarcinoma. *Pathol Int*. 2018, 68:232-240. (査読有り)  
DOI: 10.1111/pin.12646
- (4) Kobayashi M, **Nagashio R**, Saito K, Aguilar-Bonavides C, Ryuge S, Katono K, Igawa S, Tsuchiya B, Jiang SX, Ichinoe M, Murakumo Y, Saegusa M, Satoh Y, Sato Y. Prognostic significance of S100A16 subcellular localization in lung adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2018, 74:148-155. (査読有り)  
DOI: 10.1016/j.humpath.2018.01.001
- (5) Minami S, Matsumoto K, **Nagashio R**, Hagiuda D, Fukuda E, Goshima N, Hattori M, Tsuchiya B, Hachimura K, Jiang SX, Saegusa M, Iwamura M, Sato Y. Analysis of Autoantibodies Related to Tumor Progression in Sera from Patients with High-grade Non-muscle-invasive Bladder Cancer. *Anticancer Res*. 2017, 37:6705-6714. (査読有り)  
<http://ar.iiarjournals.org/content/37/12/6705.long>
- (6) Katono K, Sato Y, Kobayashi M, **Nagashio R**, Ryuge S, Igawa S, Ichinoe M, Murakumo Y, Saegusa M, Masuda N. S100A16, a promising candidate as a prognostic marker for platinum-based adjuvant chemotherapy in resected lung adenocarcinoma. *Oncotargets Ther*. 2017, 10:5273-5279. (査読有り)  
DOI: 10.2147/OTT.S145072
- (7) Katono K, Sato Y, Kobayashi M, Saito K, **Nagashio R**, Ryuge S, Igawa S, Nakashima H, Shiomi K, Satoh Y, Ichinoe M, Murakumo Y, Saegusa M, Masuda N. Clinicopathological Significance of S100A14 Expression in Lung Adenocarcinoma. *Oncol Res Treat*. 2017, 40:594-602. (査読有り)  
DOI: 10.1159/000478100
- (8) Ryuge S, Sato Y, **Nagashio R**, Hiyoshi Y, Katono K, Igawa S, Nakashima H, Shiomi K, Ichinoe M, Murakumo Y, Saegusa M, Satoh Y, Masuda N. Prognostic significance of nestin expression in patients with resected non-small cell lung cancer treated with platinum-based adjuvant chemotherapy; relationship between nestin expression and epithelial to mesenchymal transition related markers. *PLoS One*. 2017, 12:e0173886. (査読有り)  
DOI: 10.1371/journal.pone.0173886
- (9) Igawa S, Sato Y, Ryuge S, Ichinoe M, Katono K, Hiyoshi Y, Otani S, **Nagashio R**, Nakashima H, Katagiri M, Sasaki J, Murakumo Y, Satoh Y, Masuda N. Impact of PD-L1 Expression in Patients with Surgically Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *Oncology*. 2017, 92:283-290. (査読有り)  
DOI: 10.1159/000458412
- (10) Kuji S, Watanabe R, Sato Y, Iwata T, Hirashima Y, Takekuma M, Ito I, Abe M, **Nagashio R**, Omae K, Aoki D, Kameya T. A new marker, insulinoma-associated protein 1 (INSM1), for high-grade neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix: Analysis of 37 cases. *Gynecol Oncol*. 2017, 144:384-390. (査読有り)  
DOI: 10.1016/j.ygyno.2016.11.020
- (11) Nishimura M, **Nagashio R**, Sato Y, Hasegawa T. Late Somatic Gene 2 disrupts parental spheroids cooperatively with Volvox hatching enzyme A in Volvox. *Planta*. 2017, 245:183-192. (査読有り)  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-016-2599-y>
- (12) **長塩亮**. 抗体作製を基盤とした肺癌の診断並びに予後予測マーカーの獲得. *Proteome Letters*. 2017, 2:47-51. (査読有り)  
<https://www.jhupo.org/data/proteomeletters/17006.pdf>
- (13) 柳田 憲吾, 萩生田 大介, 朽津 有紀, 井上 航, 井川 聡, 龍華 慎一郎, 三枝 信, **長塩亮**, 鉢村 和男, 佐藤 雄一. 肺癌における細胞膜タンパク質同定と血清診断マーカーとしての有用性の検討. *電気泳動*. 2017, 61: 120-123. (査読有り)  
DOI: 10.2198/electroph.61.120
- (14) 佐藤 雄一, **長塩亮**, 柳田 憲吾, 萩生田 大介, 朽津 有紀, 井上 航. 各種プロテオーム手法で獲得したマーカーの非小細胞性肺癌における術後補助化学療法への応用. *電気泳動*. 2017, 61: 128-131. (査読有り)  
DOI: 10.2198/electroph.61.128
- (15) 柳田 憲吾, 萩生田 大介, 朽津 有紀, 鈴木 杏奈, 井上 航, 松本 梨沙, 龍華 慎一郎, 三枝 信, 村雲 芳樹, **長塩亮**, 鉢村 和男, 佐藤 雄一. Reverse-phase protein array法を用いた血清診断マーカーの探索. *電気泳動*.

2017, 61:23-28(査読有り)  
DOI: 10.2198/electroph.61.23

(16) **長塩 亮**, 萩生田 大介, 朽津 有紀, 柳田 憲吾, 鉢村 和男, 佐藤 雄一. 癌幹細胞様微小乳頭肺腺癌細胞株を用いたプロテオーム解析. 電気泳動. 2017, 61: 39-44.(査読有り)  
DOI: 10.2198/electroph.61.39

(17) Katono K, Sato Y, Jiang SX, Kobayashi M, Saito K, **Nagashio R**, Ryuge S, Satoh Y, Saegusa M, Masuda N. Clinicopathological Significance of S100A10 Expression in Lung Adenocarcinomas. Asian Pac J Cancer Prev. 2016, 17:289-294. (査読有り)  
[http://journal.waocp.org/article\\_31842.html](http://journal.waocp.org/article_31842.html)

#### [学会発表](計 7 件)

(1) **長塩亮**, 柳田憲吾, 萩生田大介, 朽津有紀, 井上航, 鉢村和男, 佐藤雄一. 肺腺癌における NAP1L1 発現の診断的有用性について. 第 68 回日本電気泳動学会総会(2017)

(2) **長塩亮**, 萩生田大介, 朽津有紀, 柳田憲吾, 鉢村和男, 佐藤雄一. 癌幹細胞化させた微小乳頭肺腺癌細胞株を用いたプロテオーム解析. 第 67 回日本電気泳動学会総会 (2016)

(3) **長塩亮**. 抗体作製を基盤とした肺癌の診断並びに予後予測マーカーの獲得. 日本プロテオーム学会 2016 年大会 (2016)

(4) **長塩亮**, 柳田憲吾, 萩生田大介, 鉢村和男, 土屋紅緒, 蔣世旭, 村雲芳樹, 佐藤雄一. 肺癌における TTF-1 の細胞質局在と予後因子としての有用性について. 第 105 回日本病理学会総会 (2016)

(5) **長塩亮**, 塩見 和, 柳田憲吾, 萩生田大介, 斉藤慶汰, 鉢村和男, 佐藤雄一. 肺悪性中皮腫における新規バイオマーカーの探索. 第 67 回日本電気泳動学会総会 (2016)

(6) **長塩亮**, 柳田 憲吾, 萩生田 大介, 斉藤慶汰, 鉢村 和男, 佐藤 雄一. 肺癌における TTF-1 の細胞質局在と予後との関連について. 日本プロテオーム学会 2015 年会 (2015)

(7) **長塩亮**, 柳田 憲吾, 鉢村 和男, 龍華 慎一郎, 蔣 世旭, 中島 裕康, 土屋 紅緒, 村雲芳樹, 三枝 信, 佐藤 雄一. エクソゾーム含有蛋白質を免疫源に作製した抗体の肺腺癌における血清診断マーカーとしての有用性について. 第 104 回日本病理学会総会 (2015)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長塩 亮(NAGASHIO, Ryo)  
北里大学・医療衛生学部・講師  
研究者番号:40618568