

令和元年5月30日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15249

研究課題名(和文) 肺腺癌における上皮-間葉移行(EMT)を標的とした早期血清診断マーカーの獲得

研究課題名(英文) Acquisition of sero-diagnostic markers for epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma

研究代表者

土屋 紅緒 (TSUCHIYA, BENIO)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：80286385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：上皮-間葉移行(EMT)により間質細胞様の形質を獲得した癌細胞は、浸潤・転移しやすい微小環境を周囲に作り出すとともに、種々の癌治療に抵抗性となる。そこで癌特有の微小環境が構築される以前の早い段階でEMTの判別と治療抵抗性を予測し得る血清診断マーカーの獲得を目的として、EMTを誘導した肺腺癌細胞で分泌が亢進するタンパク質を網羅的に解析した。結果、細胞外基質タンパクやサイトカインを含む34個のタンパク質を「マーカー候補」として同定した。中でもLUMやMIFは肺腺癌患者血清中への分泌亢進が認められ、EMTに基づく高悪性度症例を早期に検出できるバイオマーカーとしての有用性が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の治療におけるEMT制御の必要性は広く認識されているものの、EMTを標的とした血清診断マーカーの獲得を目的とした研究は行われておらず、本研究で得られた結果はこの分野の先行研究として役立つものと思われる。外科的切除に加えて適切かつ積極的な追加治療を行う必要のある、早期に再発や転移を起こす可能性の高い患者を選択できれば、肺癌患者の予後改善につながると考える。

研究成果の概要(英文)：Epithelial-mesenchymal transition(EMT) is a key process that drives cancer metastasis and drug resistance, and has been reported for the association with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. Novel sensitive and specific blood-based biomarkers are needed to detect EMT phenotype at an early stage and to individualize treatment strategies. We performed secretome analysis to identify the secreted proteins from EMT induced lung adenocarcinoma cells. Thirty-four secretory proteins including extracellular matrix proteins and cytokines were found to be upregulated in EMT cells. The serum LUM and MIF expression levels were significantly higher in lung adenocarcinoma patients than in healthy controls. Identification of aberrantly secreted proteins from EMT induced cells might facilitate the development of sero-diagnostic markers for early detection and monitoring therapeutic effectiveness for lung adenocarcinoma.

研究分野：人体病理学

キーワード：肺腺癌 上皮-間葉移行(EMT) 血清診断マーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌の罹患率は年々上昇しており、2020年には患者数が12万人を超えることが予想されている。特に肺腺癌では半数の患者が初診時すでに切除不能な進行癌であるため全体の5年生存率は未だ低く、難治性癌の代表である。肺癌の予後改善のために分子標的治療をはじめとする新たな治療法が次々と報告されているが、その効果は必ずしも満足のものではない。この予後不良の原因の一つとして、抗癌剤や分子標的治療薬に対する薬剤耐性の出現がある。

腫瘍細胞の浸潤性増殖の基本メカニズムとされる上皮-間葉移行(EMT)を認める腫瘍細胞は種々の抗癌剤や分子標的治療薬に耐性で、かつ放射線治療にも抵抗性を示すこと、さらにはEMTが癌細胞の発生源と考えられている「癌幹細胞」における自己複製能および多分化能の維持に重要な役割を果している可能性が報告されたことから、早い時点でのEMTの制御が新たな治療標的として注目され始めている。しかし現状ではEMTの血清診断マーカーは無く、早期にEMTを検出することやEMTを獲得しやすい癌患者の選択は困難である。EMTを標的とした早期診断マーカーを獲得できれば、予後不良の転帰をとると予想される肺癌患者を外科的切除が可能な時期に見出し、早い段階で積極的な治療に結びつけることにより予後に貢献できるものと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、血清診断マーカー候補として、EMTの形質を獲得した癌細胞で発現が亢進するタンパク質の中で、癌細胞自身だけでなく周囲の癌間質を構成するさまざまな細胞の機能にも重要な役割を果していると考えられる「分泌タンパク質」に着目した。EMTを誘導した肺腺癌細胞とEMTを認めない親株の両者における分泌タンパク質を網羅的に解析することでEMTに関連して変動する分子を同定し、候補タンパク質とする。さらに予後を含む臨床病理学的因子の詳細がわかっている多数例の肺腺癌患者血清および肺癌組織を用いて、得られた候補タンパク質のバイオマーカーとして有用性を評価し、EMTを標的とした血清診断マーカーを獲得することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) EMTの誘導過程における分泌タンパク質の変動の解析

EMTの誘導: EMT形質を認めない肺腺癌細胞A549をEMT誘導因子としてTGF- β を主成分とするStemXVivo EMT inducing media supplement(R&D Systems)を含む培地で培養することにより、EMTの誘導を行った(A549-EMT)。EMT獲得の確認は、細胞の形態変化およびwestern blot法を用いてEMTマーカーの発現を検出することにより行った。培地に含まれるウシ胎児血清などのタンパク質を除去し、培養細胞から分泌されたタンパク質のみを抽出するために、EMT誘導後2日および4日目の細胞の培地を無タンパク培地に交換して24時間培養することにより得られたconditioned mediumを解析に用いた。

セクレトーム解析: EMTの誘導に伴って分泌が変化するタンパク質のプロファイルを作成するために、以下の方法を行った。得られたconditioned mediumからアセトン沈殿法で析出、濃縮したタンパク質を用いて二次元電気泳動を行い、目視および定量解析ソフトを用いて親株に比べEMT細胞で1.5倍以上の発現増加を認めるタンパク質が存在することを確認した。さらに、二次元電気泳動法では微量のタンパク質が検出感度以下になっている可能性が考えられたため、conditioned medium中のタンパク質を濃縮・精製してLC-MS(液体クロマトグラフィー質量分析)を用いたショットガン解析を行うことにより網羅的に検出することで、EMT誘導に伴い分泌されるタンパク質のプロファイルを作成した。

(2) 肺腺癌患者血清中の「候補タンパク質」の発現解析

ショットガン解析によりEMT誘導細胞(A549-EMT)で親株(A549)に比べ、2倍以上の分泌亢進を認めたタンパク質を「候補タンパク質」として、健常人および肺腺癌患者血清中を用いてEMTの血清診断マーカーとしての可能性を評価するために、当研究グループで確立した高感度で再現性の高い血清アレイ解析法(RPPA法)による検討を行った。この方法は、多数例の血清を1枚のプロテイン・アレイ用のガラス基板にスポット状に固相化して乾燥させた後、候補タンパク質に対する抗体および蛍光標識二次抗体を反応させて得られた発光強度から血中のタンパク量を解析するもので、安定してhigh through putな検出が可能である。異なる基板間での半定量的解析を行うために、スタンダードとして各ガラス基板に合成した候補タンパク質0.1ng/mlを載せて同時に反応させ、患者血清の数値を相対値で表した。

(3) 肺癌組織を用いた血清診断マーカーとしての有用性の評価

候補タンパク質に対する抗体を購入し、血清の解析に用いた症例のうち治療効果や予後のわかっている肺腺癌組織を用いて免疫染色を行い、腫瘍内発現の程度や分化度、stage、EMTマーカーの発現との関連を検討した。

4. 研究成果

(1) EMT誘導による分泌タンパク質発現の変動解析

TGF- β を用いて肺腺癌細胞A549にEMTを誘導した(A549-EMT)。TGF- β 添加後2日で細胞の形

態は敷石状から紡錘状に変化して細胞接着が低下し、上皮系マーカーである E-cadherin の減弱と間葉系マーカーの N-cadherin の発現亢進を認めた。さらに 4 日目で形態およびマーカーともに完全に間葉型に移行することが確認された。経時的に解析を行うことで partial EMT から complete EMT が形成される過程でのタンパク質発現の変化を明らかにし、より早い段階で分泌が亢進する「早期の EMT 検出マーカー」あるいは血中の存在量が多く「高い検出感度が期待される EMT マーカー」の候補タンパク質を絞り込むことが可能になると考えられた。そこでタンパク質の網羅的解析を行う前に、親株 A549 と EMT 誘導後 2 日および 4 日後の細胞が培養液中に分泌するタンパク質を二次元電気泳動法により検出し、その全体像を確認することを試みた。結果、EMT 誘導細胞と親株では分泌されるタンパク質の種類や量に違いのあることが確認されたが、培養上清中に存在する総タンパク量が少ないため、当初予定していた「両者で発現に違いの認められたスポットから抽出したタンパク質を質量分析装置 (MALDI-TOF/TOF MS) で解析する方法」では、発現量の少ないタンパク質や低分子量のタンパク質を効率よく拾い上げられない可能性が考えられた。そのため計画を変更して、短時間でより多くのタンパク質を同定することが可能な、高速液体クロマトグラフィーと質量分析装置を組み合わせた LC/MS 法で培養上清中のタンパク質を網羅的に解析することにした。

(2) LC/MS 法による培養上清中のタンパク質の同定と血清診断マーカー候補の絞り込み

Conditioned medium 中のタンパク質を濃縮・精製した後、タンパク分解酵素処理を行って得られたペプチド断片 0.03 μg/μl を用いてショットガン解析を行った結果、1270 個のタンパク質が同定された。これらについて、親株に比べ EMT 誘導細胞で 2 倍以上発現が亢進している PSM が 3 以上で存在の確実性が高い 分泌タンパク質 を条件として絞り込んだところ、34 個の「EMT マーカー候補タンパク質」が得られた。この中には、主に癌関連線維芽細胞が産生して癌細胞の浸潤能や血管新生、抗癌剤耐性を亢進させることが知られている細胞外基質タンパク (ECM1, LUM, CCBE1, LGALS3, LAMB3, EFEMP1, FBN2) やサイトカイン (MIF, IL11, IL6) が含まれており、EMT を獲得した癌細胞自身もこれらを過剰発現することで積極的に細胞外マトリクス機能を調節して浸潤しやすい微小環境を構築している可能性が示された (図 1)。

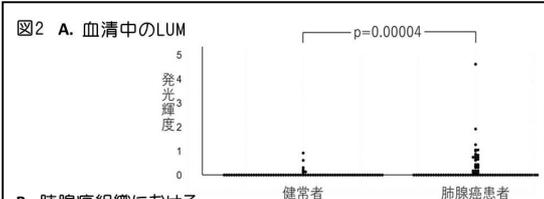
図1 A549-EMT細胞で分泌亢進を認めたタンパク質

Accession No.	Protein name (Gene symbol)	PSM		
		A549	EMT-2D	EMT-4D
Q16610	extracellular matrix protein 1 (ECM1)	0	0	8
P20809	interleukin 11 (IL11)	0	3	8
AA087WYV8	fibulin 2 (FBN2)	0	1	8
P16870	carboxypeptidase E (CPE)	0	3	7
Q88Y38	xylosyltransferase 1 (XYLT1)	0	0	6
P08476	inhibin, beta A (INHBA)	0	0	4
P03996	matrix metalloproteinase 1 (MMP1)	0	0	4
Q13751	laminin, beta 3 (LAMB3)	0	2	4
C9JD84	latent transforming growth factor beta binding protein 1 (LTBP1)	0	1	3
P00533	epidermal growth factor receptor (EGFR)	0	1	3
P51884	lumican (LUM)	1	2	17
O175094	slit guidance ligand 3 (SLIT3)	1	6	15
P08253	matrix metalloproteinase 2 (MMP2)	2	2	19
Q8UXH8	collagen and calcium binding EGF domains 1 (CCBE1)	1	5	8
Q9Y287	integral membrane protein 2B (TM2B)	1	1	7
Q53FA7	tumor protein p53 inducible protein 3 (TP53I3)	1	2	6
P35555	fibronin 1 (FBN1)	1	0	6
Q12805	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1)	2	6	11
Q3V511	latent transforming growth factor beta binding protein 2 (LTBP2)	4	9	15
O00339	matrilin 2 (MATN2)	2	5	7
Q9Y8N7	roundabout guidance receptor 1 (ROBO1)	2	7	7
Q15046	lysyl-tRNA synthetase (KARS)	5	5	14
AA024R412	neurogliin 2 (NRG2)	9	16	24
Q8WUM4	programmed cell death 6 interacting protein (PDCD6IP)	5	9	13
Q8NCW5	NAD(P)HX epimerase (NAXE, APOA1BP)	1	0	3
Q15629	cellular repressor of E1A stimulated genes 1 (CREG1)	1	1	3
A3KF12	neuroblastoma 1, DAN family BMP antagonist (NBL1)	1	3	3
Q32P28	prolyl 3-hydroxylase 1 (P3H1, LEPR1)	1	1	3
P30508	major histocompatibility complex, class I, C (HLA-C)	2	7	6
P06396	gelsolin (GSN)	2	3	6
P14174	macrophage migration inhibitory factor (MIF)	2	2	6
Q9UBP4	Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3 (DKK3)	5	7	12
K7E1M3	chorionic gonadotropin beta subunit 1 (CGB1)	6	6	13
D6R8H9	ribonuclease T2 (RNASET2)	2	7	5

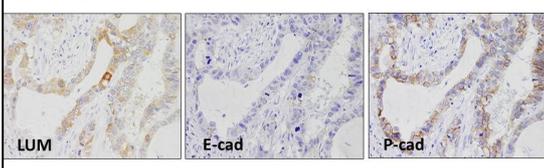
(3) 肺腺癌における Lumican (LUM) の発現と血清診断マーカーとしての可能性

健康者血清 81 例および肺腺癌患者 83 例の治療前血清 (Stage 48 例、Stage 35 例) を対象に RPPA を用いて血中の LUM を検出したところ、肺腺癌患者の血中 LUM は健康者に比べて有意に高値を示したが、stage による差異は認められなかった。また、肺腺癌患者組織 70 例 (Stage 48 例、Stage 22 例) における LUM の発現を免疫染色法により検討したところ、非腫瘍部では主に血管周囲の抗原線維に発現を認め、腫瘍部では腫瘍細胞が陽性を示す症例と腫瘍細胞は染色されず間質のみ染まる症例があった。特に LUM の発現を認める腫瘍細胞は低分化ものも多く、EMT マーカーである E-cadherin の発現低下と P-cadherin の発現亢進が同時に観察されたことから、EMT を獲得した癌細胞は LUM を分泌して浸潤に都合のよい癌間質を自ら構築していると考えられ、血中の LUM は EMT により高浸潤能を獲得した癌細胞の検出に有用なマーカーとなる可能性が示された (図 2)。

図2 A. 血清中のLUM



B. 肺腺癌組織における LUMとEMTマーカーの発現



(4) 抗癌剤耐性と Macrophage migration-inhibitory factor (MIF) の発現

腫瘍関連サイトカインはがん微小環境の形成に重要な役割を果たしていることが報告されている。本研究で「診断マーカー候補」として得られた MIF は A549-EMT 細胞および抗癌剤であるシスプラチンに耐性とした細胞亜株 (A549-cis) での発現亢進を認めた。さらに、免疫チェックポイント分子 PD-L1 陰性の A549 細胞がシスプラチン投与により PD-L1 を発現すること、および患者血清においてもさまざまな程度で血中に MIF が検出されたことから、血中の MIF が抗癌剤耐性や

免疫監視からの回避能の検出に役立つマーカーとなる可能性が示唆された(図3)。

現在、対象とする症例数を増やして上述した2分子に加えて他の「候補タンパク質」についても検討を行い、EMTに基づく高悪性度癌細胞を検出可能な血清診断マーカーとしての有用性の評価を進めている。さらには有用性の認められたタンパク質を組み合わせた診断用プロテイン・アレイを作製することを旨とする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

Hagiuda D., Nagashio R., Ichinoe M., Tsuchiya B., Igawa S., Naoki K., Sato Y., Murakumo Y., Saegusa M., Sato Y. Clinicopathological and prognostic significance of nuclear UGDH localization in lung adenocarcinoma. Biomedical Research 40:17-27, 2019 DOI:10.2220/biomedres.40.17 (査読あり)

Kobayashi M., Nagashio R., Saito K., Aguilar-Bonavides C., Ryuge S., Katono K., Igawa S., Tsuchiya B., Jiang S-X., Ichinoe M., Murakumo Y., Saegusa M., Sato Y., Sato Y. Prognostic significance of S100A16 subcellular localization in lung adenocarcinoma. Human Pathology 74:148-155, 2018 DOI:10.1016/j.humpath.2018.01.001 (査読あり)

〔学会発表〕(計 5件)

土屋紅緒、柳田憲吾、今野亮、小寺義男、高橋博之、佐藤雄一 肺腺癌における上皮 - 間葉移行を標的とした血清診断マーカーの獲得. 日本病理学会 2018年

柳田憲吾、土屋紅緒、佐藤雄一、他 ショットガン解析により同定された膜タンパク質の有用性. 日本病理学会 2018年

長塩亮、柳田憲吾、土屋紅緒、佐藤雄一、他 肺腺癌における NAP1L1 の予後予測マーカーとしての有用性について. 日本病理学会 2018年

柳田憲吾、土屋紅緒、佐藤雄一、他 肺腺癌における CD239 の血清診断マーカーとしての有用性. 電気泳動学会 2018年

長塩亮、柳田憲吾、土屋紅緒、佐藤雄一、他 肺腺癌における NAP1L1 の機能解析. 電気泳動学会 2018年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

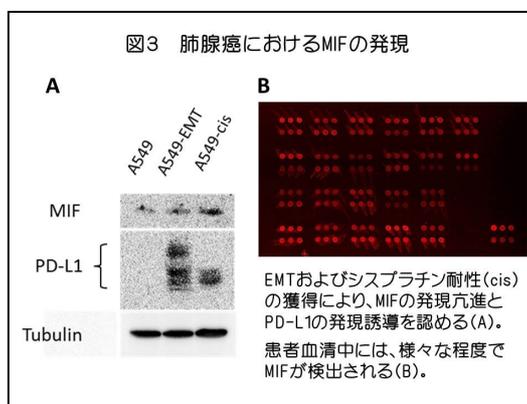
取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織



(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。