

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08723

研究課題名(和文) 肺癌の浸潤・転移機構における膜型セリンプロテアーゼインヒビターの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of membrane-type serine protease inhibitor in invasion and metastasis of lung cancer

研究代表者

田中 弘之 (Hiroyuki, Tanaka)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90433060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺腺癌におけるLRP11の遺伝子発現の検討では、臨床病理学的事項で統計学的有意差はみられなかった。無病生存期間や全生存期間に統計学的有意差はみられなかった。pT1症例での検討でも、無病生存期間や全生存期間に統計学的有意差はみられなかった。ヒト肺癌組織を用いた免疫染色では、癌細胞の細胞膜と細胞質に陽性像が得られた。腺癌と扁平上皮癌を用いたHAI-1の免疫染色では、癌細胞の細胞膜と細胞質に陽性像が得られた。症例によっては細胞膜に強陽性を示す症例があった。HAIの細胞膜発現症例において、腫瘍面積と臨床病期や予後との相関について現在解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌においては予後を予測しうる腫瘍マーカーは未だ確立されていない。このため、新規腫瘍マーカーの開発は必須である。我々の研究している蛋白質は膜蛋白質であり、免疫染色でも容易に検出できる。乳癌におけるHER2の免疫染色のように、コンパニオン診断として日常診療に使用される可能性を秘めている。特に肝細胞増殖因子を軸とした癌細胞の浸潤・転移機構制御の要の蛋白質であるHAI-1とその類似膜蛋白質であるLRP11を解析することは、学術的意義が高いと思われる。肺癌でのLRP11に関する文献的報告は未だないことから、その新規性は高いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In LRP11 gene expression in lung adenocarcinoma, no statistically significant difference was observed in clinicopathologic parameters. There were no statistically significant differences in disease-free survival and overall survival. In pT1 cases of pulmonary adenocarcinoma, no statistically significant difference was observed in disease-free survival or overall survival. With immunostaining using human lung cancer tissue, positive images were obtained in the cell membrane and cytoplasm of cancer cells. Immunostaining for HAI-1 in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma showed positivity in the cell membrane and cytoplasm of cancer cells. In cases, the cell membrane was strongly positive. We are currently analyzing the correlation between tumor area and clinical stage and prognosis in patients with cell membrane expression of HAI-1.

研究分野：人体病理学

キーワード：肺癌 膜蛋白質 プロテアーゼインヒビター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、数多くの細胞膜結合型セリンプロテアーゼが報告された。これらには、GPI アンカー型のものとして II 型細胞膜貫通型 (TTSPs) のものがある。後者は現在まで 20 数種類の報告があり、種々の癌との関連性が報告されている。中でも matriptase はトランスジェニックマウスモデルを用いた研究で、皮膚で過剰発現させると扁平上皮癌が発生することが報告され、発癌との関連性が強く示唆され、hepatocyte growth factor (HGF) や pro-urokinase の活性化などの関連、多彩な生理活性も報告されている (図 1)。これら II 型膜結合型セリンプロテアーゼの活性制御に関わるマスター分子は、HGF 活性化酵素 (HGF activator) のインヒビターとして報告された HGF activator inhibitor type-1 (HAI-1) と考えられている。特に matriptase の活性制御において、HAI-1 は決定的な役割を有している。HAI-1 は種々の上皮細胞や胎盤で発現がみられる I 型膜貫通型蛋白である。申請者らは HAI-1 ノックアウトマウスを作製し、HAI-1 欠損マウスは胎盤形成不全により胎生致死となることを明らかにしたが (Tanaka et al., Mol. Cell. Biol. 2005)、この表現形の少なくとも一部は HAI-1 欠損に伴う matriptase 活性の異常によることも明らかとなった。肺に関しては、HAI-1 は肺胞・気道上皮細胞の細胞膜側底部に発現し、炎症や癌などの細胞障害部近くでは HAI-1 の発現が細胞頂部に变化することを見出した (Tanaka et al., Human Cell 2009)。近年、前立腺癌、乳癌、消化器癌、卵巣癌や子宮体癌においても HAI-1 発現低下は予後不良因子であると報告されているが、肺癌での HAI-1 の役割については未だ詳細に解析されていない。

一方で、申請者らは HAI-1 に類似する蛋白質の検索を行う過程で、HAI-1 から Kunitz domain を除いた構造と相溶性が高い HAI-1-like protein を見出した。特に HAI-1 と LRP11 のシステイン残基の部位はほぼ一致していた。また MANSC ドメインは、ヒト、サル、ラット、ハツカネズミ、ショウジョウバエ、ハマダラ蚊で保存されており、重要な役割を担っている可能性が示唆されるが、その機能を解析した報告はない。これまでに行った予備実験では、HAI-1-like protein はヒト正常臓器において脳・前立腺および精巣に発現がみられ、各種肺癌培養細胞において強い遺伝子発現が認められた。データベースの検索により、本遺伝子は low density lipoprotein receptor-related protein 11 (LRP11) として、登録されているものと同一であり、HAI-1 と同様に N 末端より MANSC (motif at N-terminus with seven cysteins) ドメイン、LDL 受容体様ドメインおよび膜貫通ドメインを有した I 型膜結合型蛋白であることが分かった (図 2)。更に手術で切除された肺癌組織における mRNA の高発現も確認している。特に肺腺癌においては T 因子と相関関係がみられ、肺癌の悪性度に LRP11 が何らかの関与をしていることが示唆された。

2. 研究の目的

申請者らは肝細胞増殖因子 (HGF) 系およびその制御の要である膜型セリンプロテアーゼインヒビターである HGF activator inhibitor type-1 (HAI-1) の悪性腫瘍における浸潤・転移機構および肺障害時気管支と肺胞組織の修復・再生機構における HAI-1 の役割を解析してきた。今回、申請者らは、HAI-1 および HAI-1 の研究過程で見出され HAI-1 類似の新規膜型蛋白質である LRP11 (low density lipoprotein receptor-related protein 11) の両因子が肺癌の浸潤・転移機構にどのような役割を担っているのか、また新規バイオマーカーおよび分子標的治療薬の可能性について検討する予定である。

3. 研究の方法

<平成 28 年度>

1) ヒト肺癌手術組織を用いた HAI-1、LRP11 の RT-real time PCR 法による遺伝子発現量および免疫染色による蛋白発現強度とその領域性についての検討

遺伝子発現量に関しては、正常肺および癌組織から RNA を抽出し、RT-real time PCR 法を用いて、HAI-1 および LRP11 の遺伝子発現をそれぞれ定量的に測定する。

遺伝子発現の局在に関する検討では、ISH 用のプローブをそれぞれ作製し、ホルマリン固定パラフィン切片または凍結切片の組織を用いて ISH 自動化システムまたは自動免疫染色機により染色する。HAI-1 の免疫染色で使用する抗 HAI-1 抗体は、細胞外ドメインをエピトープとする抗体と細胞内ドメインをエピトープとする抗体の 2 種類を用い、HAI-1 が shedding されているかどうかの可能性を含めて検討する (抗 HAI-1 抗体に関しては既に作製・報告済み Nagaike, Tanaka et. al., Cancer Sci 2004)。申請者らが行ったノーザンブロットを用いた予備実験では、ヒト正常臓器において脳・前立腺および精巣に LRP11 の遺伝子発現がみられ、肺ではその遺伝子発現が軽度認められた。LRP11 と癌に関する文献的報

告は全くなく未知の新規蛋白質であるが、申請者はすでに FLAG, MYC-tag を有した human LRP11-vector を transfection させた COS 細胞を作製しており、抗 LRP11 抗体が使用可能であることを western 法で確認している。癌組織においては、その染色部位、染色強度、染色パターン、染色面積を腫瘍中心部および腫瘍辺縁部で比較検討する。上記より得られた HAI-1 および LRP11 の遺伝子発現量、遺伝子発現部位および免疫染色での検討の結果と肺癌組織型での相違や臨床病期 (T 因子、N 因子や p-Stage など)・予後 (無病生存期間や全生存期間など) との相関について検討する。

2) crispr-cas9 法または RNA 干渉法で肺癌培養細胞株 (EGFR 野生型培養細胞株、EGFR 変異・欠失を有する培養細胞株と EGFR 阻害剤耐性培養細胞株) の HAI-1、LRP11 をノックダウンまたは発現低下させた培養細胞株の作製

crispr-cas9 法または RNA 干渉法で EGFR 野生型肺癌培養細胞株、EGFR 変異・欠失を有する肺癌培養細胞株と EGFR 阻害剤耐性肺癌培養細胞株の HAI-1、LRP11 をそれぞれノックダウンまたは発現低下させた培養細胞株を樹立する。申請者らの教室では、RNA 干渉法および crispr-cas9 法での遺伝子発現のサイレンシングまたはノックダウンを他の培養細胞株で実施しており、その手技は確立されている。

<平成29年度以降>

1) crispr-cas9 法または RNA 干渉法で肺癌培養細胞株 (EGFR 野生型培養細胞株、EGFR 変異・

欠失を有する培養細胞株と EGFR 阻害剤耐性培養細胞株) の HAI-1、LRP11 をノックダウンまたは発現低下させた培養細胞株を用いた in vitro 実験

HAI-1、LRP11 をノックダウンまたはサイレンシングさせた肺癌培養細胞株をスクラッチアッセイによる細胞走化性の検討、boyden chamber を用いた浸潤能の評価、BrdU および Ki-67 を用いた免疫染色や MTT アッセイによる細胞増殖能の評価を行う予定である。また得られた結果から、どのシグナル伝達系に依存しているか、各種阻害剤を培養細胞に添加し、抽出された蛋白質から western 法でリン酸化された蛋白質を同定し、細胞内シグナル伝達 (oncogene addiction) の検討も行う予定である。

2) crispr-cas9 法または shRNA 法で肺癌培養細胞株の HAI-1、LRP11 をノックダウンまたは発現

低下させた培養細胞株を用いた in vivo 実験

crispr-cas9 法または shRNA 法で肺癌培養細胞株の HAI-1、LRP11 をノックダウンまたは発現

低下させた培養細胞株をヌードマウスの皮下接種による方法と尾静脈から静注し肺腫瘍を形成させる方法で検討する。それぞれの群での、腫瘍増殖能、腫瘍形成能、転移能や生存率の相違を明らかにする。その際、腫瘍径、腫瘍個数、組織型および血管密度などを各群間で比較・検討する。

4. 研究成果

肺腺癌における LRP11 の遺伝子発現の検討では、臨床病理学的事項で統計学的有意差はみられなかった。無病生存期間や全生存期間に統計学的有意差はみられなかった。pT1 症例での検討でも、無病生存期間や全生存期間に統計学的有意差はみられなかった。ヒト肺癌組織を用いた免疫染色では、癌細胞の細胞膜と細胞質に陽性像が得られた。腺癌と扁平上皮癌を用いた HAI-1 の免疫染色では、癌細胞の細胞膜と細胞質に陽性像が得られた。症例によっては細胞膜に強陽性を示す症例があった。HAI の細胞膜発現症例において、腫瘍面積と臨床病期や予後との相関について現在解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----