

平成21年3月31日現在

研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2007～2008  
 課題番号： 19590370  
 研究課題名 (和文) 肺癌進展における HMGA2遺伝子の発現誘導機構と活性化パスウェイの網羅的解析  
 研究課題名 (英文) Analysis of activation mechanism of HMGA2 gene and its regulating gene-pathways in the progression of lung cancer  
 研究代表者  
 上田 善道 (UEDA YOSHIMICHI)  
 金沢医科大学・医学部・教授  
 研究者番号： 50271375

## 研究成果の概要：

浸潤性肺扁平上皮癌細胞の上皮間質転換における HMGA2の関与を蛋白ならびに mRNAレベルで示すと共に、HMGA2発現誘導における TGF $\beta$ 系シグナルの関与とHMGA2発現扁平上皮癌細胞における発現低下遺伝子群 (E-cadherin, Plakoglobin, zonula-occludens 1 (zo-1)、GS K3)、発現亢進遺伝子群 (N-cadherin, Smad4, Snail, cyclin D1, MMP-3, MMP-14, Jagged-1, Ezrin, Aquaporin-5) を選別・検証した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・人体病理学

キーワード： 肺癌、扁平上皮癌、HMGA2、上皮間質転換、浸潤・転移、TGF $\beta$ 、プラコグロビン、Laser captured microdissection

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌は本邦における癌死の首座を占める臨床上重要な腫瘍である。浸潤・転移が高く、集約的治療にも関わらず予後は悲惨で、浸潤・転移の分子機構に注目した新たな治療

法の確立が切望されている。癌の浸潤・転移では、癌細胞の上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition, EMT)が生じており、その誘導には癌浸潤部の微小環境、特に間質細胞が重要な役割をすることが提唱されて

いる。肺癌の進展における上皮間質転換 (EMT) とそこでの間質細胞の役割に関してはほとんど知られていない。

(2) High mobility group (HMG) 蛋白は非ヒストン性核内クロマチン蛋白である。その中の HMGA1a, 1b, 2 (従来の HMGI/Y と HMGI(C) に相当) は分子内 5' サイドに DNA hook と呼ばれる 3 つの DNA 結合ドメインを有し、DNA 鎖の AT 配列に富む minor groove に結合し DNA の構造を変化させ、その周辺遺伝子の転写調節に関わるため structural transcription factor と呼ばれる。HMGA-2 は、①胎児期の一時期に間葉系細胞に一致して発現し、それ以後は全く発現しないこと、②遺伝子のノックアウトマウスは pygmy に、強制発現マウスは giantism になること、③脂肪腫や平滑筋腫など良性間葉系腫瘍では HMGA2 遺伝子のイントロン部に転座点を有する相互転座が高頻度で検出されること、④ある種の樹立乳癌細胞では HMGA2 遺伝子発現と浸潤能に関連がみられている。1)~4) の情報から HMGA2 は癌細胞の浸潤・転移における上皮間葉転換 (EMT) において主要な役割を果たしていることが推定される。肺癌の上皮間葉転換 (EMT) における HMGA2 の関与に関する詳細な情報は知られていない。

## 2. 研究の目的

非小細胞性肺癌の浸潤・転移における HMGA2 による上皮間質転換 (EMT) 制御機構を明らかにするため以下の研究目的で研究を行った。

- (1) 非小細胞性肺癌組織における HMGA2 の発現パターンを明らかにする。
- (2) 非小細胞性肺癌組織において HMGA2 により発現調節される上皮間質転換 (EMT) 関連遺伝子群を明らかにする。
- (3) 浸潤部腫瘍間質細胞に注目し非小細胞性肺癌組織における HMGA2 遺伝子発現誘導

に関わる分子を同定する。

## 3. 研究の方法

(1) 材料：金沢医科大学附属病院で外科的に切除された非小細胞性肺癌 67 例 (扁平上皮癌 38 例；腺癌 29 例) のホルマリン固定・パラフィン包埋切片、OCT 包埋新鮮凍結組織と通常の RNase free 新鮮凍結組織を用いた。

(2) 方法：

- ①ホルマリン固定・パラフィン包埋切片における抗ヒト HMGA2 ウサギポリクローナル抗体 (共同研究者の New Jersey 大学生化学 Kiran Chada 教授より分与) を用いた StABC 法による免疫染色
- ② Western blot による HMGA2 蛋白発現の定量
- ③ Real time RT-PCR による HMGA2 遺伝子 mRNA の発現定量
- ④ 腫瘍浸潤前線部と反応性間質部における laser-captured micro-dissection / cDNA array による遺伝子発現プロファイリング解析：連続凍結切片での HMGA2 高発現部と発現陰性部での比較解析
- ⑤ 選別遺伝子群の mRNA ならびに蛋白発現の laser-captured micro-dissection / real time RT-PCR ならびに免疫染色による多数症例での検証

## 4. 研究成果

(1) 肺腺癌 29 例中 22 例 (76%)、扁平上皮癌 38 例中 22 例 (58%) に HMGA2 の発現を認めた。腺癌では、細気管支肺胞上皮癌、微小乳頭状腺癌成分の他、腫瘍中心の浸潤部に一致して発現が亢進していた。扁平上皮癌は HE 染色から浸潤型と膨張型に分類されるが、HMGA2 は前者の浸潤前線部腫瘍細胞に限局した発現を認める一方、膨張型と上皮内癌部は陰性を呈した。

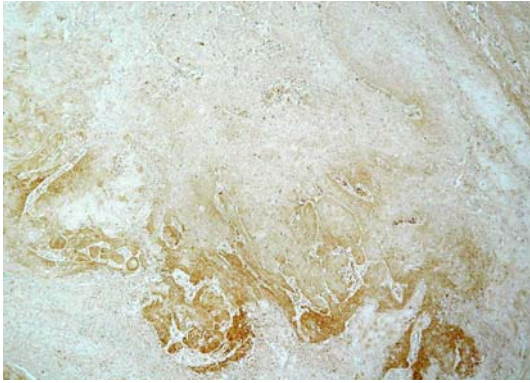


図1. 肺扁平上皮癌浸潤部における HMGA2 の発現

(2) 免疫染色による HMGA2 の発現パターンは western blot による HMGA2 蛋白の定量解析でも検証された。腺癌では細気管支肺上皮癌に、扁平上皮癌は高病期群に有意な発現亢進を認めた。

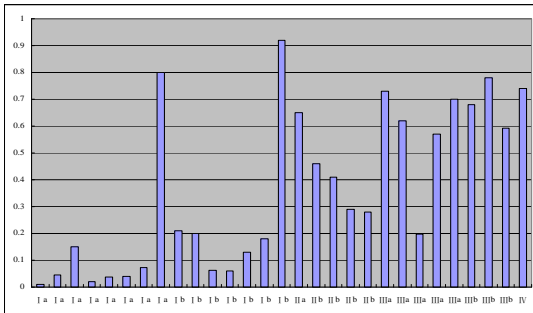


図2. 肺扁平上皮癌における HMGA2 遺伝子発現

(3) 扁平上皮癌 29 例での real time RT-PCR による HMGA2 遺伝子の mRNA レベルでの発現解析から、病期の進行と HMGA2 遺伝子発現間に有意な正の相関が認められた。

(4) 臨床病理学的因子との比較解析から、肺扁平上皮癌における HMGA2 の蛋白ならびに mRNA 発現は、発育様式(浸潤性 vs 膨張性)、病期、転移の有無と有意な関連が示されるとともに、Kaplan Meyer 解析から発現亢進と生存期間との間に有意な逆相関が認められた (IHC  $p=0.036$ ; mRNA  $p=0.024$ )。

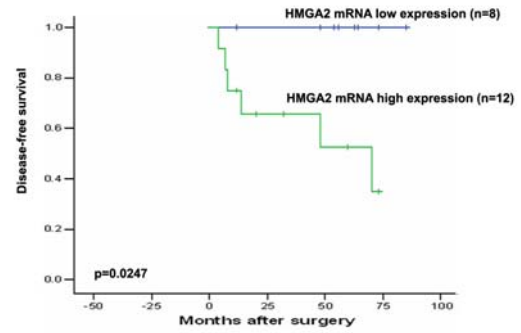


図3. 肺扁平上皮癌における HMGA2mRNA 発現と生存期間

(5) HMGA2 高発現と低発現肺扁平上皮癌凍結切片を用いた laser-captured microdissection / cDNA array による遺伝子発現プロファイリング解析により、HMGA2 発現扁平上皮癌細胞における E-cadherin、Plakoglobin、zonula-occludens 1 (zo-1)、GSK3 遺伝子の発現低下と、vimentin、N-cadherin、Smad4、Snail、cyclin D1、MMP-3、MMP-14 (MT1-MMP)、Jagged-1、Ezrin、Aquaporin-5 遺伝子の発現亢進が選別されるとともに、real-time RT-PCR ならびに免疫染色にて検証された。

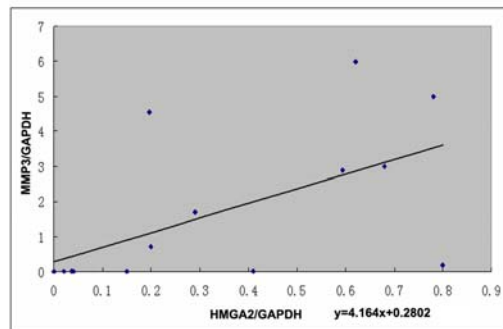


図4. 肺扁平上皮癌における HMGA2 と MMP-3 遺伝子の相関

(6) HMGA2 高発現と低発現肺扁平上皮癌凍結切片を用いた laser-captured microdissection / cDNA array による遺伝子発現プロファイリング解析により、HMGA2 発現亢

進部の間質細胞における fibroblast growth factor-2 (FGF-2)、CXCL-14、TGF- $\beta$  遺伝子、MMP-1 遺伝子の発現亢進を認めた。

以上の結果から、肺扁平上皮癌の生命予後を決定する浸潤・転移における上皮間質転換 EMT には HMGA-2 とそれに引き続く上皮性遺伝子発現低下と間葉性遺伝子の発現亢進が生じていることが強く示唆された。HMGA2 の発現誘導には TGF- $\beta$  系を介するシグナル伝達回路の可能性が示唆されたが、それだけでは説明できない現象も観察され、micro RNA の関与など今後更に解明すべき課題も明確になった。

(7) HMGA2 発現によるプラコグロビン遺伝子発現抑制、抗癌薬に対する耐性などの関連から研究を進展させ、非上皮系腫瘍におけるプラコグロビンの肺転移抑制作用と骨肉腫カプフェイン併用化学療法的作用機序に関わる新たな遺伝子群も明らかにした。

#### 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 4 件)

① Kotaro Higashi, Tsutomu Sakuma, Kengo Ito, Seiji Niho, Yoshimichi Ueda, Takeshi, Kobayashi, Ryuzo Sekiguchi, Tomoko Takahashi, Takashi Kato, Hisao Tonami. Combined evaluation of preoperative FDG uptake on PET, GGO components on CT, and serum CEA Level: Identification of both low and high risk for recurrence in patients with resected T1 lung adenocarcinoma. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 36:373-381, 2009、査読有

② Yoshimitsu Kanazawa, Yoshimichi

Ueda, Miyako Shimasaki, Shogo Katsuda, Norio Yamamoto, Katsuro Tomita, Hiroyuki Tsuchiya. Down regulation of plakoglobin in soft tissue sarcoma is associated with a higher risk of pulmonary metastasis.

*Anticancer Res* 28:655-664, 2008、査読有  
③ Sadao Ii, Yoshimichi Ueda, Miyako Shimasaki, Shogo Katsuta, Koutarou Takazawa, Yoshimitsu Kanazawa, Katsuro Tomita, Hiroyuki Tsuchiya.

Identification of novel genes involved in the synergistic antitumor effect of caffeine in osteosarcoma cells using cDNA macroarray. *Anticancer Res* 28: 645-53, 2008、査読有

④ 上田 善道、島崎 都、東 光太郎、Giafei Guo、佐藤 勝明、佐川 元保、佐久間 勉、勝田 省吾. 肺癌病理の Up to Date *金沢医大雑誌* 21: 21-30, 2008、査読有

[学会発表] (計 4 件)

① Yoshimitsu Kanazawa, Yoshimichi Ueda, Miyako Shimasaki, Shogo Katsuda, Norio Yamamoto, Katsuro Tomita, Hiroyuki Tsuchiya: Down regulation of *plakoglobin* in soft tissue sarcoma is associated with a higher risk of pulmonary metastasis. The 8<sup>th</sup> International Conference of Anticancer Research (Oct 17-22, 2008, in Kos, Greece).

② Sadao Ii, Yoshimichi Ueda, Miyako Shimasaki, Shogo Katsuta, Koutarou Takazawa, Yoshimitsu Kanazawa, Katsuro Tomita, Hiroyuki Tsuchiya: Identification of Novel Genes Involved in the Synergistic Antitumor Effect of Caffeine in Osteosarcoma Cells Using cDNA Macroarray. The 8<sup>th</sup> International

Conference of Anticancer Research (Oct 17-22, 2008, in Kos, Greece).

③ Koutarou Takazawa, Hiroyuki Tsuchiya, Ueda Yoshimichi, Yoshimitsu Kanazawa, Sadao Ii, Katsuro Tomita: Expression analysis for the identification of genes involved in acquired resistance to cisplatin in osteosarcoma cells. The 8<sup>th</sup> International Conference of Anticancer Research (Oct 17-22, 2008, in Kos, Greece).

④ 島崎 都、上田善道、佐藤勝明、勝田省吾. ヒト軟部肉腫における新規肺転移抑制遺伝子 human plakoglobin 遺伝子の同定. 第97回日本病理学会総会 (平成20年5月15日～17日、金沢)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上田 善道 (UEDA YOSHIMICHI)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50271375

### (2) 研究分担者

佐川 元保 (SAGAWA MOTOYASU)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70292274

### (3) 連携研究者

島崎 都 (SHIMAZAKI MIYAKO)  
金沢医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00440511