

平成21年 6月 2日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790272
 研究課題名 (和文) 癌の悪性化に伴う IGFBP-4/-2 発現不全現象の原因解明
 研究課題名 (英文) Analysis of IGFBP-4/-2 expression deficiency in association with cancer progression
 研究代表者
 佐藤 華子 (SATO HANAKO)
 聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
 研究者番号：60438132

研究成果の概要:正常細胞では増殖抑制因子 IGFBP-4/-2 を介したフィードバック機構が活性化することにより過剰な増殖が抑制されている。本研究では、癌化・悪性化に伴って IGFBP-4/-2 遺伝子発現制御領域にメチル化が起こることにより IGFBP-4/-2 発現が減弱することを多種の癌細胞を用いて明らかにした。この事実はエピジェネティックな要因による癌細胞増殖抑制機構の破綻が普遍的に惹起されていることを示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

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：IGFBP-4、IGFBP-2、promoter、Hypermethylation、癌

1. 研究開始当初の背景

癌遺伝子である K-ras 遺伝子の活性化は、肺腺癌の発生・進展過程において、特に細胞増殖に対し正に働くとされてきたが、これまでの研究過程で、(1)K-ras 遺伝子の下流経路である Ras-Raf-MEK-MAPK シグナル伝達系の活性化が転写因子 Egr-1 の発現を介して誘導される 2 種のインスリン様増殖因子結合蛋白 (IGFBP-4/-2) による強力な増殖抑制機構にも深く関与していること、(2)癌細胞がより低分化・未分化になると IGFBP-4/-2 遺伝子プロモーターの高度メチル化による IGFBP-4/-2 発現不全を生じ、増殖に対するフ

ィードバック機構を喪失していく、という事実を掴んだ。癌細胞では一般に増殖因子の autocrine、paracrine 機構により、MEK-MAPK-Egr1 系が活性化されていることから、IGFBP-4/-2 を介する増殖抑制および悪性化に伴う増殖抑制機構の破綻現象は、種々の癌腫に普遍的に起こっている可能性が高い。この仮説を検証するため、以下の実験を行った。

2. 研究の目的

本研究では、肺癌のみならず、乳癌、甲状腺癌、大腸癌、食道癌、前立腺癌、など種々の臓器に由来し種々の分化形態を呈する培養細胞を用い、Ras-Raf-MEK-MAPK カスケードの活性化状態、IGFBP-4/-2 プロモーターのメチル化状態、DNA methyltransferase の発現状態について、網羅的に解明することを第1の目的とし、また癌組織を用いて上記検索を行うことにより、in vivo におけるIGFBP-4/-2の発現とDNAメチル化との関連性について明らかにすることを第2の目的とし、以下の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 各種臓器由来癌細胞におけるIGFBP-4/-2発現について

①各種臓器由来癌細胞(肺癌(TKB1, TKB13, TKB14, TKB30)、大腸癌(TKB101)、前立腺癌(LNCaP)、甲状腺癌(TPC-1, B18-K1, TTA1, TTA2))におけるIGFBP-4/-2の発現状態、ならびにMAPKおよびP-MAPKの発現に状態ついてWestern Blot法にて解析した。

②各種癌細胞におけるIGFBP-4/-2が細胞増殖に及ぼす影響についてIGFBP-4/-2に対する中和抗体を用い、これを培地中に添加することにより起こる細胞増殖変化について検討した。

③各種癌細胞からDNAを抽出し、IGFBP-4/-2プロモーターのメチル化状態をBisulfite Sequencing法にて検討した。

④IGFBP-4/-2プロモーターにメチル化が存在したヒト各種癌細胞8株(TKB1、TKB5、TKB30、TKB101、TTA1、TPC1、B18-K1、LNCaP)にDNAメチル化酵素阻害剤(5-Aza-2-deoxycytidine: 5-Aza-2-deoxyC)ならびにヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(trichostatin A: TSA)を添加することによるIGFBP-4/-2の発現回復状態についてreal time PCR法にて検討した。

⑤IGFBP-4発現へのThyroid transcription factor-1 (TTF-1)結合部位を欠いたIGFBP-4プロモーターを挿入したルシフェラーゼベクターを作成し、これを用いてルシフェラーゼ解析をすることで、IGFBP-4プロモーター活性を確認し、IGFBP-4発現へのTTF-1の関与の有無について解析した。

⑥各種癌細胞におけるDNA methyltransferase-1 (DNMT1)の発現の有無をWestern Blot法にて確認し、IGFBP-4/-2プロモーターのメチル化とDNAメチル化酵素発

現との関連性について検討した。

(2) 肺癌組織におけるIGFBP-4/-2発現について

①患者様より同意の得られた非小細胞肺癌組織65症例(腺癌48症例、扁平上皮癌17症例)を対象に、IGFBP-4/-2の発現状態について免疫組織化学染色法により解析した。

②上記非小細胞肺癌組織65例より抽出したDNAを用い、in vivoにおけるIGFBP-4/-2プロモーターのメチル化状態についてMSP法を用いて解析し、免疫組織化学染色によるIGFBP-4/-2発現解析結果との関連性について検討した。

4. 研究成果

(1) 各種臓器由来癌細胞におけるIGFBP-4/-2発現について

①ヒト各種臓器由来癌細胞におけるIGFBP-4/-2発現状態について解析した結果、大腸癌、甲状腺癌、前立腺癌においてIGFBP-4/-2の発現が減弱していたことが明らかとなった。このことから、大腸癌、甲状腺癌、前立腺癌細胞においても癌細胞の過増殖に対するIGFBP-4/-2を介したフィードバック機構が破綻している可能性が示唆された。

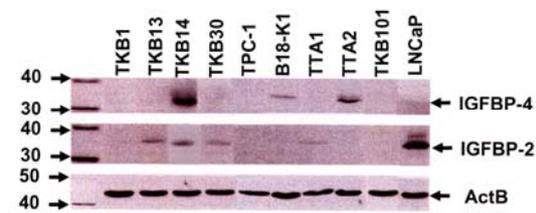
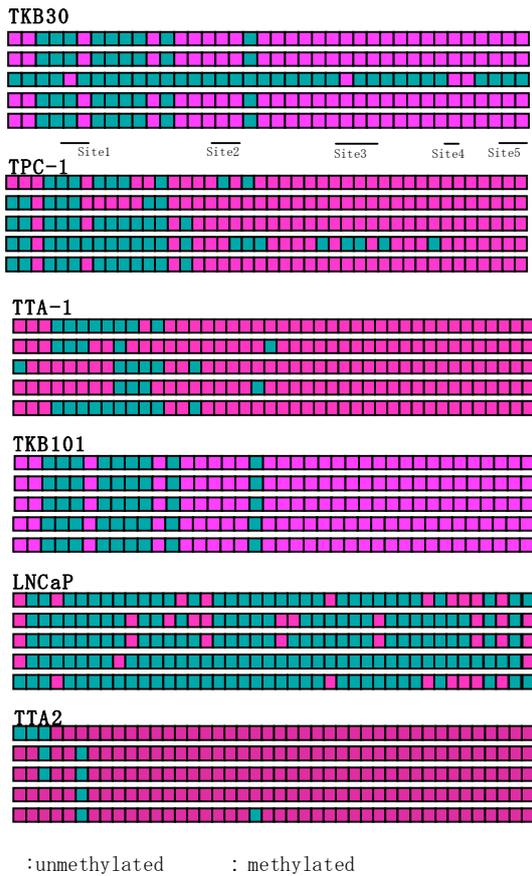


図1. 種々の癌細胞におけるIGFBP-4/-2発現

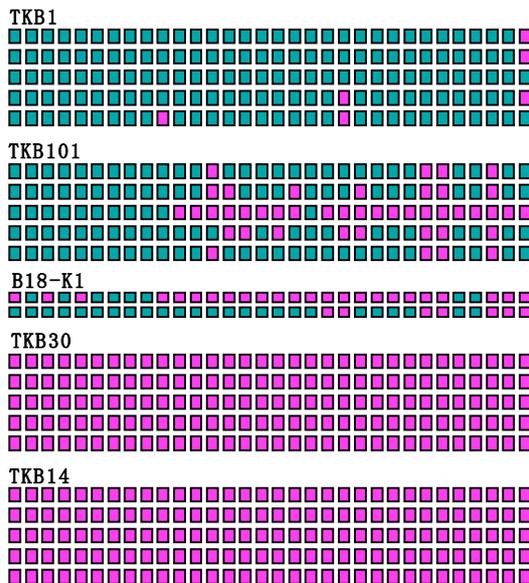
②各種癌細胞に対しIGFBP-4/-2に対する中和抗体を添加した結果、全ての細胞株において細胞増殖能が亢進された。このことから、IGFBP-4/-2フィードバック機構の破綻は癌細胞に普遍的に起きている可能性が示唆された。

③各種癌細胞におけるIGFBP-4/-2のメチル化状態についてBisulfite Sequencing法を用いて検討した結果、IGFBP-4/-2発現の認められない培養癌細胞(IGFBP-4ではTKB30、TPC-1、TTA1、TKB101、LNCaP、IGFBP-2ではTKB1、TKB101、B18-K1)の各遺伝子プロモーターにおいて、メチル化が高度に存在することが明らかとなった。

図2 (a) 各種培養細胞における IGFBP-4 遺伝子プロモーターのメチル化状態



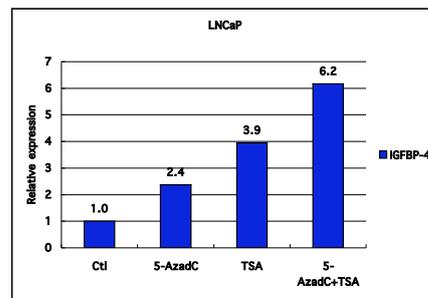
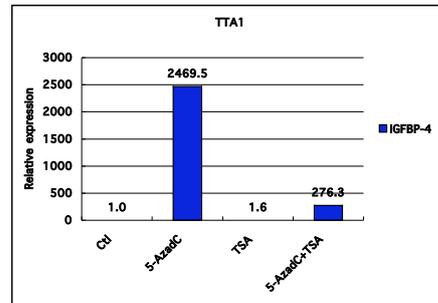
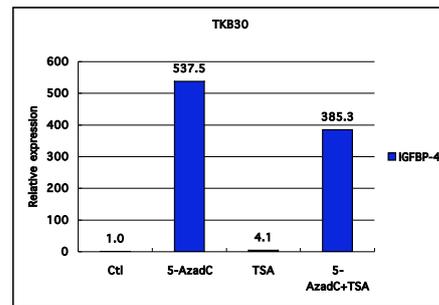
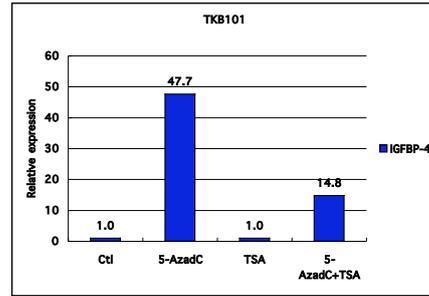
(b) 各種培養細胞における IGFBP-2 遺伝子プロモーターのメチル化状態



④③の結果より、IGFBP-4/-2 遺伝子プロモーターにメチル化が認められた癌細胞株に対し、DNAメチル化酵素阻害剤

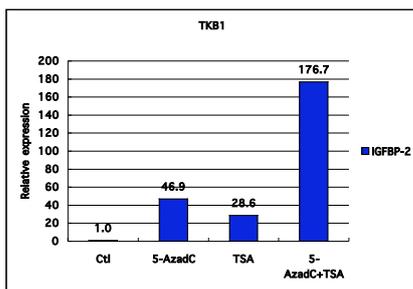
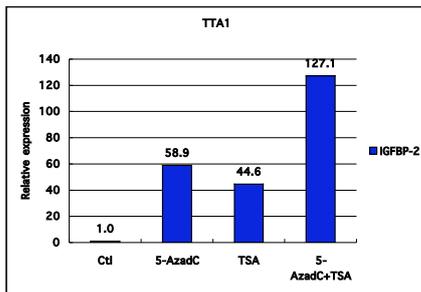
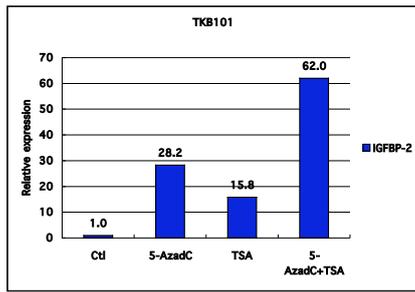
(5-Aza-2-deoxyC) やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (TSA) を添加したところ、IGFBP-4/-2 発現の顕著な回復が認められた。このことから、肺癌以外の癌細胞においても、エピジェネティックな異常により IGFBP-4/-2 発現が抑制され、癌細胞の過増殖に対するフィードバック機構の破綻が起きていることが示唆された。

図3 (a) 各種培養細胞に対する 5-Aza-2-deoxyC および TSA 処理による IGFBP-4 の発現変化



5-AzaC: 5-Aza-2-deoxycytidine
 TSA: Trichostatin A

(b) 各種培養細胞に対する 5-Aza-2-deoxyC および TSA 処理による IGFBP-2 の発現変化



⑤ IGFBP-4 プロモーターには肺上皮・甲状腺上皮に特異的に発現している Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) 結合部位が存在することから、ルシフェラーゼアッセイ系を用いて IGFBP-4 発現への TTF-1 の関与について検討を行ったが、IGFBP-4 プロモーター活性に殆ど変化が認められなかったことから、TTF-1 の関与については否定的な結果が得られた。

⑥ 各種癌細胞における IGFBP-4/-2 プロモーターのメチル化状態と DNMT1 の発現性との関連について検討した結果、DNMT1 の発現パターンと IGFBP-4/-2 発現に相関は認められなかった。

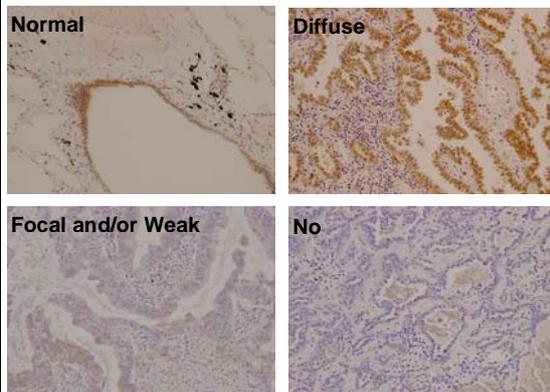
(2) 肺癌組織における IGFBP-4/-2 発現について

① 肺癌組織における IGFBP-4/-2 抗体に対

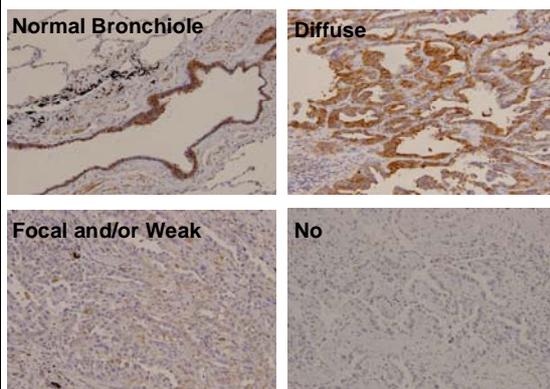
する免疫組織化学染色による評価は、3 段階（高発現(Diffuse intense)、低発現(Focal and/or Weak)、非発現(No)）に分類した。癌巣周囲の正常気道上皮細胞(Normal Bronchiole)は IGFBP-4/-2 いずれも多量に産生されていたことから、Normal bronchiole と癌組織の染色強度が同等の組織を高発現とし、陰性のものを非発現、両者の中間を低発現とした。

肺腺癌組織における IGFBP-4 の発現は 46 例中 19 例で高発現、17 例で低発現を示し、10 例で非発現であった。また肺扁平上皮癌組織では 15 例中高発現が 6 例、低発現が 5 例、非発現が 4 例であった。また、IGFBP-2 の発現性については、肺腺癌症例 48 例中、高発現 20 例、低発現 18 例、非発現 10 例であり、肺扁平上皮癌では 17 例中、高発現 12 例、低発現 5 例、非発現 0 例であった。

図 4(a) 癌巣周囲の正常および癌組織における IGFBP-4 の発現



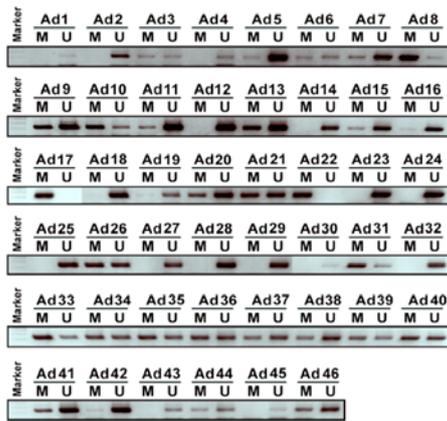
(b) 癌巣周囲の正常および癌組織における IGFBP-2 の発現



② IGFBP-4 プロモーターに対する MSP 解析では、腺癌 46 症例中 31 例、扁平上皮癌 15 症例中 7 例にメチル化が存在することが明らかとなった。また、IGFBP-2 プロモーターのメチル化状態については、腺癌症例 34 例お

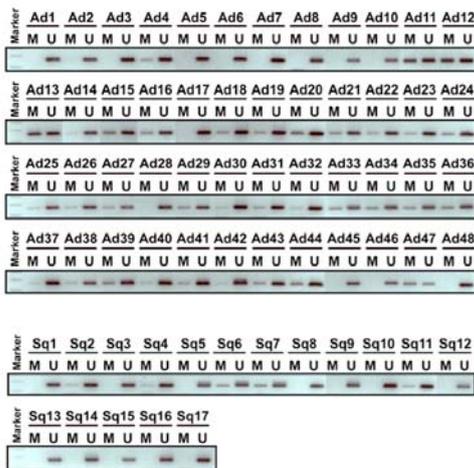
よび扁平上皮癌 5 例で認められた。肺腺癌ならびに肺扁平上皮癌組織における IGFBP-4/-2 発現状態と IGFBP-4/-2 遺伝子プロモーターのメチル化状態との関係を見てみると、プロモーターにメチル化の存在する肺癌症例でその発現が弱い傾向にあったことから、癌における IGFBP-4/-2 に対するフィードバック機構の破綻は、in vivo においても非小細胞肺癌に起きている現象であることが示唆された。

図 5(a) 肺癌組織における IGFBP-4 のメチル化状態の検討 (MSP 法)

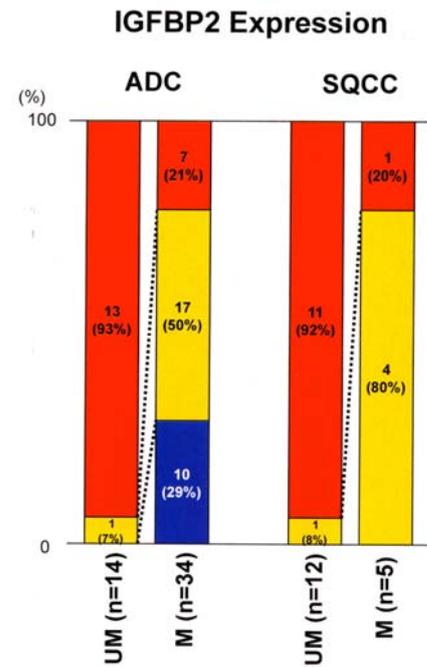
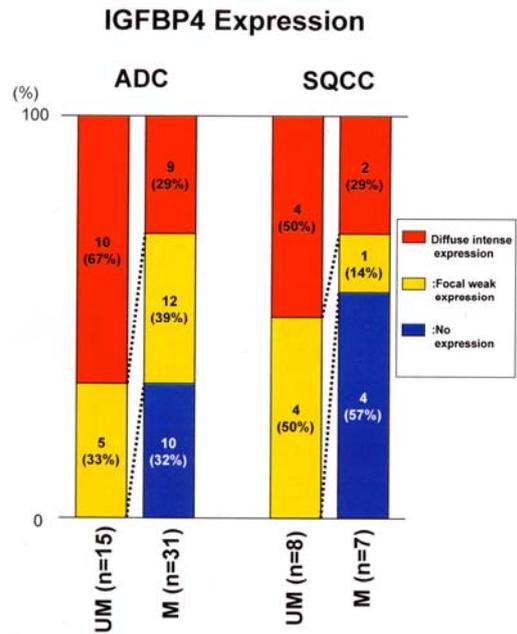


Ad: Adenocarcinoma
 Sq: Squamous cell carcinoma
 U: Unmethylated
 M: Methylated

(b) 肺癌組織における IGFBP-2 のメチル化状態の検討 (MSP 法)



(c) IGFBP-4/-2 遺伝子プロモーターのメチル化状態と免疫組織化学染色による発現強度との関係



ADC: Adenocarcinoma
 SQCC: Squamous cell carcinoma
 UM: Unmethylated
 M: Methylated

5. 今後の展望

IGF などの増殖因子は、癌組織において autocrine、paracrine 的に働くことにより、癌細胞の増殖を促進している。これまで癌研究の多くは癌の増殖促進に関わる因子につ

いてのものであったが、IGFBP-4/-2 が関与する IGF system が癌において破綻していることが本研究で明らかにされたことにより、今後は増殖フィードバック機構の破綻に主眼を置いた癌研究がますます盛んになっていくものと思われる。また最近になり IGFBP-4/-2 が細胞外基質や接着因子と結合しうることが報告されており、IGFBP-4/-2 の新たな機能が発見されつつあり、IGFBP に関する研究の新たな展開が期待される。

6. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Kitamura H, Yazawa T, Sato H, Okudela K, Shimoyamada H. Small Cell Lung Cancer: Significance of RB Alteration and TTF-1 Expression in its Carcinogenesis, Phenotype and Biology. Endocrine Pathology. 2009. 査読有. in press.
- ② Kitamura H, Yazawa T, Okudela K, Shimoyamada H, Sato H. Molecular and Genetic Pathogenesis of lung Cancer: Differences Between Small-Cell and Non-Small-Cell Carcinomas. The Open Pathology Journal. (2)106-114, 2008. 査読有.
- ③ Nagaoka T, Shizushima A, Sawada J, Tomo S, Hoshino K, Sato H, Hirata K. Sex determination using mastoid process measurements: standards for Japanese human skeletons of the medieval and early modern periods. Anthropological Science. (116)105-113, 2008. 査読有.

[学会発表] (計4件)

- ① 佐藤華子、矢澤卓也、下山田博明、奥寺康司、宮田千恵、後藤和哉、石井順、柴田昌史、鈴木瞳、菅間博、北村均。肺癌細胞における Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1) 発現と TTF-1 promoter のメチレーションとの関連。第97回日本病理学会総会。2008年5月17日。金沢。
- ② 矢澤卓也、佐藤華子、下山田博明、奥寺康司、宮田千恵、石井順、後藤和哉、柴田昌史、北村均。肺小細胞癌における IGFBP-2 過剰発現メカニズムの解析および腫瘍マーカーとしての有用性に関する基礎的検討。第97回日本病理学会総会。2008年5月15日。金沢。
- ③ Sato H, Yazawa T, Shimoyamada H, Okudela K, Kitamura H. Growth regulation via insulin-like growth factor binding

protein-4 and -2 in lung epithelial cells and cancers. 12th World Conference on Lung Cancer, September 4, 2007. Seoul, Korea.

- ④ Shimoyamada H, Yazawa T, Sato H, Okudela K, Kitamura H. Effects of vascular endothelial growth factors (VEGFs) on biological behavior of intrathoracic lung cancer cells. 12th World Conference on Lung Cancer, September 4, 2007. Seoul, Korea.

[図書] (計1件)

- ① 北村均、矢澤卓也、下山田博明、奥寺康司、佐藤華子。日本臨牀社。肺癌-基礎・臨床研究のアップデート。2008年。P100-105。

7. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 華子 (SATO HANAKO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：60438132

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究連携者

なし