

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16578

研究課題名(和文) 小型肺腺癌のプロテオミクス解析により見出された悪性化に関わるタンパクの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of proteins involved in stepwise progression found by proteomic analysis of small lung adenocarcinoma

研究代表者

臺 知子 (Dai, Tomoko)

筑波大学・附属病院・研究員

研究者番号：20835194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR変異のある小型非浸潤性肺腺癌Adenocarcinoma in situ (AIS)と小型浸潤性肺腺癌の定量プロテオミクス解析を行いました。AISより小型浸潤性肺腺癌で有意に高発現していたタンパク質群についてウエスタンブロット解析により検証を行い、6つのタンパク質(CRABP2、NDRG1、DHCR24、AK4、PIP4K2C、IFITM3)の発現の有意差を確認することができました。肺腺癌の組織マイクロアレイの免疫組織化学染色を行ったところ、5つのタンパク質(CRABP2、NDRG1、DHCR24、AK4、IFITM3)の発現差が予後不良と有意に相関していました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺腺癌のドライバー遺伝子であるEGFR変異は前癌病変や予後のよい上皮内腺癌においても検出され、肺腺癌の悪性化にはEGFR変異以外の因子も関わっている可能性がある。小型肺腺癌のプロテオミクス解析からAISより小型浸潤性肺腺癌で発現が高く、肺腺癌多数症例で予後との相関がみられた5つのタンパク(CRABP2、NDRG1、DHCR24、AK4、IFITM3)が見出された。これらの5つのタンパクは、肺腺癌の悪性度に早期から関与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We performed quantitative proteomics analysis of adenocarcinoma in situ (AIS) and small invasive lung adenocarcinoma which harbored EGFR mutation. Among the proteins those showed higher expression in early invasive lung adenocarcinoma than AIS by proteomics analysis, we could confirm six proteins (CRABP2, NDRG1, DHCR24, AK4, PIP4K2C, IFITM3) those are significantly higher in small invasive adenocarcinoma than AIS by western blot analysis. Using lung adenocarcinoma tissue microarrays, immunohistochemistry was performed, and five proteins (CRABP2, NDRG1, DHCR24, AK4, IFITM3) were significantly correlated with poor prognosis.

研究分野：肺腺癌

キーワード：肺腺癌 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

肺腺癌は日本人の癌の死因 1 位である肺癌のなかでもっとも多い組織型である。初期癌は切除できれば治癒が期待できるが、進行癌は完治することは難しい。

野口らは 2cm 以下の小型肺腺癌を形態的に分類し、肺胞を置換しながら増殖する癌はタイプ A→B→C と多段階的に進行すると報告した (Cancer 1995)。WHO 分類でも第 4 版からタイプ A、B は小型非浸潤性腺癌(上皮内腺癌)として反映されており、タイプ A、B は手術すれば完治する非常に予後の良い癌である。しかし線維芽細胞巢の増生をとまなうタイプ C(小型浸潤癌)は 5 年生存率が 75% である。さらに進行癌は切除不能で 5 年生存率は 6.1% と非常に低い。日本人の肺腺癌のドライバー遺伝子異常で最も頻度が高い遺伝子は EGFR(上皮成長因子受容体)変異である。しかし EGFR 遺伝子変異は前癌病変ですでに存在している場合もあり、EGFR 遺伝子とは別に何らかの悪性化を引き起こす因子があると考えられる。進行癌では多くの遺伝子異常が蓄積しており、その中から悪性化に直接的に関わる真の因子を見出すことは難しい。しかし小型浸潤癌であれば、まだ多くの異常は蓄積されておらず真の悪性化の因子を見つけられると考えられる。

2. 研究の目的

遺伝子変異の蓄積の少ない小型肺腺癌のうち小型非浸潤性肺腺癌と小型浸潤性肺腺癌の発現するタンパク質を網羅的に解析、比較し、肺腺癌の初期悪性化因子を明らかにする。

3. 研究の方法

これまでの研究で、小型非浸潤性肺腺癌 5 例と小型浸潤性肺腺癌 5 例からレーザーマイクロダイセクションで癌細胞のみを採取し、定量解析のための TMT ラベルを行い、さらに微量なタンパクを分画することができる C18-SCX Stage Tip で分画し LC-MS/MS で解析した。この解析法で 4235 個という十分数のタンパク同定ができた。タンパク発現プロファイルを比較すると小型非浸潤性肺腺癌より小型浸潤癌において発現が 2 倍以上高値であった 13 個のタンパクが同定された。今回の研究では同定された悪性化関連候補タンパク 13 個のそれぞれが発現している細胞株を検索し、ウエスタンブロットのポジティブコントロールとした。細胞株から抽出したタンパクを用いてウエスタンブロットを行い、非特異反応の少ない抗体を選択した。これらの抗体を用いて、EGFR 変異のある小型非浸潤性腺癌と小型浸潤性腺癌の凍結組織からタンパクを抽出し、悪性化関連候補タンパク 13 個についてウエスタンブロットを行った。そのうち 6 つのタンパク質 (CRABP2、NDRG1、DHCR24、AK4、PIP4K2C、IFITM3) の発現の有意差を確認することができた。次にプロテオミクス解析に用いた症例を含む約 40 症例の肺腺癌症例で免疫組織化学染色を行った。さらに多数症例の肺腺癌組織マイクロアレイを用いて免疫組織化学染色を行った。6 つのタンパクと予後との関係を統計学的に検討した。

4. 研究成果

プロテオミクス解析において小型非浸潤性腺癌より小型浸潤性腺癌で有意に高発現していたタンパク質群についてウエスタンブロット解析を行い、6 つのタンパク質 (CRABP2、NDRG1、DHCR24、AK4、PIP4K2C、IFITM3) の発現の有意差を確認することができた。プロテオミクス解析に用いた症例を含む約 40 症例で免疫組織化学染色を行ったところ、PIP4K2C を除く 5 つのタンパクにおいて小型非浸潤性腺癌より小型浸潤性腺癌において発現が高かった。さらに多数症例の肺腺癌の組織マイクロアレイ

この免疫組織化学染色を行ったところ、5つのタンパク質(CRABP2, NDRG1, DHCR24, AK4, IFITM3) の発現差が予後不良と有意に相関していた。これらの5つのタンパク質は、肺腺癌の悪性度に早期から関与する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tomoko Dai, Jun Adachi, Yuko Minami, Takeshi Tomonaga, Masayuki Noguchi |
| 2. 発表標題 Protein Profiling of Small Lung Adenocarcinomas: An In-Depth Analysis |
| 3. 学会等名 2019 World Conference on Lung Cancer (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 臺知子、足立淳、朝長毅、南優子、野口雅之 |
| 2. 発表標題 小型肺腺癌の段階的悪性化に関わるタンパクの同定を目的とした網羅的相対定量解析 |
| 3. 学会等名 第65回日本病理学会秋期特別総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|