

機関番号：33303

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20590586

研究課題名 (和文) 悪性中皮腫における癌抑制遺伝子異常-ATBF1 遺伝子解析を中心に-

研究課題名 (英文) Study of tumor suppressor genes on malignant mesothelioma, focusing on ATBF1 gene

研究代表者

湊 宏 (MINATO HIROSHI)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：10293367

研究成果の概要 (和文)：癌抑制遺伝子 ATBF1 の発現は、健常中皮細胞での発現は弱く、悪性中皮腫細胞では主に細胞質に発現が見られた。組織切片中では反応性中皮や胸膜表面の中皮腫細胞で核内での ATBF1 発現もみられ、また培養細胞では増殖を抑制すると核内の ATBF1 発現も一部に認められた。これらのことから癌細胞の増殖浸潤と ATBF1 の細胞内局在との間に関連性が示唆された。しかし、その意義や機序に関してはいまだ明らかでない。

研究成果の概要 (英文)：ATBF1 was weakly positive for non-neoplastic mesothelial cells. In mesothelioma cells, ATBF1 was mostly positive in the cytoplasm. Nuclear staining of ATBF1 was seen with reactive mesothelial cells and a part of mesothelioma cells that localized at the surface on the pleura. After using drugs inhibiting cell growth, some mesothelial cells showed weak nuclear staining of ATBF1. From these findings, there may be some relationship between cell growth and proliferation of mesothelioma cells and the intracellular localization of ATBF1. However, the significance and mechanisms of intracellular localization of ATBF1 are still not clear.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学、病態検査学

キーワード：ATBF1、悪性中皮腫、癌、癌抑制遺伝子、細胞・組織

## 1. 研究開始当初の背景

近年社会問題となっているアスベストと強い関連性のある腫瘍として悪性中皮腫があり、平均生存期間が1-2年という非

常に悪性度の高い腫瘍である。日本では悪性中皮腫の患者が増加しつづけることは確実で、今後40年間の死亡数は10万人を超えると予想されている。悪性中皮腫の発

生機序に関してはアスベストの存在に伴う活性酸素・活性窒素の発生や、アスベスト繊維による直接的な組織傷害などが考えられているが、未だ十分に解明されていない。腫瘍発生に長い年月が必要であることから癌遺伝子、癌抑制遺伝子、アポトーシス抑制、不死化などに関わる多数の遺伝子異常が蓄積し癌化のプロセスをたどると推測されているが、早期の発生病態に関してほとんど解明されていないのが現状である。

AT motif binding factor-1 (ATBF1)は、当初 $\alpha$ -fetoprotein (AFP)の転写を抑制する大きな転写抑制因子として発見されたが、その後その転写抑制機能はp53による転写調節機能と深い関係があることが明らかとなった。細胞周期制御に関してもATBF1とp53は協調的に作用してp21 (CDKN1A)遺伝子を活性化し、増殖制御に関わるということが明らかとなっている。またATBF1遺伝子は多数の癌で染色体欠失が報告される16番染色体に存在し、前立腺癌例の約4割でsomatic mutationが示された。さらにATBF1は胃癌、乳癌、膀胱癌などに共通して感度の高い臨床的予後決定因子であり、新しい癌抑制遺伝子であることが証明された。しかし、マウス胚細胞性腫瘍株であるP19の神経分化誘導系ではATBF1が発現しても細胞周期が停止しないという矛盾する現象が認められる。その理由として抗ATBF1抗体を用いた検討によりP19細胞ではATBF1は細胞質に留まり、核内に存在していないことが判明した。すなわちATBF1が転写調節因子として機能するには核でDNAに結合する必要があるということである。

## 2. 研究の目的

悪性中皮腫の発癌においてATBF1遺伝子の変化が関連しているかどうか、関連していればその機序に関して解析するのが本研究の主な目的である。

悪性中皮腫の病理組織標本や培養細胞株を用いてATBF1蛋白発現や遺伝子の変異が存在するかどうかを調べることと、健常細胞や他の癌細胞との差異を明らかにすることを目的とした。さらに癌抑制遺伝子との関連性や、それらを含めた変異の頻度、細胞質内局在を多数の悪性中皮腫症例を用いて解析することを目指した。また悪性中皮腫には上皮型と肉腫型、その混合型と大きく3組織型に分類されるが、これら形態学的差異とATBF1発現についても解析することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 悪性中皮腫の症例の収集と病理

### 学的診断、組織型の確定

外科的に切除あるいは剖検で得られた悪性中皮腫症例を対象とし症例を収集する。金沢医科大学、金沢大学および協力関係にある北陸地方を中心とした病院から中皮腫症例を収集し、HE染色を行う。形態学的所見とともに複数の中皮腫マーカーと癌のマーカーを用いた免疫組織化学的検討を行い診断を確認する。また中皮腫の組織学的分類と研究に用いる反応性中皮と考えられる症例や肺腺癌症例を抽出する。

### (2) 癌抑制遺伝子ATBF1、p21、p16の免疫組織化学的解析

三浦らがクローニングした抗ATBF1抗体や、p16、p21のモノクローナル抗体などを用い免疫組織化学的解析を行う。至適な抗体濃度と前処理などの適切な染色条件を決定し、酵素抗体法を用い染色する。細胞内での各癌抑制遺伝子の局在と染色パターンを詳細に記録観察し、悪性中皮腫細胞と反応性中皮細胞、肺腺癌などとの比較を行う。

### (3) 悪性中皮腫培養株でのATBF1発現と遺伝子発現量の解析

悪性中皮腫培養株を入手し、ATBF1蛋白の発現と遺伝子量を解析する。抗ATBF1抗体を用いた免疫細胞化学、免疫蛍光法でATBF1蛋白発現を調べる。また細胞質成分と核内成分を分離抽出し、ウェスタンブロット法を用いて、それぞれの成分中のATBF1蛋白量をみる。さらにATBF1のプライマーを設定し、定量RT-PCR法を用いて、培養細胞中でのATBF1 mRNA量を測定する。引き続き、種々の細胞増殖阻害剤あるいは分化誘導剤とされる薬剤を用いて、悪性中皮腫培養株でのATBF1発現の変化を蛍光抗体法を用いて観察するとともに、mRNA量を測定し、細胞内局在との関連性を調べる。

## 4. 研究成果

### (1) 悪性中皮腫の症例の収集と病理学的診断、組織型の確定

悪性中皮腫症例21例を収集し、HE像の確認と特殊染色、免疫染色を行った。免疫組織化学的に悪性中皮腫のマーカーであるカルレチニン・CK5/6・D2-40・vimentin等と、癌のマーカーであるCEA・BER-EP4・MOC-31・CD15等を用いて診断の確認、組織型の分類を行った。

### (2) 悪性中皮腫での癌抑制遺伝子ATBF1の免疫組織化学的検討

ATBF1に対するラットモノクローナ

ル抗体 R87 を精製し、パラフィン包埋切片の免疫組織化学に応用した。非腫瘍部の肺では血管平滑筋や神経組織、気管支上皮などが染色された。21 例の悪性中皮腫と 40 例の非腫瘍性の胸膜中皮、28 例の肺腺癌例のパラフィン包埋切片を用いて ATBF1 (R87) 抗体免疫組織化学を行った。悪性中皮腫では 4 例が陰性、4 例が細胞質のみ陽性、残り 13 例は細胞質、核ともに陽性を示した。反応性中皮細胞では 27 例が陰性、細胞質のみ弱陽性が 2 例、核のみ弱陽性が 1 例、細胞質、核ともに弱陽性が 10 例であった。肺腺癌では 6 例が陰性、細胞質のみ陽性が 19 例、細胞質、核ともに陽性が 3 例であった。非腫瘍性の病変での染色性は弱く、ATBF1 の発現が弱いことが示唆された。腫瘍においては、肺腺癌では細胞質に主に染色され、悪性中皮腫では核と細胞質がともに染色される症例が多く認められ、発現パターンに違いが見られた。悪性中皮腫では、組織型による明らかな染色態度の差異は認められなかったが、胸膜表層にある部分では核に染色され、浸潤部では核と細胞質ともに染色される傾向がみられた。このことから悪性中皮腫の浸潤と ATBF1 の細胞内局在との間に何らかの関係が存在する可能性が示唆された。

### (3) 他の癌抑制遺伝子の免疫組織化学的解析

p16、p14 の免疫染色では悪性中皮腫での陽性率はそれぞれ 30%、20%で、ともに細胞質に弱く染色される程度であった。p21 は 50% の症例の腫瘍細胞核に陽性で、非腫瘍部の細胞には陰性を示した。これらの結果から、癌抑制遺伝子 p14、p16、p21 等は一部の悪性中皮腫で重要な役割を果たしている可能性があるが、ATBF1 との直接的な関係は免疫染色では明確でなかった。

### (4) 悪性中皮腫培養株での ATBF1 の細胞内局在について

① 2 種の悪性中皮腫培養株で ATBF-1 蛋白のそれぞれ別の領域を認識する R87、D1-120、AT-6 抗体を用いた免疫組織化学および免疫蛍光染色を行った。その結果中皮腫細胞では ATBF1 はいずれも主に細胞質に染色された。しかし、蛍光染色では共焦点顕微鏡にて核内に少量の ATBF1 の発現を確認した。

② 細胞増殖阻害剤投与による ATBF1 の核細胞質移行について：細胞分化誘導の試みとしてレチノイン酸 (RA)、サイクロスポリン A (CyA)、12-O-テトラデカノイル

ホルボール-13-アセテート (TPA) をそれぞれ投与し、中皮腫細胞の形態学的変化と ATBF1 の細胞内局在および定量を行った。細胞成長曲線では TPA が最も細胞数が減少し、RA、CyA ではコントロールよりもわずかな減少をみた。蛍光染色では CyA で ATBF1 の発現に変化はみられなかったが、RA と TPA を投与した場合に核内の蛍光強度の増加を見た。AT-6 抗体を用いたウェスタンブロット法で 400kD を超える ATBF1 蛋白の発現をそれぞれの培養株の細胞質内成分に認め、1 種の培養株では核内成分にも薄いバンドを確認できた。TPA 投与では 400kD を超えるバンドは細胞質内で明らかに減少し、290kD 以下へのバンド移行を認めた。核内には 400kD 強のバンドを確認できず、290kD 以下のバンドを見た。TaqMan プローブを用いた real time RT-PCR を行ったところ、TPA 投与後の ATBF1 mRNA 量は 31% と減少を見たが、RA、CyA では 100%、92% であった。この結果より悪性中皮腫では細胞動態あるいは分化の違いにより ATBF1 の細胞内局在が異なる可能性が示唆された。癌化や細胞増殖能の違いにより ATBF1 遺伝子あるいは蛋白が細胞質あるいは核内でどのような形で存在し、機能しているかについては今後明らかにしていきたい。

### 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 7 件)

① Shimizu J, Minato H (他 5 名, 7 番目), Adenosquamous carcinoma of the lung in a patient with complete situs inversus. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 査読有, 17, 2011, 178-181.

② Minato H, Nojima T (他 6 名, 1 番目), Solitary intrapulmonary cystic lymphangioma in an infant: A case report with literature review. *Pathol Res Pract*, 査読有, 206, 2010, 851-856.

③ Shimizu J, Minato H (他 4 名, 6 番目), Clinicopathological study of surgically treated cases of traceobronchial adenoid cystic carcinoma. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 査読有, 58, 2010, 82-86.

④ Shimizu J, Minato H (他 7 名, 9 番目), Advanced lung cancer invading the left atrium, treated with pneumonectomy combined with left atrium resection under cardiopulmonary bypass. *Ann*

Thorac Cardiovasc Surg, 査読有, 16, 2010, 286-290.

⑤ Shimizu J, Minato H (他 5 名, 7 番目), Modification of the surgical procedure to enable the complete resection of lung cancer with carcinomatous pleuritis. Surg Today, 査読有, 40, 2010, 890-893.

⑥ 湊 宏, 肺転移性腫瘍の鑑別診断. 病理と臨床, 査読無, 28, 2010, 239-246.

⑦ Minato H, Nojima T (他 2 名, 1 番目), Adenomatoid tumor of the pleura. Pathol Int, 査読有, 59, 2009, 567-571.

[学会発表] (計 2 件)

①山下 学, 湊 宏, 野島孝之, 他. 悪性中皮腫 9 例における SV40、JCV、BKV 感染の有無について. 第 98 回日本病理学会総会, 2009 年 5 月 2 日, 京都.

②山下学, 湊 宏, 野島孝之, 他. 淡明細胞型中皮腫の 1 例. 第 47 回日本臨床細胞学会秋期大会, 2008 年 11 月 14-15 日, 東京.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

湊 宏 (MINATO HIROSHI)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10293367

### (2) 研究分担者

野島 孝之 (NOJIMA TAKAYUKI)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 50142732

竹上 勉 (TAKEGAMI TSUTOMU)  
金沢医科大学・付置研究所・教授  
研究者番号: 10113490

三浦 裕 (MIURA YUTAKA)  
名古屋市立大学・医学部・准教授  
研究者番号: 90285198