

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07454

研究課題名(和文) 抗酸化酵素PRDX4の生体内防御機構に基づく、肺癌の病態メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanistic insights into the patho-etiology of lung cancer, especially focusing on the protective effects of promising antioxidant enzyme, PRDX4

研究代表者

山田 壮亮 (YAMADA, Sohsuke)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：90525453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍においては、抗酸化酵素の作用が広く注目されている。特にPRDX familyの防御的役割に注目し、我々は世界で初めて、PRDX4の高発現が Stage I 肺癌における術後予後の有意な良好予測因子であり、さらにEGFR変異とも密接に関連性があることも報告し得た。

ここで我々は、研究を進展させ、ウレタン誘導性肺腫瘍 animal model の病理組織学的・分子生物学的解析を中心とする、PRDX4の肺癌発生・進展抑制メカニズムに対する検討を深めた。結論としては、PRDX4の過剰発現により、腫瘍微小環境が有意に変化し、マウス肺腺癌の増殖・進展が明らかに亢進することを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PRDX4の過剰発現は、腫瘍の微小環境をcriticalに調節し、ウレタンによる肺癌誘発マウスモデルにおける腫瘍発生を促進し得ることを、世界で初めて突き止め先駆けて公表し得た。今後は、肺癌治療における抗酸化酵素の臨床応用が大きく期待されるため、さらに詳細な分子メカニズムの解明、一方で生体応用へ向けた新たなモデルの構築(in vivoだけでなくin vitro系も含めた)を模索している。

当研究成果の学術的意義はtranslational researchとしての意義が非常に深い。さらに、肺癌治療における抗酸化酵素PRDX4の応用が将来的に期待されるという、社会的意義にも富んでいる。

研究成果の概要(英文)：Peroxiredoxin 4 (PRDX4), initially reported as an antioxidant, is overexpressed in lung cancer and participates in its progression. However, its role in the urethane-induced lung tumor model is undetermined. Human PRDX4 overexpression transgenic (Tg) mice and non-Tg mice were intraperitoneally injected with urethane to induce lung tumor. After 6 months, both the average number of tumors (more than 0.5 mm) and tumor diameter per mouse in the Tg group were significantly larger than in non-Tg controls. Tumor cell proliferation was enhanced, while tumor cell apoptosis was suppressed in Tg mice. Systemic oxidative stress and oxidative stress in lung tumors were inhibited by PRDX4 overexpression. In lung tumor tissue, the expressions of cytokines, including interleukin-1 beta (IL-1) and matrix metalloproteinase 9 (MMP9), were elevated in Tg. In conclusion, PRDX4 overexpression modulated tumor microenvironment and promoted tumor development in the mouse urethane-induced lung cancer model.

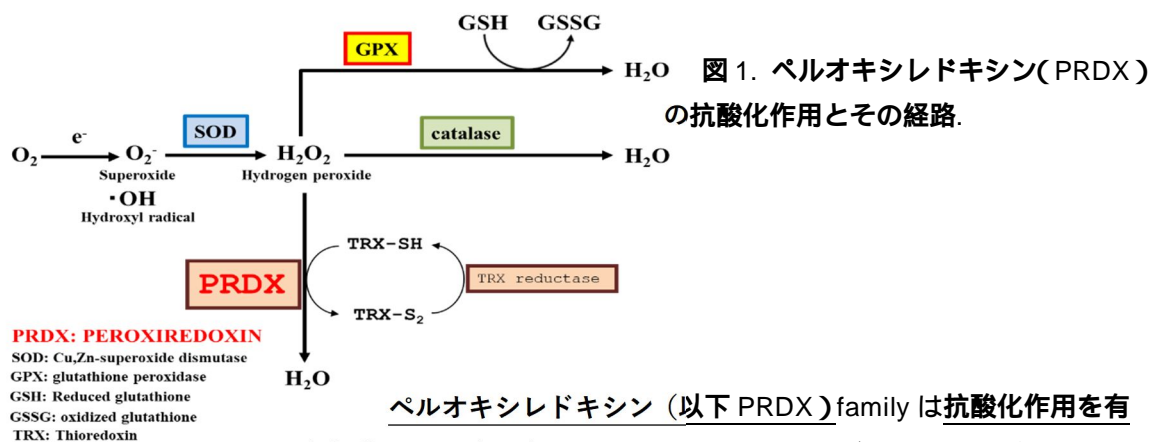
研究分野：実験病理

キーワード：抗酸化ストレス因子 ペルオキシレドキシン(PRDX) PRDX4 肺癌 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

肺癌は、世界で最も死亡者が多い、いわゆる難治性癌の一つであるが、その理由は、多くの場合、発見時すでに進行しており、また効果的な治療を施行し得ないからであり、その意味においても、肺癌の予防・効果的治療は急務である。

一方、 O_2^- 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 を含む活性酸素種 (ROS)に関しては、50年以上もの間、世界各国で研究が行われており、人が罹るあらゆる病気に ROS の関与していることが明らかになってきた。ROS は細胞に攻撃をしかけ、細胞が酸化させられることによって、生活習慣病や癌が引き起こされると考えられている。特に、ROS は癌の発生・進展と深く関わっている。細胞の外側を覆っている細胞膜が、ROS によって過酸化脂質に変化することにより細胞膜自体が破壊されると、DNA が ROS によって傷害を受ける。すると、突然変異の遺伝子をつくり出してしまい、この変異した細胞が癌細胞になり得る。それだけでなく、ROS は、癌細胞に対して増殖促進 (プロモーター活性) と腫瘍悪性度を進展させることも知られている。



ペルオキシレドキシン (以下 PRDX) family は抗酸化作用を有する一酵素群であり (図 1)、少なくとも 6 種類に及ぶ生体内発現が報告されている。特に PRDX4 は唯一の分泌型として発現しており、血管内を含む細胞外領域において酸化ストレスからの組織傷害を防御する役割を持っているとされている。我々が PRDX family の中で唯一分泌型の PRDX4 に、特に着目し、ヒト PRDX4 (hPRDX4) のトランスジェニックマウス (Tg)を独自に作製し、2 型糖尿病、動脈硬化、および非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) や胆管閉塞性肝障害に対する、hPRDX4 の保護・防御的機構および抑制効果を有していることを明らかにしてきた (Ding Y, Yamada S, et al., *Antioxid Redox Signal*, 2010. [IF = 8.21]; Guo X, Yamada S, et al., *Antioxid Redox Signal*, 2012. [IF = 7.19]; Nabeshima A, Yamada S, et al., *Antioxid Redox Signal*, 2013. [IF = 7.67]; Nawata A, Yamada S, et al., *PLoS One*, 2016. [IF = 2.81]; & Jing Z, Yamada S, et al., *Int J Mol Sci*, 2018. [IF = 3.68]. Corresponding author)。

酸化ストレスは癌の増殖と悪性度を進展させることから、最近、肝細胞癌 (HCC) をターゲットとして動物実験モデルを進展させた。hPRDX4 の高発現は、肝組織内および循環血液中において酸化ストレスを有意に軽減し、HCC に対して保護・防御的に作用していることをも報告し得た (Guo X, Uramoto H, Yamada S, et al., *Antioxid Redox Signal*, 2019. [IF = 6.53].)。

また同時に近年、我々は stage I 肺腺癌において、hPRDX4 の発現が重要な予後予測因子となり、EGFR 変異と密接に関連していることも報告している (Shioya A, Guo X, Uramoto H,

Yamada S, et al., *Int J Med Sci*, 2018. [IF = 2.40].; & Mizutani K, Guo X, Uramoto H, Yamada S, et al., *Int J Med Sci*, 2019. [IF = 2.33].)。しかし、肺癌発生・進展において、PRDX4の詳細な役割はまだ不明な部分が多い。そこで、同様に、肺腫瘍 animal model の病理組織学的・分子生物学的解析を中心とする、肺癌の発生・進展を抑制するメカニズムに対する検討を深め、PRDX4を含む抗酸化酵素の治療応用を模索することが本課題の目的である。実際、抗酸化作用を主とする治療法によって酸化ストレスを十分に軽減させられれば、「癌」の悪化や促進を抑え得るため、癌細胞の増殖抑制や細胞死（アポトーシス）誘導の効果が期待される。

2. 研究の目的

本研究では特に、上記Tgマウスを用いた肺癌mouse modelの、病理組織学的・分子生物学的解析を中心としながら、肺癌の発生と進展に酸化ストレスが如何に関わるか、そのメカニズムに対する検討を進め、PRDX4を含む抗酸化酵素の癌治療応用を模索することを目的とする。

[Keywords: ペルオキシレドキシシン(PRDX)4, 酸化ストレス, 肺癌, 癌治療]

3. 研究の方法

(2020・2021・2022年度)

A. 我々が独自に作製したヒトPRDX4 (hPRDX4)のトランスジェニックマウス(Tg)マウスに対する、肺癌モデルの作製

8週齢のTgとC57BL/6 wild type (WT)マウス各々に、発癌剤 Urethane (1g/kg)、またはコントロールとして生理食塩水を1回/weekで腹腔内投与し、16週経過した時点で解剖を行い、肺を含め、全身諸臓器を摘出する。特に、摘出肺内に存在する肉眼的に明らかな癌結節の数をcountし、組織学的にも腫瘍であることを確認する。

B. 免疫組織学的・血清学的・分子生物学的観察

肺・脾・腎・肝および小腸のパラフィン包埋切片を作製する。Hematoxylin and eosin (H&E)、およびElastica van Gieson (EVG)特別染色を行う。さらに炎症細胞浸潤の程度を、T-cellを同定するCD3、マクロファージを同定するMac-2および好中球を同定するLy-6Gの免疫染色を各々施行し、細胞数のcountを行って比較検討する。

また、酸化ストレス/ROSマーカー(8-OHdG, 4-HNE, ox-LDL)、また様々な炎症性サイトカインの免疫染色も行う。ELISA Kitsを用いて、血清中のhPRDX4、Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)、H₂O₂等の指標も検討する。さらに、Real-time PCRまたはWestern blottingにて、様々な炎症性サイトカインや腫瘍の増殖・浸潤との関連因子の発現を検討する。

(2021・2022年度)

C. 肺癌培養細胞におけるPRDX4が働くメカニズムの検討

既知の肺癌培養細胞 A549 系に、PRDX4 geneのplasmid DNA、また逆にsmall interference (si) RNAのtransfectionを施行し、増殖および移動能力やアポトーシスを含めた細胞動態の変化を観察する。また、細胞を回収し、mRNAおよび蛋白を抽出し、Real-time PCR、Western blotting、immunofluorescence等の方法にて、抗酸化酵素、EGFR関連因子を含めた腫瘍増殖と浸潤、アポトーシス等、様々な因子の発現を評価する。さらに、ELISAにより、培養上清中の抗酸化ストレス、炎症性サイトカイン、腫瘍の増殖・浸潤との関連因子等の発現も測定する。

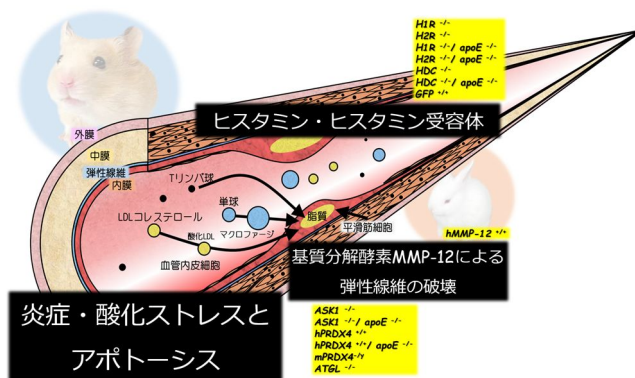
[役割分担]

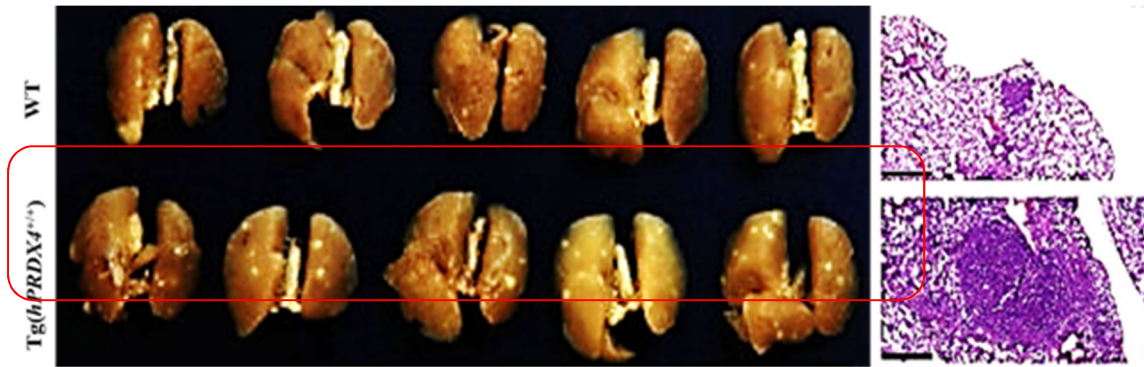
- I. 山田 壮亮(研究代表者)：金沢医科大学 臨床病理学 教授(講座主任)
実験計画の立案。上記A・B、及び実験結果の推敲。Discussionを含めた論文作製全般。
- II. 郭 鑫(研究分担者)：金沢医科大学 臨床病理学 助教
マウスの飼育。上記A・B・C、結果のまとめ、推敲。
- III. 浦本 秀隆(研究分担者)：金沢医科大学 呼吸器外科学 教授(講座主任)
実験計画の立案。実験結果の推敲。論文編集全般。

4. 研究成果

我々の基本スタイルとしては、動脈硬化が病理組織学的に炎症を基盤とし発生・進展していることに着目し、そのメカニズム解明のため、**マウス・ウサギ等の遺伝子改変モデル動物**(右下图)を主に用い、形態学、生化学、分子生物学の手法による解析とを統合した「**形態から分子**」に至る、幅広い視野での**基礎研究(実験病理学分野)**を行ってきた。さらに動脈硬化だけでなく糖尿病や非アルコール性脂肪肝炎等をも表現型とする「**メタボリックシンドローム**」というentityより俯瞰することによって、脂質を含む代謝プロセスの解明の中から、種々の慢性炎症性疾患を多角的・包括的に捉え直している。我々のグループでは特に、ヒトPRDX4のTgマウスを独自に作製し、PRDX4が酸化ストレスおよび炎症性サイトカイン、アポトーシスを抑制し、メタボリックシンドローム回避に傾かせしめ得ることを解明してきた(平成24~26年度(代表)：科研費 若手研究(B) (24790394) & 平成28~30年度(代表)：科研費 基盤研究(C) (16K08750))。2013年には**日本病理学会学術奨励賞**、2017年には**日本病理学会学術研究賞(A演説)**を受賞(「**動脈硬化からメタボリックシンドロームへ ~ 遺伝子改変動物モデルを用いた病理組織学的検討 ~**」)した。その間、産業医科大学講師の任期中にUniversity of Graz, Austriaへ留学、鹿児島大学講師を経て、2017年7月に金沢医科大学にご縁をいただく。

新天地での困難な出発の中、研究の連続性から、PRDX4が癌をも制御し得る可能性、さらにそのメカニズムを解明することが出来れば、PRDX4の独自性/特異性を際立たせられると確信し、新研究チーム体制を立ち上げた。悪性腫瘍の発生・進展においては、抗酸化酵素の重要な関わりが広く注目されている。実際、**各悪性腫瘍によって、PRDX4の増殖促進的役割と、相反するPRDX4の抑制的役割とを、それぞれuniqueに有していることを報告すると同時に、ここ5年間で12人もの学位取得者(研究分担者の塩谷・韓を含め)**を輩出し得た。その中でも、当研究課題で、我々は世界で初めて、**ウレタンによる肺癌誘発マウスモデルにおけるPRDX4の役割**を検討した。意外なことに、Tg群では腫瘍の数と直径が共に有意に増加しており(下图)、PRDX4の過剰発現は悪性腫瘍の微小環境を強力に調節し腫瘍発生を促進することを報告し得た(令和2~4年度(代表)：科研費 基盤研究(C) (20K07454))。肺癌治療における、抗酸化酵素PRDX4の治療応用が将来的に期待されるものとなった。





(Tg(*hPRDX4*^{+/+})マウスでは、肺癌の数・直径が共に有意に増加していた)

(reproduced from Zheng J, Yamada S, *et al. Oxid Med Cell Longev*, 2020.)

以下に、本課題との関連性を有する近年の代表論文を記載させていただきます。

1. *J Invest Dermatol*, Yamaguchi R, Yamada S, *et al.* (2021; 141(11): 2720-2729.)
2. *Nutrients*, Han J, Yamada S, *et al.* (2021; 13(10): 3455.)
3. *Histol Histopathol*, Azukisawa S, Yamada S, *et al.* (2021; 36(11): 1169-1178.)
4. *Free Radic Biol Med*, Kobayashi S, Yamada S, *et al.* (2021; 174: 12-27.)
5. *Oxid Med Cell Longev*, Zheng J, Yamada S, *et al.* (2020; 2020: 8262730.)
6. *Am J Transl Res*, Zheng J, Yamada S, *et al.* (2020; 12(6): 2726-2737.)
7. *World J Gastroenterol*, Han J, Yamada S, *et al.* (2020; 26(34): 5118-5129.)
8. *Antioxid Redox Signal*, Guo X, Yamada S, *et al.* (2019; 30(10): 1271-1284.)
9. *Int J Med Sci*, Mizutani K, Yamada S, *et al.* (2019; 16(9): 1199-1206.)
10. *Pathol Int*, Yamada S & Guo X. (2018; 68(2): 91-101)
11. *Int J Mol Sci*, Zhang J, Yamada S, *et al.* (2018; 19(9): 2509.)
12. *Int J Med Sci*, Shioya A, Yamada S, *et al.* (2018; 15(10): 1025-1034.)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yuki Takaoka, Xin Guo,, Akihiro Shioya Jia Han, Yuzo Shimode, Yoshiaki Kobayasi, Morimasa Kitamura, Hiroyuki Tsuji and Sohsuke Yamada	4. 巻 3(1)
2. 論文標題 PRDX4 Potentially Predicts the Postoperative Outcome in Advanced Papillary Thyroid Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 endocrines	6. 最初と最後の頁 139-149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/endocrines3010013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Reimon Yamaguchi, Xin Guo, Jianbo Zheng, Jing Zhang, Jia Han, Akihiro Shioya, Hidetaka Uramoto, Takashi Mochizuki, Sohsuke Yamada	4. 巻 141(11)
2. 論文標題 PRDX4 Improved Aging-Related Delayed Wound Healing in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol	6. 最初と最後の頁 2720-2729
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2021.04.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zheng J, Guo X, Nakamura Y, Zhou X, Yamaguchi R, Zhang J, Ishigaki Y, Uramoto H, Yamada S.	4. 巻 2020
2. 論文標題 Overexpression of PRDX4 Modulates Tumor Microenvironment and Promotes Urethane-Induced Lung Tumorigenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oxid Med Cell Longev	6. 最初と最後の頁 8262730
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/8262730	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Zheng J, Guo X, Shioya A, Yoshioka T, Matsumoto K, Hiraki T, Kusano H, Oyama T, Kurose N, Yamaguchi R, Uramoto H, Ieiri S, Okajima H, Kohno M, Yamada S.	4. 巻 12(6)
2. 論文標題 Peroxiredoxin 4 promotes embryonal hepatoblastoma cell migration but induces fetal cell differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Transl Res	6. 最初と最後の頁 2726-2737
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口礼門、山田壮亮
2. 発表標題 ペルオキシレドキシシン 4 はマウスの加齢による創傷治癒遅延を改善する
3. 学会等名 第111回 日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 韓佳、山田壮亮
2. 発表標題 Overexpression of PRDX4 Modulates Tumor Microenvironment and Promotes Urethane-Induced Lung Tumorigenesis
3. 学会等名 第8回 明日の呼吸器疾患を考える会in鞍月
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田壮亮
2. 発表標題 動脈硬化からメタボリックシンドロームまで～種々の動物モデルを用いた病理学的検討～
3. 学会等名 第5回中性脂肪学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田 壮亮
2. 発表標題 Peroxiredoxin 4 improved aging-related delayed wound healing in mice
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会・第21回日本N0学会共同学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Zheng J, Guo X, Yamada S.
2. 発表標題 Peroxiredoxin 4 promotes embryonal hepatoblastoma cell migration but induces fetal differentiation
3. 学会等名 第109 回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 北川 昌伸、仁木 利郎、小田 義直(分担執筆：山田壮亮)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 856
3. 書名 標準病理学 第7版(「総論：代謝」を分担執筆)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www.kanazawa-med.ac.jp/~clinpath/topics/ https://researchmap.jp/sohsukeyamada
--

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
研究 分 担 者	郭 シン (GUO Xin) (40816328)	金沢医科大学・医学部・助教 (33303)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	浦本 秀隆 (URAMOTO Hidetaka) (90389445)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	

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