

機関番号：33303
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010年
 課題番号：21790369
 研究課題名（和文）肺腺癌微小乳頭状成分の高侵襲性に関わる遺伝子パスウェイの検索とその応用
 研究課題名（英文）Investigation of molecular mechanism involved in the aggressiveness of micropapillary component of adenocarcinoma of lung
 研究代表者 島崎 都 (SHIMASAKI MIYAKO)
 金沢医科大学・医学部・助教
 研究者番号：00440511

研究成果の概要（和文）：肺腺癌微小乳頭状成分（MPC）の高侵襲性に関わる遺伝子群をアレイ解析し、MPCを含む腺癌は通常型乳頭状腺癌とは異なるクラスターに区分された。MPC群はさらに病期進展程度に相関する遺伝子発現パターン区分も検出され、発現差を示す約30種の関連遺伝子が選別されると共に、蛋白および mRNA レベルで検証された。Aquaporin 1, 5 の発現亢進が MPC 群の予後不良因子であることが明らかになり、細胞移動能亢進への関与を *in vitro* の解析で示した。

研究成果の概要（英文）：Micropapillary component (MPC) has recently been accepted as a new prognostic factor of adenocarcinoma of the lung. Its molecular mechanism is, however, hardly elucidated. To establish a novel remedy for controlling advanced adenocarcinoma of the lung, molecular mechanism of the aggressiveness of micropapillary component was addressed in the present study. Cluster analyses of the gene expressions detected by cDNA microarray (Gene Chip, Affimetrix) separated adenocarcinomas with MPC from ordinary papillary adenocarcinomas. The adenocarcinomas with MPC were further divided into distinct two gene-expression patterns according to the tumor progression. While 30 genes showed significant different expressions between them, the upregulation of S100PA4 and down regulation of CXCL14 were demonstrated to be correlated with progression of MPC both at mRNA and protein levels. The present study also demonstrated the involvement of over-expression of aquaporin (AQP) 1 and 5 in the aggressive growth of adenocarcinoma with MPC, proposing the over-expression of AQP1 as a novel unfavorable prognostic factor of adenocarcinoma with MPC. *In vitro* studies using the transfection of AQP1 and siRNA of AQP1 gene showed increased cell motility and invasiveness of tumor cells through enhanced pseudopodia-formation. These results suggest that AQP1 and 5 may be a promising candidate molecules for gene-targeting therapy against adenocarcinoma of the lung.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：呼吸器

キーワード：肺癌、微小乳頭状成分、AQP1、細胞移動能、浸潤能

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌は我が国の悪性新生物による死亡原因の首座を占める臨床上最重要の腫瘍である。特に腺癌症例の増加が著しいが、診断・治療に関しその多様性に起因する多くの解決すべき課題が残されている。

(2) 近年、血管軸を伴わない微小乳頭状成分 micropapillary component が、脈管侵襲、リンパ節転移、肺内転移などの侵襲性と関連する新たな予後不良因子であることが複数の施設から報告され (Miyoshi T et al. Am J Surg Pathol 27:101-9, 2003; Mod Pathol 21:992-1001, 2008)、WHO 2004 分類以後の新たな独立した亜分類として認定されようとしている (Am J Surg Pathol 32: 810-827, 2008)。しかし、微小乳頭状成分の高い脈管侵襲性や転移能に関わる分子機構に関してはこれまで国内外においてほとんど知られていない。

2. 研究の目的

肺腺癌の新たな予後不良因子として近年提唱された微小乳頭状成分 micropapillary component に注目し、その高侵襲性に関わる分子機構の解明と臨床応用を目指し、以下の3項目を研究目的とした。

(1) 肺腺癌微小乳頭状成分に特異的な高侵襲性に関わる遺伝子群の選別

(2) 選別された遺伝子群の肺腺癌微小乳頭状成分における発現の検証

(3) 選別された遺伝子の肺腺癌進展における生物学的意義の解明

3. 研究の方法

(1) 微小乳頭状成分が全体の50%以上を占める肺腺癌4症例と通常の肺乳頭状腺癌3症例の新鮮凍結組織から microdissection 法により total RNA を抽出し、One-cycle Target Labeling kit (Affymetrix 社) を用いた 3' -amplification による biotin 標識プ

ローブを作製し、Affymetrix 社の Gene Chip (Human genome U133 Plus 2.0 Array) を用い cDNA マイクロアレイ法により遺伝子発現プロファイリングデータを獲得した。Q-FARMS を含む複数のアルゴリズムにより遺伝子発現を含む用いクラスター解析を行い、各クラスターで有意な発現差を示す遺伝子群を選別した。

(2) 選別された主要遺伝子と AQP1, 5 遺伝子の発現を、腫瘍進行度の異なる微小乳頭状腺癌成分を含む肺腺癌多数例の新鮮及びホルマリン固定・パラフィン包埋腫瘍組織を用い、real time RT-PCR 法ならびに免疫染色により mRNA と蛋白レベルでの発現を検証した。

(3) ヒト線維肉腫細胞株 HT1080 を用い、AQP1 遺伝子トランスフェクション法による強制過剰発現と siRNA 法を用いた AQP1 遺伝子のノックダウンを行い、細胞増殖、形態、移動能、浸潤能への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) cDNA Microarray による遺伝子発現解析の Q-FARMS アルゴリズム解析により MPC を含む腺癌と通常の乳頭状腺癌は統計学的な有意差を持って異なるクラスターに区分された。MPC 群では、さらに、病期進展程度に相関する遺伝子発現パターン区分が検出され、有意な発現差を示す約 30 種の関連遺伝子が選別された。

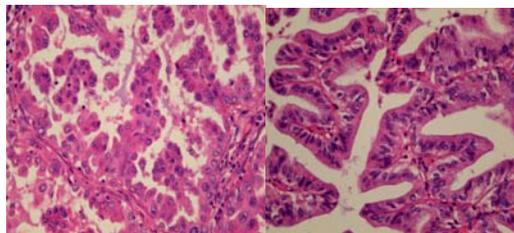


図 1A, B 微小乳頭状肺腺癌 (A. 左図) と通常の肺乳頭状腺癌組織 (B. 右図)

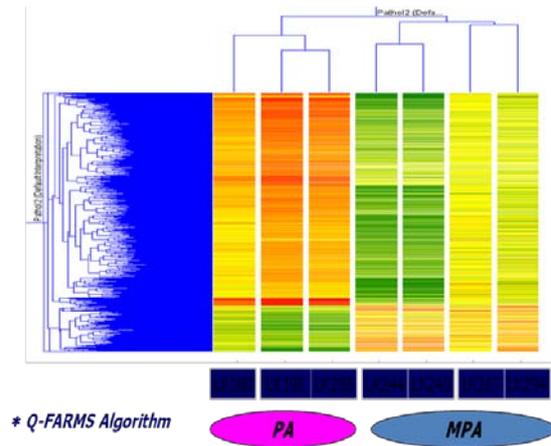


図 2. 肺微小乳頭状腺癌 (MPA) と通常型乳頭状腺癌 (PA) における遺伝子発現のクラスター解析 (Q-FARMS アルゴリズム)

(2) 上記遺伝子群なかで、S100PA4 と CXCL14 に関し MPC を含む肺腺癌多数症例での検証を行った。S100PA4 の発現亢進、CXCL14 の発現低下の、MPC を含む肺腺癌の腫瘍進展との関係が蛋白および mRNA レベルで検証された。

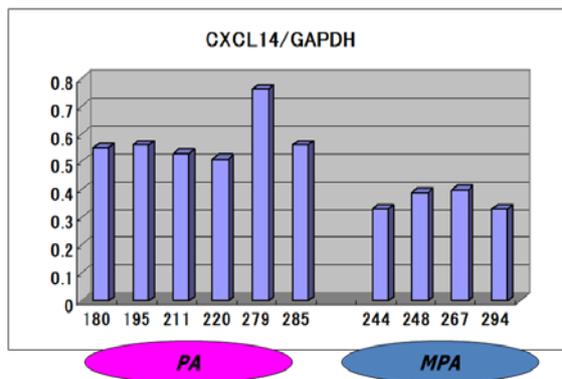
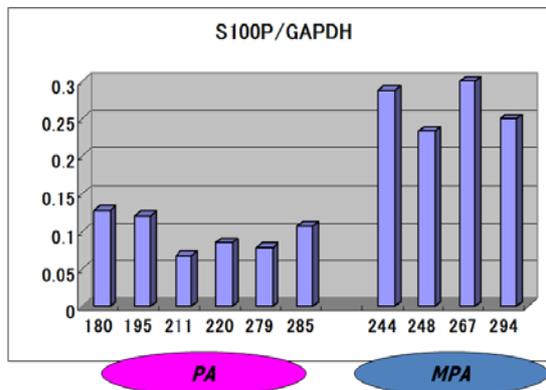


図 3 A, B. 肺微小乳頭状腺癌 (MPA) と通常型乳頭状腺癌 (PA) における S100A4 (A)、CXCL14 (A) 遺伝子の mRNA 発現 (real time RT-PCR 法)

(3) MPC を含む肺腺癌での aquaporin (AQP) 1, 5 遺伝子発現亢進を蛋白および mRNA レベルで確認した。AQP1 の発現亢進が MPC を含む肺腺癌症例の予後不良因子であることが明らかになった。

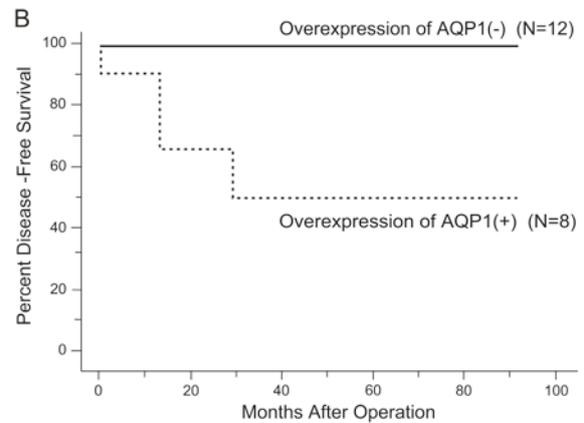
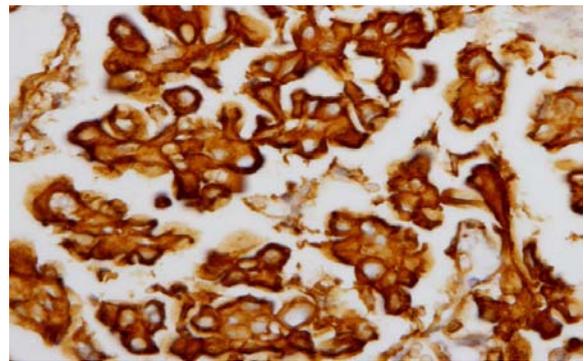


図 4 A, B. 肺腺癌 MPC 成分の AQP1 過剰 (A. 上図) と生命予後への (B. 下図)

(4) AQP1 の発現による腫瘍細胞の侵襲性亢進性の機序の解明を HT1080 細胞を用い行い、以下の結果を得た: A) HT1080 は AQP1 をほとんど産生しない。トランスフェクションによる AQP1 遺伝子の強制発現により偽細胞突起形成促進と同部細胞膜・細胞質への AQP1 発現局在に加え、細胞移動と浸潤能亢進が scratch assay と matrigel invasion assay により確認された。

B) HT1080 をヌードマウスの皮下あるいは大腿筋内接種し異なる転移能を示す自然転移モデルを作成した。後者 (HT1080M) は前者 (HT1080SC) に比べ肺転移の有意な亢進を認めた。接種部では HT1080SC は膨張性発育なのに対して、HT1080M では筋線維内への偽細胞突起形成も伴う浸潤性増殖を呈し、同部に AQP1 の発現亢進を認めた。接種部腫瘍から得られた短期培養細胞では、HT1080M は HT1080SC に比べ AQP1 の発現亢進に加え、matrigel invasion assay による浸潤能の有意な亢進を認めた。C) T1080M 細胞の AQP1 遺伝子発現を 3 種類の siRNA により抑制することにより、偽細胞突起の形成と浸潤能の低下が matrigel invasion assay により示された。

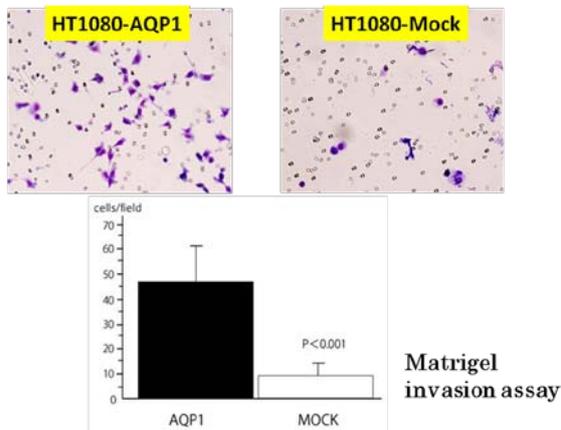


図 5. AQP1 遺伝子導入による HT1080 細胞の浸潤能の亢進

以上の結果から、AQP1 遺伝子の過剰発現は、腫瘍細胞の形態変化、特に偽細胞突起 (pseudopodia, lamellipodia) 形成の促進を介し、腫瘍細胞の細胞移動能ならびに浸潤能の亢進に関与することが明らかになった。

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 2 件)

- ① Yuichiro Machida, Miyako Shimasaki, et al. Relationship of aquaporin 1, 3 and 5 expression in lung cancer cells to cellular differentiation, invasive growth and metastasis potential, Hum Pathol, 査読有, 42: 669-678, 2011

- ② Yoshimichi Ueda, Miyako Shimasaki, et al. Aquaporin as a novel player in cancer cell invasion, Kanazawa Med J, 査読有, 35 巻, 2010, 61-67

[学会発表] (計 1 件)

- ① 第 99 回日本病理学会、東京都新宿区京王プラザホテル、2010. 4. 27

肺微小乳頭 micropapillaryadenocarcinoma の侵襲性に関わる遺伝子群の検索
島崎 都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島崎 都 (SHIMASAKI MIYAKO)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：00440511