

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590309

研究課題名（和文） 極性形成分子Par/Lgl/Scribの肺癌における異常と浸潤・転移との関係

研究課題名（英文） Alteration of apical-basal polarity regulating proteins Par/Lgl/Scrib in lung adenocarcinomas and its relationship with invasion and metastasis

研究代表者

明石 巧（AKASHI TAKUMI）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60242202

研究成果の概要（和文）：上皮細胞には内腔に面する頭頂部と間質に面する基底部の極性形成が見られる。癌化に伴う細胞極性の変化を肺腺癌における浸潤突起分子の細胞内局在を指標として検索した結果、浸潤性肺腺癌において浸潤突起分子が頭頂部から基底部に変位する極性異常が認められ、浸潤・転移・予後の組織学的マーカーとなる可能性が示唆された。極性形成分子Par6に結合性を持つRhoGEF/Ect2の過剰発現と浸潤突起分子の極性異常との間に相関傾向を認め、Ect2が極性異常に関与する因子の一つである可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Epithelial cells have an apical surface facing a lumen and a basal surface facing extracellular matrix. Abnormality of apical-basal polarity in neoplastic change was examined in the aspect of localization of invadopodia proteins in lung adenocarcinomas. Actinin-1 and cortactin showed matrix-contact-side localization in adenocarcinoma cells, but rarely in normal bronchiolar epithelial cells, alveolar cells, or precursor neoplastic lesions. Matrix-contact-side localization of invadopodia-related proteins could be histological markers indicative for invasion, metastasis, and poor prognosis. Rho guanine exchange factor/Ect2, one of Par6-binding proteins, was a possible regulator of polarity abnormality in lung adenocarcinomas.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：肺癌、極性、浸潤突起

1. 研究開始当初の背景

粘膜内に発生した癌細胞が周囲組織に浸潤する過程の中で、粘膜を裏打ちする基底膜の破壊/消失は初期の重要な過程となる。肺腺癌でも浸潤部位で基底膜は高率に断裂/消失し、転移、予後、腫瘍間質の形成と密接に相

関する（申請者：Jpn J Cancer Res 2001, 92:293-301. Pathobiology 2005, 72:250-9）。癌における基底膜の破壊・消失にはラミニンに代表される基底膜構成分子の発現、メタロプロテアーゼによる分解、接着分子など多数の因子が関与する（申請者：J Pathol 1999,

187: 223-8)。また培養癌細胞では複数のアクチン結合分子が膜型メタロプロテアーゼとともに浸潤突起を細胞外基質接着面（細胞腹側/基底面）に形成し、細胞外基質の分解に重要な役割を持つことが明らかになった。しかし、実際の腫瘍組織における浸潤突起の意義については知見が限られていた。我々は肺腺癌組織における浸潤突起構成分子の発現を検索した結果、癌細胞において頭頂部から間質に面する基底面へ局在が変化する極性異常があることがわかってきた。そこで浸潤突起分子を指標とした極性異常の意義と機序を肺腺癌を対象として検索を行った。

2. 研究の目的

1) 浸潤突起分子 (actinin-1, cortactin) の細胞内局在の変化を指標として肺腺癌の頭頂部/基底部の極性変化とその臨床病理学的な意義を明らかにした。

2) Par/PKCI 複合体, Scrib/Lgl 複合体、Crb/PALS/PATJ 複合体は G 蛋白質 Cdc4, Rac1 とともに微小管の配向、tight junction 形成の制御を介して上皮細胞の極性形成に参与する。これらの極性形成分子、G 蛋白質の活性を制御する RhoGEF の肺腺癌における異常を検索し、極性の変化との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 肺腺癌外科的切除材料 90 例を持ちいて浸潤突起分子 (actinin-1, cortactin) の細胞内局在を指標として、肺腺癌細胞の極性を免疫組織学的、電子顕微鏡的に検索し、転移、脈管侵襲、予後との相関性から臨床病理学的意義を明らかにした。

2) 肺腺癌の極性異常に関与する分子の検索
① 極性形成分子 Par, Scrib/Lgl, RhoGEF の肺腺癌における発現の変化を database (Shedden K, et al, Nat Med 2008; 14: 822-7) 上で検索し、肺腺癌細胞の極性異常に関与している可能性のある分子を抽出し、肺腺癌組織における発現の変化を RT-PCR 法、免疫組織学的方法により検索した。

② フォスファチジルイノシトール PIPs は Par/Cdc42 の局在を介して細胞極性を制御している。PIP3 をリン酸化する PI3K を活性化する EGFR 遺伝子の Exon19, 21 の変異を direct sequence 法で検索し肺腺癌細胞の極性異常との関係を検索した。

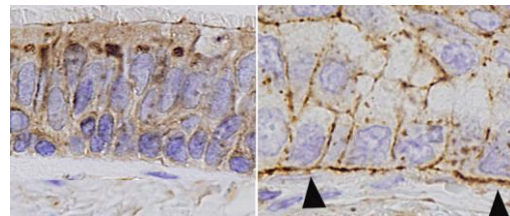
③ 極性形成分子 Par, Scrib/Lgl, RhoGEF の遺伝子の肺腺癌における突然変異を database (Imielinski M, Cell 150, 1107-1120, 2012) 上で検索し、極性異常に関与している可能性のある分子を抽出した。

4. 研究成果

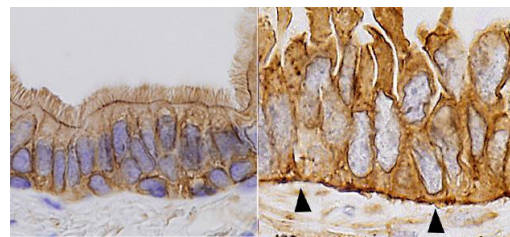
1) 肺腺癌における浸潤突起分子を指標とし

た頭頂部/基底部の極性異常の臨床病理学的な検索

①正常気管支上皮、肺胞上皮、非浸潤性細気管支肺胞上皮型腺癌では浸潤突起分子 actinin-1/cortactin は頭頂部に認められたが、浸潤性肺腺癌では細胞基底面/間質面に認められた。

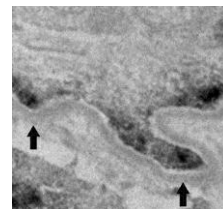


actinin-1 の発現 気管支上皮(左)では内腔面に局在するが、腺癌(右)では基底面に局在が認められる。



cortactin の発現 気管支上皮(左)では内腔面に局在するが、腺癌(右)では基底面に局在が認められる。

②免疫電顕では浸潤突起分子 actinin-1 は細胞基底部の細胞質突起 (矢印) に陽性となった。

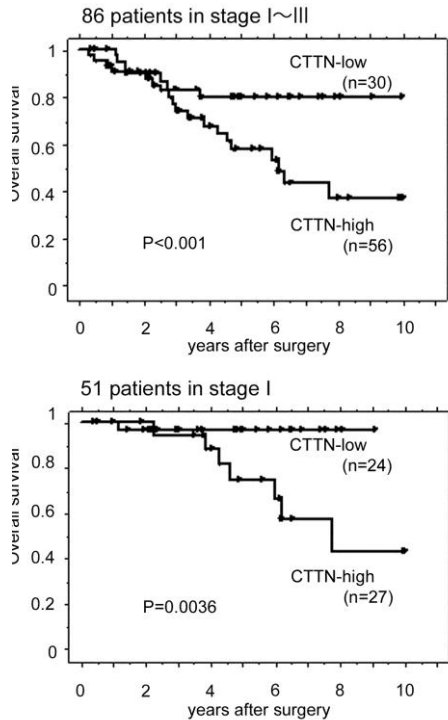


③浸潤突起分子を指標とした頭頂部/基底部の極性異常は病期、リンパ節転移、脈管侵襲、基底膜ラミニンの消失と有意な相関を示した。

	Cortactin 基底面局在		
	low	high	p
病期			
I	33	21	
II	4	12	0.024
III	8	12	
リンパ節転移			
N0	35	22	
N1	5	12	0.017
N2,N3	5	11	
リンパ管侵襲			
-	32	11	<0.001

+	13	34	
静脈侵襲			
-	35	12	<0.001
+	10	33	
基底膜消失			
low	18	0	<0.001
high	27	45	

④ 浸潤突起分子 cortactin を指標とした頭頂部 / 基底部の極性異常は stage I, stage I-III いずれにおいても予後と有意な相関を示した。



2) 肺腺癌の極性異常に関与する分子の検索

① 極性形成分子 Par, Scrib/Lgl, Crb の肺腺癌における発現変化の data base 検索

Par, Scrib/Lgl 複合体を形成する分子には肺腺癌培養細胞、進行肺腺癌組織において共通した発現の変化は認められなかった。

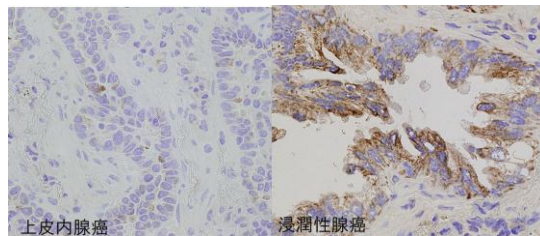
遺伝子名	肺腺癌細胞株/末梢気道上皮細胞発現比	
	末梢気道上皮細胞発現比	I/III 期死亡例/I 期生存例発現比
PAR3	5.8	0.8
PAR6B	0.95	0.72
PRKCI	4	0.67
PRKCZ	0.72	1.2
SCRIB	1.2	0.98
LLGL1	3.6	0.76
LLGL2	6	0.77
Ect2	8.1	1.25
NET1	0.52	1.1

Vav1 2.8 1.1

② RhoGEF は G 蛋白質 Cdc4, Rac1 の活性制御を介して上皮細胞の極性形成に関与している可能性がある。data base 検索により RhoGEF の肺腺癌組織における発現異常を検索した結果、PAR6 結合性 RhoGEF である Ect2 が肺腺癌培養細胞、進行肺腺癌組織においていずれも過剰発現していた。実際の肺腺癌組織 24 例においても RT-PCR 法で発現の増加傾向を認めた。30 例の凍結肺腺癌組織における Ect2 の発現を免疫組織学的に検索した結果、Ect2 の過剰発現と actinin-1 の局在との間に相関傾向があることがわかった。

RT-PCR 法による Ect2 の発現解析

腺癌組織/ 正常組織比	p value ^a
1.3	0.20



肺腺癌における Ect2 の発現 浸潤性腺癌において強い発現が見られる。

Ect2 の 発現	Actinin-1 の基底局在		
	low	high	p
low	13	3	0.052
high	5	6	

③ EGFR 遺伝子 Exon19, 21 の変異と浸潤突起分子の細胞内局在には有意な相関は見られなかった。

EGFR mutation	Actinin-1 の基底局在		
	low	high	p
-	16	24	0.45
+	7	16	

④ 極性分子の肺腺癌における遺伝子変異の data base 解析では極性形成を正に制御する STK11 に過去に報告されている高い頻度の機能喪失型の点突然変異が認められた。PAR3, CRB1 にも比較的高い頻度でアミノ酸置換型点突然変異が認められた。一方、PAR6, SCRIB/LGL の変異の頻度は低く、極性異常への関与の可能性は低いと考えられた。

遺伝子名	変異例 (n=183)	non- silent	non- sense
PAR3	10	9	0

PAR6A	0	0	0
PAR6B	0	0	0
PAR6G	2	2	0
STK11	28	27	12
PRKCI	2	1	0
PRKCZ	1	1	0
CRB1	18	16	1
CRB2	9	8	0
CRB3	0	0	0
PALS	1	1	0
PATJ	0	0	0
SCRIB	4	2	0
LLGL1	2	1	0
LLGL2	7	4	0

(3)まとめと今後の展望

細胞外基質の分解に関与する浸潤突起の臨床病理学的意義に関するこれまでの知見は限られていた。今回の研究によって浸潤突起を形成する分子 actinin-1, cortactin が肺腺癌細胞において頭頂部から間質に面する基底面へ局在が変位する極性異常があること、浸潤・転移と有意な相関を示すことが明らかとなり、実際の腫瘍においても浸潤突起が浸潤や転移に重要な役割を持つことが示唆された。浸潤突起分子の局在変化が予後の組織学的な診断マーカーとなり得る可能性も示された。

上皮細胞の極性形成に関与する Par3, Par6, Scrib, Lgl の肺腺癌における発現の変化には一定の傾向は認められなかった。しかし Par6 に結合する RhoGEF/Ect2 の過剰発現が極性異常に関与する因子の一つである可能性が得られた。Ect2 が尿細管上皮細胞に極性異常をきたす実験的報告 (Liu 2006) があり、肺腺癌細胞の極性異常との関係について実験的検討を現在行っている。

一方、極性分子には比較的高い頻度で突然変異が認められることがデータベース検索から明らかとなった。過去に報告のある STK11 に加えて Par3 や Crb1 にも異常が認められ、これらの異常が浸潤突起分子の細胞内局在の変化、細胞外基質の改変、浸潤へとつながっている可能性があり、検討を行ってみたい。

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 1 件)

- ① S. Hirooka, T. Akashi, et al. Localization of the Invadopodia-Related Proteins Actinin-1 and Cortactin to Matrix-Contact-Side Cytoplasm of Cancer Cells in Surgically Resected Lung Adenocarcinomas', Pathobiology, 査読

あり。78 (2011), 10-23.

DOI: 10.1159/000322734

[学会発表] (計 2 件)

- ① 肺腺癌における浸潤突起構成分子の細胞内局在を制御する因子の検討(会議録)
廣岡信一, 明石巧, 日本病理学会総会、2011,4, 横浜市
- ② 肺腺癌におけるアクチン調節蛋白の発現異常: 廣岡信一, 明石巧, 日本病理学会総会 2010, 4, 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

明石 巧 (AKASHI TAKUMI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 60242202

(2)研究分担者

藤原 直之 (FUJIWARA NAOUYUKI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教・
研究者番号: 80451912