

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 15日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591571

研究課題名（和文） 非小細胞肺癌における EMT 関連遺伝子の同定・解析と腫瘍制御への新しい展開

研究課題名（英文） Analysis of Epithelial-mesenchymal transition mechanism in Non-small cell lung cancer

研究代表者

庄司 文裕（SHOUJI FUMIHIRO）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：90444851

研究成果の概要（和文）：

肺扁平上皮癌において、Twist は病理学的 T 因子と正の相関を認め、胸膜浸潤例に有意に高い発現を示した。さらに、Activin, Podoplanin, PAI-1 の各間葉系マーカーは病理学的 T 因子と正の相関を認めた。Activin, PAI-1 は胸膜浸潤例に有意に高い発現を示した。N-cadherin は腫瘍内リンパ管浸潤例に有意に高い発現を示した。

研究成果の概要（英文）：

Twist was significantly correlated with both pathological T factor and pleural invasion in squamous cell lung carcinoma. Moreover mesenchymal markers such as activin, podoplanin and PAI-1 were significantly associated with pathological T factor. Especially, both activin and PAI-1 were related with pleural invasion. N-cadherin was significantly correlated with intratumoral lymphatic invasion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：呼吸器外科学

1. 研究開始当初の背景

原発性肺癌は世界の癌死亡原因の1位であり、本邦においても最も多い癌死の原因疾患（男性 30,398 人、女性 11,129 人：1998 年）である。また、今後もその比率は上昇し、10 年後においては約 2 倍（10 万人/年）になると考えられている。なかでも 80-85%

を占める非小細胞肺癌に対する治療成績の向上は急務と考えられる。治癒切除の対象となる I-III A 期非小細胞肺癌に対する第一選択は手術であるが、手術療法にて完全切除が期待できるのは約 30%、完全切除された症例でも 5 年生存率は 50% 程度と決して満足できるものではない。また、肺癌患者

の 3/4 は診断時に進行癌として発見され、化学療法や放射線療法にて治療されるものの、その平均生存期間は約 7-11 ヶ月と不良であり、新しい治療法や予防法の開発が急務である。近年、癌細胞の転移のメカニズムの一つとして Epithelial-Mesenchymal Transition(EMT; 上皮間葉転換)が注目されている。EMT とは 1980 年代初めに Elizabeth Hay らが提唱した、上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象であり [J Cell Biol 1982]、EMT 機構の獲得が運動性の亢進や細胞外基質の蓄積をもたらすことから、癌細胞の浸潤や線維症との関連も示唆されている [Cancer 2002, Nat Rev Cancer 2002, Curr Opin Cell Biol. 2005]。我々はこれまでに喫煙関連物質である benzo(a)pyrene の長期暴露が肺癌細胞株 A549 に及ぼす影響を検証し、EMT 機構が活性化していることを報告した [Cancer. 2007]。表 1 に示すように、上皮系マーカーとしては EGFR 活性化増殖因子として epiregulin, EGFR, amphiregulin, c-met、接着因子としては alpha-catenin, beta-catenin, N-cadherin, E-cadherin, proto-cadherin、その他、syndecan-1, Zo-1 等が、一方、間葉系マーカーとしてはトランスフォーミング増殖因子である TGF-beta1 および 2、線維芽細胞増殖因子である basic-FGF, basic-FGFR、その他にも migration stimulating factor (MSF), plasminogen activator inhibitor (PAI), fibronectin precursor, tropomyosin 1a chain, tubulin b, Ets, thrombospondine, myosin heavy chain, integrin b5, vimentin, desmoyokin, MMP-9 等の推移が観察された。しかし、生体内での肺癌の浸潤・転移における EMT の意義に関しては十分に解明されていない。よってこれらの因子解析は非小細胞肺癌の転移・浸潤メカニズムの解明に極めて重要である。

EMT 機構の hallmark の一つとして E-cadherin の機能不全があげられる。E-cadherin は上皮細胞間接着に寄与している代表的な接着分子であり、EMT 獲得と E-cadherin 発現が逆相関することから、EMT の代表的な指標の 1 つと言われている [Nat Rev Cancer 2007]。細胞間の極性の喪失や細胞構築の破綻によって、癌細胞の浸潤・転移能が獲得されるとされている。これまでに種々の癌において E-cadherin 発現の減弱と腫瘍の悪性度が相関することが報告されており、EMT は腫瘍の浸潤・転移能の獲得に重要な役割を果たすと考えられている。近年 E-cadherin 発現を抑制的に調節する分子として Snail、Sip1、Twist、E2A(E47/E12) などの転写因子が発見され、これらの分子は E-cadherin 発現を抑制する強力な EMT 誘導因子であることが分かっている [Cancer Res 2006]。図 1 は各 E-cadherin 転写抑制因子と E-cadherin の promotor 領域である E-box との関係を示している。E12 および Twist は E-box1 に、Sip-1 および EF1 は E-box2 に、Slug および snail は E-box3 にそれぞれ作用し E-cadherin 転写を抑制するとされている。また、図 2 は E-cadherin 転写抑制因子と EMT 機構を示している。NF-kB、FGF、TGF-beta からこれら転写抑制因子へ signal が伝わり、E-cadherin を中心とする上皮系マーカーの発現が抑制されるとともに、vimentin, fibronectin, N-cadherin を中心とする間葉系マーカーの発現が活性・増強する。E-cadherin 転写抑制因子と癌の進展及び転移との関連性を示唆する報告が多くなされてきている。特に転写抑制因子の 1 つである Twist は 1987 年に発見された遺伝子であり [Nucleic Acids Res 1987, Eur Mol. Biol. Org. J 1988]、これまでに乳癌、胃癌、肝細

胞癌、膵癌、咽頭癌、子宮癌の悪性度（浸潤・転移能）との関連性が報告されている [Human Pathol 2006, Clin Cancer Res 2006, Cancer Letter 2006 Histopathology 2007, Int J Cancer 2007]。しかしながら、非小細胞肺癌に関する検討はなされていない。

2. 研究の目的

非小細胞肺癌における EMT 関連遺伝子の発現・機能を網羅的に解析することによりその転移・浸潤のメカニズムを解明し、Key となる遺伝子を同定し、新規治療のターゲットとなりうるかについて検討する。

3. 研究の方法

- ① 非小細胞肺癌における EMT 関連遺伝子（上皮系及び間葉系マーカー）の蛋白発現解析
- ② 非小細胞肺癌における EMT 関連遺伝子（上皮系及び間葉系マーカー）の mRNA 発現解析
- ③ 非小細胞肺癌における E-cadherin 転写抑制遺伝子（Twist, Snail, Sip1, Slug）の蛋白発現解析
- ④ 非小細胞肺癌における E-cadherin 転写抑制遺伝子（Twist, Snail, Sip1, Slug）の mRNA 発現解析
- ⑤ 非小細胞肺癌株を用いた siRNA による転写抑制遺伝子制御実験
- ⑥ 動物実験モデルによる腫瘍制御実験

4. 研究成果

各病理因子と E-cadherin/Sip-1 は以下に示す通りであるが、E-cadherin 発現は病期の進行に従って低値を示す傾向が認められ

Parameters	N	E-cadherin	Sip-1	Twist	Snail
病理学的 T 因子 T1-2/T3-4	50/18	4.1/4.0	1.0/1.1	1.2/2.5	2.2/2.9
病理学的 N 因子 N0/N1-3	46/18	3.9/5.0	1.1/0.8	1.9/0.6	2.6/1.9
胸膜浸潤 なし/あり	37/29	4.3/3.8	1.2/0.9	1.1/2.0	2.0/2.9
腫瘍内リンパ管浸潤 なし/あり	42/9	3.3/3.5	0.9/0.8	1.7/0.8	2.7/2.4
腫瘍内血管浸潤 なし/あり	29/22	3.2/3.7	0.9/0.9	2.0/1.0	2.2/3.1
分化度 高分化/その他	5/60	3.3/3.5	0.9/0.8	1.7/0.8	2.7/2.4

p<0.05

たが、Sip-1 発現はいずれの因子とも相関関係を認めなかった。従って、他の E-cadherin 転写抑制遺伝子（Twist, Snail）の解析を行った。

【まとめ】

肺扁平上皮癌において、Twist は病理学的 T 因子と正の相関を認め、胸膜浸潤例に有意に高い発現を示した。

次に、他の EMT 関連遺伝子（N-cadherin, Vimentin, PAI-1, Podoplanin, Activin 等）を解析した。

その結果、Activin, Podoplanin, PAI-1 の mRNA 発現と病理学的 T 因子との間にそれぞれ相関を認めた（Activin: T1-2 vs. T3-4= 11.49 ± 1.82 vs. 21.09 ± 5.54, p< 0.05, Podoplanin: T1-2 vs. T3-4= 3.91 ± 0.46 vs. 6.42 ± 1.34, p< 0.05, PAI-1: T1-2 vs. T3-4= 6.13 ± 0.81 vs. 11.56 ± 2.45, p< 0.05）。さらに Activin 及び PAI-1 の mRNA 発現と胸膜浸潤の有無にも相関を認めた（Activin: なし vs. あり= 9.87 ± 1.09 vs. 17.12 ± 3.68, p< 0.05, PAI-1: なし vs. あり= 5.83 ± 0.69 vs. 9.06 ± 1.66, p< 0.05）。

Parameters	N	ActivinβA	Podoplanin	PAI-1	N-cadherin	Vimentin
病理学的 T 因子 T1-2 T3-4	50 18	11.49 ± 1.82 21.09 ± 5.54	3.91 ± 0.46 6.42 ± 1.34	6.13 ± 0.81 11.56 ± 2.45	0.13 ± 0.03 0.28 ± 0.14	1.01 ± 0.08 1.33 ± 0.29
病理学的 N 因子 N0 N1-2	48 18	15.32 ± 2.39 12.15 ± 4.62	5.04 ± 0.63 3.63 ± 0.99	8.25 ± 1.12 6.60 ± 1.90	0.16 ± 0.03 0.20 ± 0.14	1.21 ± 0.14 0.80 ± 0.08
胸膜浸潤 なし あり	37 29	9.87 ± 1.09 17.12 ± 3.68	4.00 ± 0.42 4.86 ± 0.92	5.83 ± 0.69 9.06 ± 1.66	0.16 ± 0.04 0.19 ± 0.09	1.12 ± 0.10 1.10 ± 0.19
腫瘍内リンパ管浸潤 なし あり	42 9	9.98 ± 1.24 10.00 ± 2.31	3.37 ± 0.32 2.37 ± 0.56	5.79 ± 0.62 3.87 ± 0.7	0.08 ± 0.02 0.39 ± 0.27	0.94 ± 0.06 0.74 ± 0.10
腫瘍内血管浸潤 なし あり	29 22	9.57 ± 1.46 10.54 ± 1.66	3.10 ± 0.33 3.31 ± 0.51	5.30 ± 0.70 5.65 ± 0.86	0.11 ± 0.02 0.17 ± 0.11	0.93 ± 0.06 0.87 ± 0.09
分化度 高分化 その他	6 60	8.92 ± 2.53 14.15 ± 2.20	6.87 ± 3.93 4.39 ± 0.46	6.86 ± 3.81 7.21 ± 0.90	11.48 ± 1.82 11.48 ± 1.82	0.12 ± 0.04 0.16 ± 0.05

p<0.05

【まとめ】

肺扁平上皮癌において、

- ① Activin, Podoplanin, PAI-1 の各間葉系マーカーは病理学的 T 因子と正の相関を認めた。
- ② Activin, PAI-1 は胸膜浸潤例に有意に高い発現を示した。
- ③ N-cadherin は腫瘍内リンパ管浸潤例に有意に高い発現を示した。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庄司 文裕 (Shoji Fumihiko)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：90444851

(2) 研究分担者

前原 喜彦 (Maehara Yoshihiko)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：80165662

岡本 龍郎

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80568626

竹ノ山 光広 (Takenoyama Mitsuhiro)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：10309966