

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590452

研究課題名(和文) S100A4の制御による膵癌、肺癌の浸潤、転移の抑制法の開発

研究課題名(英文) Development of invasion and/or metastasis of pancreatic and lung cancers by controlling S100A4

研究代表者

堀井 明 (HORII, Akira)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40249983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：S100A4の高発現は膵癌、肺癌で共通に見られ、発現抑制により増殖が抑制され、強制発現により運動能が亢進することを明らかにした。膵癌では発現が神経浸潤と有意に相関を示すことも示した。さらに低発現癌細胞で強制発現することにより発現が変化する遺伝子も特定し、機能解析を進めている。

膵癌ではS100A4の高発現とGEM治療による予後低下が報告されていたため、膵癌、胃癌、大腸癌、胆嚢癌、胆管癌の合計8細胞株においてGEM耐性株を樹立し、分子機構を調べた結果、Deoxycytidine kinaseの不活性化が極めて高頻度に見られることを見出した。さらに検討を加えている。

研究成果の概要(英文)：Overexpression of S100A4 is frequently found in pancreatic and lung cancers. Knock down suppresses cell growth and forced expression promotes cell motility in both of the cancer types. Furthermore, we analyzed primary resected pancreatic cancer tissues immunohistochemically and found positive association between overexpression of S100A4 and tumor cell invasion, particularly to nerves. Microarray analyses after forced expression in S100A4-low expressing cells identified candidate downstream genes and we are now analyzing functions of these genes.

Because overexpression of S100A4 and poor prognoses after gemcitabine treatment was reported in pancreatic cancer, we established 8 cancer cell lines with acquired gemcitabine resistance; these include four pancreatic, one gastric, one colon, one gallbladder, one bile duct cancers. Frequent inactivating mutation in deoxycytidine kinase was observed, and further investigation is on the way.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：S100A4 膵癌 肺癌 神経浸潤 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

がん患者の診療において、がんそのものの増殖能に加え、浸潤や転移のコントロールは極めて重要な意味を持つ。我々は、*S100A4* 遺伝子の発現が膵癌細胞の増殖を促進させ、ノックダウンすることで増殖抑制、アポトーシス誘導、浸潤能の抑制などの効果を示すことを検出した。*S100* タンパクはファミリーを形成し、ファミリーのメンバーは EF-hand モチーフを持つ Ca 結合タンパクで、種々のがんにおいて高発現が報告され、浸潤や転移との関連も報告され、p53 の C 末に結合して機能を抑制することも報告されている。そこで、*S100* ファミリーの中の一つである *S100A4* に注目し、研究計画をたてた。膵癌においてこの遺伝子の高発現が報告され、その原因の主なものはイントロン 1 の CpG 配列の低メチル化であるとされていた。*S100A4* 遺伝子はがんの発生、進展に深く関わっていることは間違いないと考えられた。

2. 研究の目的

本研究で、*S100A4* 遺伝子が膵癌や肺癌で高頻度に高発現し、増殖や浸潤・転移にかかわっている可能性を評価し、遺伝子の制御によりがんの進展を制御する方策を考案することを目的とした特定した。

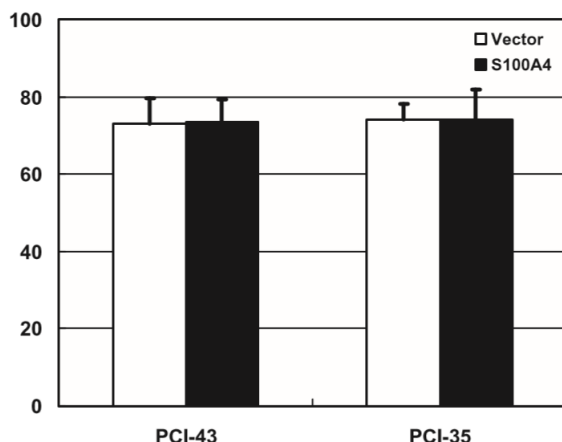
3. 研究の方法

膵癌、肺癌において、*S100A4* の発現を mRNA、タンパクの両方で検討し、さらに臨床検体を用いてがんの進展や予後などとの関連性について検討する。また、遺伝子ノックダウンや発現ベクターによる強制発現を行うことによりどのような変化をきたすかの検討を加える。さらに、背景となる分子機構について検討を加える。

4. 研究成果

臨床検体 83 例の免疫染色により、*S100A4* が高発現する場合、浸潤性増殖、特に、神経浸潤が有意に亢進することを示した。

図 1



膵癌において低発現細胞株に *S100A4* を強

制発現させ、細胞数をカウントすることにより細胞増殖能を判定すると、図 1 に示したように増殖能の変化は見られなかった。加えて、Boyden Chamber によるアッセイでは浸潤能でも変化が見られなかったが、スクラッチアッセイを行うと、図 2 に示したように浸潤に密接にかかわる細胞の運動能が亢進した。

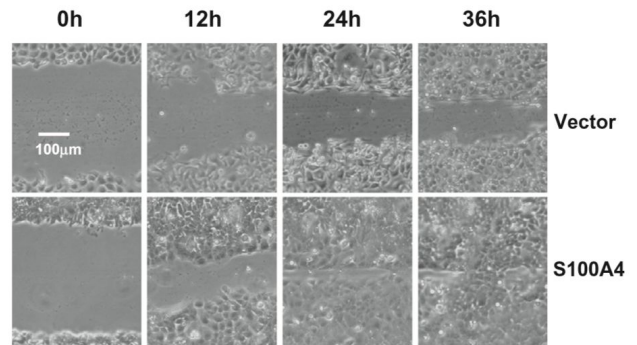
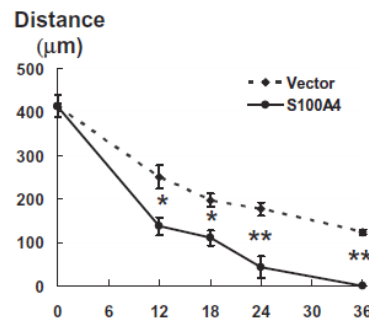


図 2

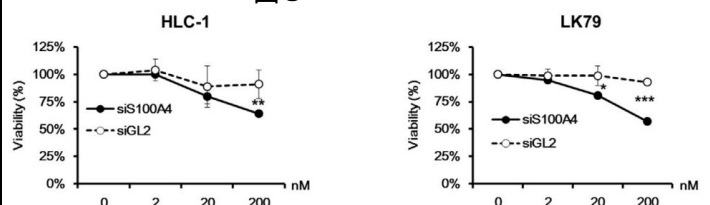
PCI-43



引き続きマイクロアレイ解析で遺伝子導入後に発現が変化する遺伝子を 4 種類まで絞り込み、これらを候補遺伝子として、さらなる検討を加えている。

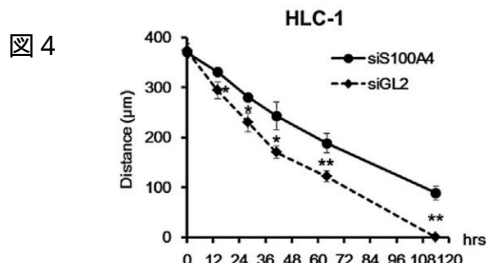
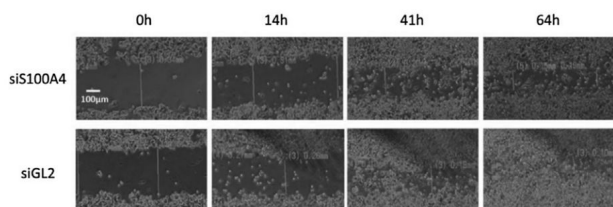
肺癌においても検討を加えてみた。腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、小細胞癌のいずれにおいても mRNA ならびにタンパクレベルの双方で高頻度に高発現がみられた。細胞株でノックダウンを行ってみると、高発現細胞でのみ増殖抑制を示す結果が得られ (図 3)、*S100A4* は膵癌のみならず肺癌においても発がん、進展過程で重要な役割を果たす可能性、ならびに分子標的となりうる可能性があると考えられた。

図 3



肺癌のうち、腺癌と小細胞癌に由来する細胞株を用い、*S100A4* 遺伝子を強制発現させると、膵癌同様に細胞増殖には影響を及ぼさなかったが、スクラッチアッセイにより、低発現細胞株においてのみ、細胞の運動能の

亢進が見られた (図4)。



本研究の結果から、*S100A4* 遺伝子の高発現は、少なくとも膵癌と肺癌において、癌の発生・進展に重要な役割を果たしていること、特に、浸潤・転移に密接に関わっていることが強く示唆され、この遺伝子機能の制御により浸潤・転移を抑制できる可能性が示された。

#### 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 19 件)

Cucu D, Chiritoiu G, Petrescu S, Babes A, Stanica L, Duda DG, Horii A, Dima SO, Popescu I. Characterization of functional transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells. 査読有、Pancreas in press 2014. doi: 10.1097/MPA.000000000000106

Chen N, Sato D, Saiki Y, Sunamura M, Fukushima S, Horii A. *S100A4* is frequently overexpressed in lung cancer cells and promotes cell growth and cell motility. 査読有、Biochem Biophys Res Commun 447, 459-464, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.025

Nakahata S, Ichikawa T, Maneesay P, Saito Y, Nagai K, Tamura T, Manachai N, Yamakawa N, Hamasaki M, Kitabayashi I, Arai Y, Kanai Y, Taki T, Abe T, Kiyonari H, Shimoda K, Ohshima K, Horii A, Shima H, Taniwaki M, Yamaguchi R, Morishita K. Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers. 査読有、Nat Commun 5, 3393, 2014. doi: 10.1038/ncomms4393.

Saiki Y, Horii A. Molecular pathology of pancreatic cancer. Pathol Int 64, 10-19, 2014. doi: 10.1111/pin.12114

Fukushima S, Horii A. Road to early detection

of pancreatic cancer: attempts to utilize epigenetic biomarkers. 査読有、Cancer Lett 342, 231-237, 2014. doi:

10.1016/j.canlet.2012.03.022

Yamamura A, Miura K, Karasawa H, Morishita K, Abe K, Mizuguchi Y, Saiki Y, Fukushima S, Kaneko N, Sase T, Nagase H, Sunamura M, Motoi F, Egawa S, Shibata C, Unno M, Sasaki I, Horii A. Suppressed expression of NDRG2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. 査読有、Biochem Biophys Res Commun 441, 102-107, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.010

Notsuda H, Sakurada A, Endo C, Okada Y, Horii A, Shima H, Kondo T. p190A RhoGAP is involved in EGFR pathways and promotes proliferation, invasion and migration in lung adenocarcinoma cells. 査読有、Int J Oncol 43, 1569-1577, 2013. doi: 10.3892/ijo.2013.2096

Fukushima S, Horii A. DNA methylation in cancer: A gene silencing mechanism and the clinical potential of its biomarkers. 査読無、Tohoku J Exp Med 229, 173-185, 2013 doi: 10.1620/tjem.229.173

Tsukamoto N, Egawa S, Akada M, Abe K, Saiki Y, Kaneko N, Yokoyama S, Shima K, Yamamura A, Motoi F, Abe H, Hayashi H, Ishida K, Moriya T, Tabata T, Kondo E, Kanai N, Gu Z, Sunamura M, Unno M, Horii A. The expression of *S100A4* in human pancreatic cancer is associated with invasion. 査読有、Pancreas 42, 1027-1033, 2013. doi: 10.1097/MPA.0b013e31828804e7.

Kinoshita H, Imoto S, Suda Y, Ishida M, Watanabe M, Kawai Y, Kitazawa H, Miura K, Horii A, Saito T. Proposal of screening method for intestinal mucus adhesive lactobacilli using the enzymatic activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). 査読有、Anim Sci J 84, 150-158, 2013. doi: 10.1111/j.1740-0929.2012.01054.x.

Huang I-N, Okawara, T, Watanabe M, Kawai Y, Kitazawa H, Ohnuma S, Shibata C, Horii A, Kimura K, Taketomo N, Xiao J, Iwatsuki K, Saito T. New screening methods for probiotics with adhesion properties to sialic acid and sulfate residues in human colonic mucin using the Biacore assay. 査読有、J Appl Microbiol 114, 854-860, 2013. doi: 10.1111/jam.12063

Sekine H, Chen N, Sato K, Saiki Y, Yoshino Y, Umetsu Y, Jin G, Nagase H, Gu Z, Fukushima S, Sunamura M, Horii A. *S100A4*, frequently overexpressed in various human cancers, accelerates cell motility in pancreatic cancer cells. 査読有、Biochem Biophys Res Commun 429, 214-219, 2012, doi:

10.1016/j.bbrc.2012.10.048

Watanabe M, Kinoshita H, Huang IN,

Eguchi K, Tsurumi T, Kawai Y, Kitazawa H, Kimura K, Taketomo N, Kikuchi D, Sase T, Miura K, Ogawa H, Shibata C, Horii A, Saito T. An adhesin-like protein, Lam29, from *Lactobacillus mucosae* ME-340 binds to histone H3 and blood group antigens in human colonic mucus. 査読有、*Biosci Biotechnol Biochem*. 76, 1655-1660, 2012, doi: 10.1271/bbb.120150

Shima K, Mizuma M, Hayashi H, Nakagawa K, Okada T, Sakata N, Omura N, Kitamura Y, Motoi F, Rikiyama T, Katayose Y, Egawa S, Ishii N, Horii A, Unno M. Potential utility of eGFP-expressing NOG mice (NOG-EGFP) as a high purity cancer sampling system. 査読有、*J Exp Clin Cancer Res* 31, 55, 2012, doi: 10.1186/1756-9966-31-55

Ogawa T, Saiki Y, Shiga K, Chen N, Fukushima S, Sunamura M, Nagase H, Hashimoto S, Matsuura K, Saijo S, Kobayashi T, Horii A. miR-34a is downregulated in *cis*-diamminedichloroplatinum treated sinonasal squamous cell carcinoma patients with poor prognosis. 査読有、*Cancer Sci* 103, 1737-1743, 2012, doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02338.x

Saiki Y, Yoshino Y, Fujimura H, Manabe T, Kudo Y, Shimada M, Mano N, Nakano T, Lee Y, Shimizu S, Oba S, Fujiwara S, Shimizu H, Chen N, Nezhad ZK, Jin G, Fukushima S, Sunamura M, Ishida M, Motoi F, Egawa S, Unno M, Horii A. *DCK* is frequently inactivated in acquired gemcitabine-resistant human cancer cells. 査読有、*Biochem Biophys Res Commun* 421, 98-104, 2012, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.122

Ogawa T, Liggett TE, Melnikov AA, Monitto CL, Kusuke D, Shiga K, Kobayashi T, Horii A, Chattejee A, Levenson VV, Koch W, Sidransky D, Chang X. Methylation of death-associated protein kinase (DAPK) is associated with cetuximab and erlotinib resistance. 査読有、*Cell Cycle* 11, 1655-1662, 2012, doi: 10.4161/cc.20120

Saiki Y, Ogawa T, Shiga K, Sunamura M, Kobayashi T, Horii A. A human head and neck squamous cell carcinoma cell line with acquired *cis*-diamminedichloroplatinum-resistance shows remarkable upregulation of BRCA1 and hypersensitivity to taxane. 査読有、*Int J Otolaryngol* 2011, 521852, 2011, doi: 10.1155/2011/521852

Shimizu H, Horii A, Sunamura M, Motoi F, Egawa S, Unno M, Fukushima S. Identification of epigenetically silenced genes in human pancreatic cancer by a novel method "microarray coupled with methyl-CpG targeted transcriptional activation" (MeTA-array). 査読有、*Biochem Biophys Res Commun* 411,

162-167, 2011, doi:

10.1016/j.bbrc.2011.06.121

Sato Y, Horii A, Fukushima S. Microarray coupled with methyl-CpG targeted transcriptional activation (MeTA-array) identifies hypermethylated genes containing the stringent criteria of CpG islands at high frequency. 査読有、*Epigenetics* 6, 752-759, 2011, doi: 10.4161/epi.6.6.15906

〔学会発表〕(計 18 件)

Chen N, Saiki Y, Sekine H, Sunamura M, Fukushima S, Motoi F, Egawa S, Unno M, Horii A. *IFI27* and *NOV*, downstream regulated genes by S100A4, are playing important roles in pancreatic carcinogenesis. アメリカ癌学会 2014 年 4 月 5-9 日 アメリカ・サンディエゴ

Fukushima S, Mizuguchi Y, Horii A. TET oxidase activity accumulated on methyl-CpG sites extensively upregulates methylated genes through DNA demethylation. アメリカ癌学会 2014 年 4 月 5-9 日 アメリカ・サンディエゴ

Chen N, Saiki Y, Sunamura M, Fukushima S, Motoi F, Egawa S, Unno M, Horii A. *IFI27* and *NOV*, downstream regulated genes by S100A4, are playing important roles in pancreatic carcinogenesis. 日本癌学会 2013 年 10 月 3-5 日 横浜

Saiki Y, Ogawa T, Nakano T, Chen N, Sunamura M, Horii A. Chemosensitivity prediction by microRNA profiling in head and neck and esophageal squamous cell carcinoma. 日本癌学会 2013 年 10 月 3-5 日 横浜

Fukushima S, Mizuguchi Y, Horii A. TET1 hydroxylase activity reactivates the expression of epigenetically silenced genes. 日本癌学会 2013 年 10 月 3-5 日 横浜

齋木由利子、中野智太、小川武則、砂村眞琴、永瀬浩喜、堀井明 マイクロ RNA による抗がん剤感受性予測 日本癌病態治療研究会 2013 年 6 月 27-28 日 東京

Fukushima S, Horii A. MeTA-array, a useful method to identify genes transcriptionally silenced by tumor-specific hypermethylation in cancer. アメリカ癌学会 2013 年 4 月 6-10 日 アメリカ・ワシントン

Mizuguchi Y, Yamamura A, Miura K, Karasawa H, Morishita K, Abe K, Saiki Y, Fukushima S, Kaneko N, Sase T, Motoi F, Egawa S, Shibata C, Unno M, Sasaki I, Horii A. Suppressed NDRG2 expression correlates with poor prognosis in pancreatic cancer, and suppression mechanism is different from colorectal and gastric cancer. 日本癌学会-アメリカ癌学会

合同会議 2013年2月21-25日 アメリカ・マウイ島

齋木由利子、吉野優樹、福重真一、砂村真琴、石田昴玄、元井冬彦、江川新一、海野倫明、堀井明 ゲムシタピン耐性ヒト癌細胞株における deoxycytidine kinase の不活化 日本癌学会 2012年9月19-21日 札幌

福重真一、堀井明 ヒト癌において腫瘍特異的な高度メチル化により転写抑制された遺伝子の MeTA-array による効率的探索法の開発 日本癌学会 2012年9月19-21日 札幌

小川武則、齋木由利子、志賀清人、松浦一登、加藤健吾、西條茂、小林俊光、福重真一、堀井明 miR-34a 発現低下は鼻副鼻腔癌におけるシスプラチン化学療法の予後規定因子である 日本癌学会 2012年9月19-21日 札幌

Horii A. Road to early detection and curative treatment of pancreatic cancer. Academician Nicolae Cajal シンポジウム 2012年3月28-30日 ルーマニア・ブカレスト

齋木由利子、江川新一、砂村真琴、海野倫明、堀井明 ゲムシタピン耐性膀胱癌細胞株におけるゲムシタピン代謝の解析 日本癌学会 2011年10月3-5日 名古屋

福重真一、陳娜、堀井明 メチル CpG 配列を標的とする転写活性化とマイクロアレイの組み合わせはヒトがんにおける低メチル化遺伝子の同定を可能にする 日本癌学会 2011年10月3-5日 名古屋

嶋健太郎、水間正道、大村範幸、林洋毅、中川圭、岡田恭穂、北村洋、元井冬彦、力山敏樹、片寄友、江川新一、石井直人、堀井明、海野倫明 NOG-EGFP マウス異種移植モデルを用いた高精度な癌細胞 sampling system の構築を目指して 日本癌学会 2011年10月3-5日 名古屋

Saito T, Yukishita R, Watanabe M, Katazawa H, Kawai Y, Horii A., Ikezawa F, Yamamura A, Ogawa H, Miura K, Shibata C, Sasaki I. New prevention strategy for inflammatory bowel disease using probiotic lactic acid bacteria and/or

Bifidobacterium with specific adhesion to human intestine. Lactic Acid Bacteria シンポジウム 2011年8月28日-9月1日 ニュージーランド・エグモントアーンゼー

齋木由利子、江川新一、海野倫明、砂村真琴、堀井明膀胱癌の Gemcitabine 耐性機構の解明 日本膀胱学会 2011年7月29日-30日 弘前

Fukushige S, Horii A. Each methyl-CpG binding domain has the ability to target different methylated genes in human cancer. アメリカ癌学会 2011年4月2-6日 アメリカ・オーランド

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.med.tohoku.ac.jp/org/medical/13/index.html>  
<http://www.molpath.med.tohoku.ac.jp/index.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
堀井 明 (HORII, AKIRA)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：40249983

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：