

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790634

研究課題名(和文)悪性胸膜中皮腫における腸上皮細胞発現分子インテレクトイン-1の発現制御機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of gene expression regulation of intelectin-1 in malignant pleural mesothelioma

研究代表者

山下 真紀子(辻真紀子)(Yamashita, Makiko)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・客員研究員

研究者番号：60397776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、正常胸膜と正常胃では発現していないインテレクトイン-1が、悪性胸膜中皮腫(中皮腫)と腸上皮化生で発現することが明らかとなった。しかし、両病変にそれ以外のマーカー分子の発現の類似性は認められなかった。従って、中皮腫と腸上皮化生におけるインテレクトイン-1の発現は異なる遺伝子発現調節によって制御されていると考えられた。また、中皮腫におけるインテレクトイン-1のプロモーターはTATAボックスを含む-56～+6の領域、エンハンサーは+263～+293の領域と考えられ、転写因子としてOct・Sox転写因子群の関与が推定された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that intelectin-1 was expressed in malignant pleural mesothelioma (MPM) or intestinal metaplasia in stomach, but not in normal pleura and normal stomach. However, expression of other lesion markers was not similar. Therefore, intelectin-1 expression in MPM and intestinal metaplasia may be regulated by different gene regulatory mechanisms each other. The promoter and enhancer of intelectin-1 in MPM located on a region from -56 to +6 nucleotides including a TATA box element and from +263 to +293 nucleotides, respectively, for the transcription start site. Database analysis of the enhancer region suggested that Oct and Sox transcriptional factors might function as transcriptional factors of intelectin-1 in MPM.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：中皮腫

## 1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫 (以下、中皮腫) は、アスベストの曝露が主要原因で発生する悪性腫瘍として、大きな社会問題となっている疾患である。早期発見が困難であり、予後の悪い悪性腫瘍の一つに位置づけられている。反応性中皮細胞は良性の中皮細胞の増殖で、気胸やアスベスト曝露により発生する。反応性中皮細胞と上皮型中皮腫は病理学的に類似する場合があります、病理学的鑑別にしばしば困難を伴う。動物を用いた中皮腫誘発実験では、反応性中皮細胞の出現を経て中皮腫が発生することが報告されているが、両者について分子細胞学的な解析を行った報告はなく、中皮腫の発がん過程については未知な点が多く残されている。

インテレクチン-1 は正常組織では腸管の杯細胞に特異的に発現する分泌型の生体防御レクチンである。我々は、インテレクチン-1 が異型性の高い反応性中皮細胞のごく一部と上皮型中皮腫で発現し、胸水中に分泌されることを見いだしている。インテレクチン-1 は感染やアレルギーにより呼吸器組織で異所的に発現誘導されることが知られているが、その発現調節機構は未だ解明されていない。

腸上皮化生は食道や胃の上皮組織に腸の杯細胞様の細胞が出現する病変で、腺がんの前がん病変と考えられている。腸上皮化生では *caudal-related homeobox 2 (CDX2)* や *cyclooxygenase-2 (COX-2)* などの分子の発現が増加しており、Wnt シグナルの伝達異常が発がんに関わることが報告されている。一方、*COX-2* や Wnt シグナル伝達経路の活性亢進は中皮腫においても報告されている。

これらの知見に基づき、我々は、反応性中皮細胞が腸上皮化生類似のシグナル伝達や遺伝子発現制御によって異型化し、上皮型中皮腫へとがん化する可能性があると考え、中皮腫におけるインテレクチン-1 の発現は腸上皮化生様の変化を反映したものであるという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

中皮細胞が腸上皮化生類似のシグナル伝達や遺伝子発現制御によって異型化し、上皮型中皮腫へとがん化するという仮説を検証するために、中皮腫関連因子および腸上皮化生関連因子について免疫組織学的解析を行い、その発現動態から腸上皮化生、および中皮腫の関連性について考察、検討を行うことを目的として研究を行う。

また、中皮腫細胞株を用いてインテレクチン-1 のプロモーター部位の解析を行い、中皮腫においてインテレクチン-1 の発現に関わる転写因子を明らかにすることで、未だ明らかではないインテレクチン-1 の発現制御機構を解明し、中皮腫の発がんとの関係や診断法への応用への可能性について検討を行

うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

所属研究室にて収集・保存されている中皮腫および腸上皮化生を含む胃がん組織のホルマリン固定・パラフィン包埋組織 (中皮腫 9 例、腸上皮化生 13 例) から連続薄切切片を作製し、ヘマトキシリン-エオシン染色および下記分子の免疫組織染色を行った。中皮腫関連因子としてインテレクチン-1、カルレチニン、*glucose transporter-1 (GLUT-1)*、*Wilm's tumor-1 (WT-1)* の染色を行い、腸上皮化生関連因子として *CDX2*、*COX2*、 $\beta$ -カテニン、E-カドヘリンの染色を行った。染色した組織における各分子の発現率をスコア化し、発現局在部位も含めて類似性を比較検討した。

中皮腫におけるインテレクチン-1 のプロモーター部位の解析を行うため、インテレクチン-1 産生中皮腫細胞株 *Acc-Meso4* を用いて、インテレクチン-1 遺伝子の 5' 上流領域約 2500 残基をクローニングした。また転写開始点を推定するため、中皮腫細胞株 *Acc-Meso1* および *Acc-Meso4* を用いて 5' RACE 法を行い、中皮腫におけるインテレクチン-1 の転写開始点を決定した。クローニングした配列を鋳型にして様々な欠失変異体を作製し、レポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子) の上流に組み込んで、プロモーター解析のためのルシフェラーゼアッセイ用ベクターを構築した。この発現ベクターを様々な中皮腫細胞株 (*Acc-Meso1*、*Acc-Meso4*、*NCI-H28*、*NCI-H2052*、*NCI-H2452*、*MSTO-211H*、*MEYK2*、*MEYK4*) にエレクトロポレーション法で遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイにより転写活性を測定した。段階的に高い転写活性を持つ部位を絞り込み、エンハンサー・プロモーター領域と考えられる部位を特定した。この部位に結合すると予想される転写因子をデータベース検索により検索し、インテレクチン-1 の発現誘導因子と考えられた *Sox* ファミリー分子、および *Oct* ファミリー分子の発現を RT-PCR 法および western blotting 法にて解析した。

## 4. 研究成果

### ○ 得られた成果

#### (1) 腸上皮化生および中皮腫の関連性についての検討

*CDX2* は腸上皮化生の杯細胞の発生に関与していると報告されている。一方、インテレクチン-1 は腸管杯細胞と中皮腫に発現している。ゲノムデータベースを用いた解析から、インテレクチン-1 の転写開始点と予測される領域の上流には *CDX2* 結合サイトが存在することが見いだされたため、腸上皮化生および中皮腫におけるインテレクチン-1 の発現が *CDX2* により誘導される可能性が考えられた。そこで、中皮腫と腸上皮化生の類似性

について、それぞれの代表的な関連因子について免疫組織学的解析を行った。表 1 に示すように、中皮腫および腸上皮化生の両部位において、インテレクチン-1 が特異的に発現していた。一方、他の中皮腫マーカーとして知られるカルレチニン、GLUT-1、WT-1 は中皮腫のみで発現が認められ、腸上皮化生部位での発現はほとんど認められなかった。腸上皮細胞の増殖や分化に関連する転写因子である CDX2 は、中皮腫ではほとんど発現が認められず、腸上皮化生部位で発現が認められた。COX-2 の発現（中皮腫 89%、腸上皮化生 100%）や  $\beta$ -カテニンの核移行（中皮腫 33%、腸上皮化生 31%）等については、中皮腫と腸上皮化生部位における発現に関連性は認められなかった。

以上の結果から、中皮腫におけるインテレクチン-1 の発現には CDX2 の関与は否定的で他の転写因子が関与しているものと考えられた。また、CDX2 の発現や Wnt シグナルの伝達異常など、腸上皮化生の発生要因と中皮細胞のがん化は異なる機序によって起こっていると考えられ、中皮腫におけるインテレクチン-1 の発現は腸上皮化生様の変化を反映したものではないと考えられた。

なお、インテレクチン-1 および中皮腫マーカーの免疫染色の結果の一部は、抗インテレクチン-1 モノクローナル抗体が、上皮型悪性胸膜中皮腫に特異的に結合し、病理診断マーカーとして既存の中皮腫マーカーよりも優れていることに関する雑誌論文の一部として発表した（発表論文 2）。

	中皮腫	腸上皮化生
インテレクチン-1	78%	100%
カルレチニン (核染色)	67%	23%
GLUT-1	67%	23%
WT-1 (核染色)	100%	23%
CDX2	11%	100%
COX-2	89%	100%
$\beta$ -カテニン (核染色)	33%	31%
E-カドヘリン	89%	100%

表 1 各マーカーの免疫染色における陽性率

## (2) 中皮腫におけるインテレクチン-1 のプロモーター部位の解析

インテレクチン-1 遺伝子上流領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだ発現ベクターを様々な中皮腫細胞株にエレクトロポレーション法で遺伝子導入した。細胞生存率と遺伝子導入効率が高く、ルシフェラーゼ活性を示した Acc-Meso1 および Acc-Meso4 をルシフェラーゼアッセイに用いた。

上流領域を段階的に欠失した変異体を作製し、ルシフェラーゼアッセイにより転写活性を測定したところ、転写開始点上流-960~-351 の領域にサブレッサー領域、-53~+292 の領域にエンハンサー・プロモーター領域が

存在することが明らかとなった（図 1）。そこでさらに解析を進めた結果、プロモーター領域として TATA ボックスを含む-56~+6 の領域、エンハンサー領域として+263~+293 の領域を同定した（図 2）。

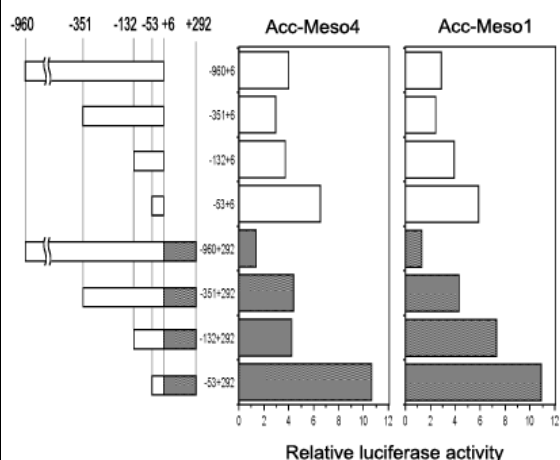


図 1 インテレクチン-1 の発現調節領域

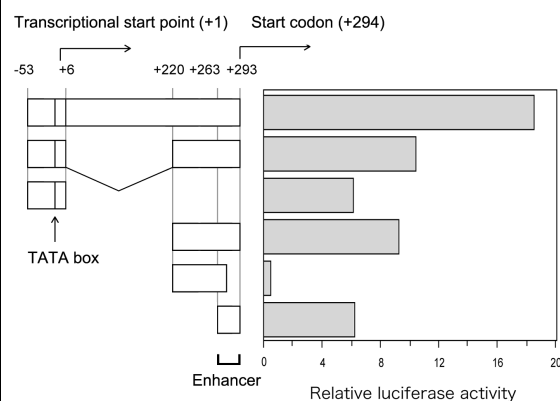


図 2 中皮腫におけるインテレクチン-1 のプロモーターとエンハンサー領域

そこで、これらの領域に結合する転写因子をデータベースサーチにより検索し、PDX1、Sox10、Oct7、GATA ファミリー、ER- $\alpha$ 、CDX2 などの転写因子の候補分子を見いだした。このうち、PDX1 と CDX2 は中皮腫細胞では発現がないことが実験により確認された。また、GATA ファミリーと ER- $\alpha$  は中皮腫での発現特異性に欠けると予測されたため、インテレクチンの発現誘導に関連する因子としては可能性が低いと考えられた。

Sox10 と Oct7 について RT-PCR 法および western blotting 法にて発現解析を行ったところ、これらの分子が中皮腫細胞で発現していることが確認された。また、Sox および Oct ファミリーは認識配列が類似しているため、ファミリー内の他の分子についても発現検討を行ったところ、それぞれのファミリーの複数の分子が発現していた。エンハンサー領域配列を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、バンドシフトが見られ、当該領域に結合する因子があることが推定された。しかし、複数の Oct ファミリー分子および Sox フ

ファミリー分子の関与が疑われ、本研究期間内ではエンハンサー因子を絞り込むことは出来なかった。

#### ○ 位置づけとインパクト

本研究により、インテ렉チン-1の発現調節機序の一部が判明し、中皮腫におけるインテ렉チン-1発現誘導が細胞増殖や分化、幹細胞の多能性維持に関わる Oct・Sox 転写因子群と関係している可能性が考えられた。中皮腫は抗がん剤や放射線療法に抵抗性を示し、多彩な組織型に分化することからがん幹細胞様の性質を持つ細胞集団が多いのではないかと考えられている。従って、中皮腫のがん幹細胞様の性質が Oct・Sox 転写因子群により制御されている可能性が考えられた。これまでに中皮腫が様々な組織型に分化する理由、がん幹細胞様の性質を持っている理由を分子レベルで解明した報告はなく、本研究は中皮腫のがん幹細胞研究に新しいアプローチの取り掛かりをあたえることができたと考えられる。

#### ○ 今後の展望

本研究期間内ではインテ렉チン-1のエンハンサー因子を同定することは出来なかった。今後は本研究で同定されたエンハンサー領域と Oct・Sox 転写因子群に焦点を絞り、中皮腫におけるインテ렉チン-1の発現調節機構の全容を明らかにすることが望ましいと考えられる。インテ렉チン-1のエンハンサー因子の一つと推測される Oct-7は悪性黒色種の増殖に関与することが報告されているため、中皮腫における Oct・Sox 転写因子群の発現と作用を解析することで、未解明な点が多い中皮腫の発がん過程や増殖機序の一端を遺伝子転写レベルで明らかにできる可能性があると考えられる。

#### 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) Shoutaro Tsuji, Makiko Yamashita, Taihei Kageyama, Takashi Ohtsu, Katsuo Suzuki, Shintaro Kato, Joe Akitomi, Makio Furuichi, and Iwao Waga. 2013. Hishot display—a new combinatorial display for obtaining target-recognizing peptides. PLoS ONE 8(12): e83108. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0083108.

(2) Kota Washimi, Tomoyuki Yokose, Makiko Yamashita, Taihei Kageyama, Katsuo Suzuki, Mitsuyo Yoshihara, Yohei Miyagi, Hiroyuki Hayashi, and Shoutaro Tsuji. 2012. Specific expression of human intelectin-1 in malignant pleural mesothelioma and gastrointestinal goblet

cells. PLoS ONE 7(7): e39889. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0039889.

[学会発表] (計 5件)

(1) Shoutaro Tsuji, Makiko Yamashita, Taihei Kageyama, Takashi Ohtsu, Katsuo Suzuki, Shintaro Kato, Joe Akitomi, Makio Furuichi, Iwao Waga. Hishot display - a new combinatorial display for obtaining artificial antibody. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド (兵庫), 2013.12.3.

(2) 辻祥太郎、影山泰平、鷺見公太、山下真紀子、横瀬智之、諸星隆夫、津浦幸夫. 上皮型中皮腫におけるインテ렉チン-1の発現と診断マーカーとしての評価. 第4回 Japan Mesothelioma Interest Group 研究会, 京都私学会館 (京都), 2013.8.31.

(3) Shoutaro Tsuji, Kota Washimi, Makiko Yamashita, Taihei Kageyama, Katsuo Suzuki, Mitsuyo Yoshihara, Yohei Miyagi. インテ렉チン-1は上皮型悪性胸膜中皮腫の優れた診断マーカーである, 第71回日本癌学会学術総会, ロイトン札幌 (北海道), 2012.9.21.

(4) Makiko Yamashita, Kota Washimi, Taihei Kageyama, Katsuo Suzuki, Mitsuyo Yoshihara, Tomoyuki Yokose, Yohei Miyagi, Shoutaro Tsuji. 悪性胸膜中皮腫と腸上皮化生におけるマーカー蛋白質の発現の比較. 第71回日本癌学会学術総会, ロイトン札幌 (北海道), 2012.9.21.

(5) Taihei Kageyama, Makiko Yamashita, Katsuo Suzuki, Mitsuyo Yoshihara, Kota Washimi, Tomoyuki Yokose, Yohei Miyagi, Shoutaro Tsuji. 悪性胸膜中皮腫に対するモノクローナル抗体の作製. 第71回日本癌学会学術総会, ロイトン札幌 (北海道), 2012.9.21.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山下 真紀子 (MAKIKO YAMASHITA)  
地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター (臨床研究所)・がん治療学部・客員研究員  
研究者番号: 60397776

##### (2) 研究協力者

辻 祥太郎 (SHOUTARO TSUJI)  
地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター (臨床研究所)・がん治療学部・主任研究員  
研究者番号: 30285192