

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590419

研究課題名(和文) 肺癌の浸潤・転移に膜型セリンプロテアーゼインヒビターはどのように関与しているか？

研究課題名(英文) The role of membrane-type serine protease inhibitors in invasion/metastasis of lung cancer

研究代表者

田中 弘之 (Tanaka, Hiroyuki)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90433060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌とLRP11に関する文献的報告はない。ノーザンブロットでは、ヒト正常組織で脳・前立腺組織と精巣に遺伝子発現がみられ、肺では軽度遺伝子発現がみられた。肺癌培養細胞株ではRT-PCRでLRP11の遺伝子発現がみられる。市販の抗LRP11抗体を検証するため、COS7細胞にヒトLRP11を強制発現させ、ヒトLRP11を正しく認識することを確認した。ヒト肺癌組織を用いた免疫染色では、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌の細胞質および細胞膜に陽性像を示した。現在、ヒト手術検体からLRP11の遺伝子発現および免疫染色と組織型、5年生存率、無病生存率などの臨床病理学的検討を行っている。

研究成果の概要(英文)：There has been no literature reports about LRP11 in lung cancer. In Northern blot, the brain and prostate tissue and testis in human normal tissue was observed gene expression, mild gene expression was observed in the lung. Gene expression of LRP11 was detected by RT-PCR in lung cancer cell lines. To test anti human-LRP11 antibodies, we made COS-hLRP11 cells which have expression of human LRP11 protein in COS-7 cells. Immunohistochemically, the cytoplasm and cell membrane of adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and small cell carcinoma using surgical material (FFPE tissue) are positive for LRP11 using the anti-human LRP11 antibodies. Currently, we have search role of LRP11, especially relevance of clinicopathological findings and expression of LRP11, in lung cancer, using immunohistochemical study and real-time PCR.

研究分野：人体病理学

キーワード：肺癌 LRP11 HGF activator inhibitor serine protease

1. 研究開始当初の背景

数多くの細胞膜結合型セリンプロテアーゼが報告された。これらには、GPI アンカー型のものとして II 型細胞膜貫通型のものがある。後者は現在まで 20 数種類の報告があり、種々の癌との関連性が報告されている。中でも matriptase はトランスジェニックマウスモデルを用いた研究で、皮膚における過剰発現が扁平上皮癌の発生をもたらすことが報告されており、発癌との関連性が強く示唆されている。前立腺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、大腸癌および悪性中皮腫との関連も報告され、hepatocyte growth factor (HGF) や pro-urokinase の活性化などの、多彩な生理活性も報告されている。これらの II 型膜結合型セリンプロテアーゼの活性制御に関わることが想定されている分子は、当初血中 HGF 活性化酵素 (HGF activator) のインヒビターとして報告された HGF activator inhibitor type-1 (HAI-1) である。特に matriptase の活性制御において、HAI-1 は決定的な役割を有し、単なるインヒビターとしての役割のみならず、互いの LDL 受容体様ドメイン間の homophilic な結合を介して、matriptase 前駆体の細胞内分子シャペロンとして matriptase 前駆体の局在と活性化にも重要な役割を有することが明らかとなった。HAI-1 は種々の上皮細胞や胎盤で発現がみられる I 型膜貫通型蛋白である。申請者らは、HAI-1 は肺胞・気道上皮細胞の細胞膜側底部に発現し、炎症や癌などの細胞障害部近くでは HAI-1 の発現が細胞頂部に変化することを見出した (Tanaka et al., Human Cell 2009)。また申請者らは HAI-1 ノックアウトマウスを作製し、HAI-1 欠損マウスは胎盤形成不全により胎生致死となることを明らかにしたが (Tanaka et al., Mol. Cell. Biol. 2005)、この表現形の少なくとも一部は HAI-1 欠損に伴う matriptase 活性の異常によることも明らかとなった。また申請者らは

種々の悪性腫瘍で HAI-1 が発現していることを報告してきた (Kataoka et al. Cancer Metastasis Rev. 2003)。また膀胱癌培養細胞株を用いて浸潤・転移機構に重要な役割を有する上皮間葉移行 (epithelial mesenchymal transition: EMT) に膜型蛋白質である HAI-1 が関与すること報告したが (Cheng H, Tanaka H et. Al., Cancer Res. 2009)、肺癌の EMT において、膜型蛋白質の役割は未だ詳細に解析されていない。一方で、申請者らは HAI-1 に類似する蛋白質の検索を行う過程で、HAI-1 から Kunitz domain を除いた構造と相溶性が高い low density lipoprotein receptor-related protein 11 (LRP11) を見出した、特に HAI-1 と LRP11 のシステイン残基の部位はほぼ一致していた。また MANSO ドメインは、ヒト、サル、ラット、ハツカネズミ、ショウジョウバエ、ハマダラ蚊で保存されており、重要な役割を担っている可能性が示唆されるが、その機能を解析した報告はない。これまでに行った予備実験では、LRP11 はヒト正常臓器においては脳・前立腺および精巣に発現がみられ、各種の肺癌培養細胞において強い遺伝子発現が認められた。データベースの検索により、本遺伝子は low density lipoprotein receptor-related protein 11 (LRP11) として、登録されているものと同一であり、HAI-1 と同様に N 末端より MANSO (motif at N-terminus with seven cysteines) ドメイン、LDL 受容体様ドメインおよび膜貫通ドメインを有し、I 型の膜結合型蛋白であることが分かった。更に手術で切除された肺癌組織における mRNA の高発現も確認した。申請者は、LRP11 は、その構造上の類似性から HAI-1 と同様に、その LDL 受容体様ドメインを介して、matriptase 前駆体の分子シャペロンとしてその局在と活性化に関与し、なおかつインヒビタードメインを欠くことから、癌細胞において過剰な matriptase 活性を誘導している可能性を想定している

2. 研究の目的

申請者らは肝細胞増殖因子 (HGF)系およびその制御の要である膜型セリンプロテアーゼインヒビターである HGF activator inhibitor type-1 (HAI-1)の悪性腫瘍における浸潤・転移機構を解析してきた。今回、申請者らは、HAI-1 研究過程で見出され HAI-1 類似の新規膜型蛋白質である LRP11 および HAI-1 の肺癌での浸潤・転移機構における役割について解析を進めて行く予定である。

3. 研究の方法

- (1) HAI-1 と LRP11 の正常組織における発現部位、パターンを RT-real time PCR、ISH および免疫染色を用いて比較する。
- (2) 肺癌における HAI-1 と LRP11 の遺伝子発現および蛋白質発現と、臨床病期および予後との関連を明らかにする。
- (3) 肺癌での epithelial mesenchymal transition(EMT)に関して、HAI-1 および LRP11 が関与しているのか明らかにする。
- (4) LRP11 の機能、特に matriptase の分子シャペロンとして機能する可能性について検証する。

4. 研究成果

肺癌と LRP11 に関する文献的報告はない。ノーザンブロットでは、ヒト正常組織で脳・前立腺組織と精巣に遺伝子発現がみられ、肺では軽度遺伝子発現がみられた。肺癌培養細胞株では RT-PCR で LRP11 の遺伝子発現がみられる。市販の抗 LRP11 抗体を検証するため、COS7 細胞にヒト LRP11 を強制発現させ、ヒト LRP11 を正しく認識することを確認した。ヒト肺癌組織を用いた免疫染色では、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌の細胞質および細胞膜に

陽性像を示した。現在、ヒト手術検体から LRP11 の遺伝子発現および免疫染色と組織型、5 年生存率、無病生存率などの臨床病理学的検討を行っている。

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5件)

1. Magnetic resonance imaging and histopathological findings in a patient with subcutaneous paragonimiasis: a case report: Kodama M, Akaki M, Tanaka H, Maruyama H, Nagayasu E, Yokouchi T, Arimura Y, Kataoka H. J Med Case Rep. 2014 [in press], 査読有り
2. Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 is a suppressor of intestinal tumorigenesis: Hoshiko S, Kawaguchi M, Fukushima T, Haruyama Y, Yorita K, Tanaka H, Seiki M, Inatsu H, Kitamura K, Kataoka H. Cancer Res. 73 (8): 2659-70, 2013 査読有り
3. Urinary bladder pyogenic granuloma: a case report: Mukai S, Tanaka H, Yamasaki K, Goto T, Onizuka C, Kamoto T, Kataoka H. J Med Case Rep. 6:149. doi:10.1186/1752-1947-6-149, 2012 査読有り
4. Loss of membrane-bound serine protease inhibitor HAI-1 induces oral squamous cell carcinoma cells' invasiveness: Baba T, Kawaguchi M, Fukushima T, Sato Y, Orikawa H, Yorita K, Tanaka H, Lin CY, Sakoda S, Kataoka H. J Pathol. 228(2), 181-92, 2012 査読有り

5. Antitumor effect of dehydroxymethylepoxyquinomicin, a small molecule inhibitor of nuclear factor- B, on glioblastoma: Fukushima T, Kawaguchi M, Yorita K, Tanaka H, Takeshima H, Umezawa K, Kataoka H. Neuro Oncol. 14(1) 19-28, 2012 査読有り

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 弘之 (TANAKA, Hiroyuki)
宮崎大学医学部病理学講座腫瘍・再生病態学・助教

研究者番号 : 90433060

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :