

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：37116

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650624

研究課題名(和文)性ホルモンの肺癌悪性度規定メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of sex hormones derived signaling in lung cancer

研究代表者

井上 政昭 (INOUE, Masaaki)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：20330988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌予後の性差はエストロゲンに誘導されるシグナル伝達に関連している可能性に着目して研究を行った。ATBF1発現とERアルファ発現に高い相関が示された。このことから、ERアルファを介したATBF1へのシグナル伝達が肺癌の肺癌予後の性差に関与している可能性が考えられた。今後は臨床症例での予後を解析しその妥当性の検討、新たなシグナル伝達系が肺癌予後因子と成りうるかを検証する必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to evaluate that sex hormones is involved in the etiology of lung cancers through ATBF1 signaling pathway. High expression of AFBF1 in lung cancer cells showed positive relation to the ERalpha expression. From those results ERalpha signaling can also affect ATBF1 signaling in lung cancer, and those signaling system could involved in prognosis of lung cancer. Next, it is necessary to evaluate whether the ERalpha-ATBF1 signaling involve the sex difference of prognosis using large number of clinical samples, and also analyze the signaling pathway directly in vitro.

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍生物学

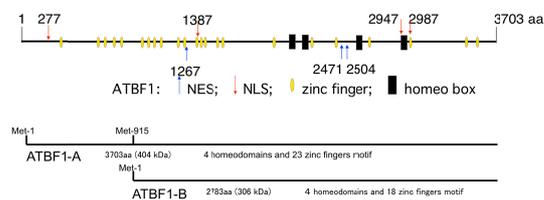
キーワード：ATBF1(ZFH3) 肺癌 性ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は我が国の癌死因の第一位である。肺癌に研究によりがん細胞増殖に有用な因子が発見され分子標的薬が導入され、飛躍的に予後の改善が認められ、現在でこれが分子標的薬に使用が一般的になっている。しかし、男女の治療成績の差は依然認められており、肺癌切除症例においては5年生存率で約20%の男女差が認められている。この予後の性差の問題に対しての答えは未だ得る事が出来ていない。この原因を解明する事が出来れば、新たな肺癌シグナル伝達系の解明とそれに伴う新たな治療法の開発に結びつく可能性があるという期待を寄せている。

性の違いは生物界の大きな問題であり、永遠の課題である。この差が身体だけでなく悪性腫瘍にも影響を及ぼすことは早くから指摘されているにも関わらず、そのメカニズムは難題として存在している。これまで性ホルモンが最も有力な因子であると推察されて、種々の悪性疾患で研究が行われてきたが、その根拠を裏付ける科学的根拠は示すことが出来なかった。我々はこれまで研究テーマとして取り組んでいた新規癌抑制因子であるATBF1(ZFH3)が性ホルモンと密接に関連しているという発表があった。ATBF1(AT-motif binding factor 1)は4個のホモボックスと23個のZnフィンガーを持つ巨大なDNA結合タンパク質でありMiuraらによりクローニング(*J. Biol. Chem.* 270: 26840-26848, 1995)された(図1)。

図1. ATBF1の機能と構造ドメイン



この遺伝子の発現や変異が癌の発現や予後に関

与する事が示されており、新たな癌抑制遺伝子としても注目されている。近年、性ホルモンであるエストロゲンが癌抑制遺伝子であるATBF1の発現を制御しているという報告が認められた。これまで、肺癌においても性ホルモンの発現が予後の関与する可能性をしめす疫学報告が認められており、性ホルモンが悪性腫瘍の生物学的特徴に関与している事は推測されていた。このような背景から、性ホルモンの悪性腫瘍に及ぼす作用は、性ホルモンのATBF1を介するシグナル伝達が主たる作用機序であるという仮説を立て、ATBF1とその関連因子の発現と性ホルモンの関連を解析し、ATBF1を介した性ホルモンシグナル伝達の肺癌への関与を解析することで、悪性腫瘍の性差のメカニズムを解明することが出来ると考えられる。

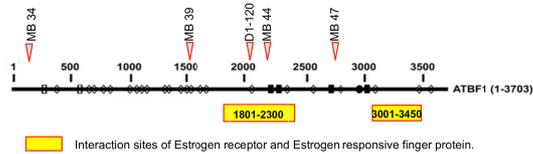
## 2. 研究の目的

今回の研究で、性ホルモンの発現と悪性腫瘍に及ぼす作用機序を示すことが出来れば、性差が悪性腫瘍に及ぼす影響の課題を解くのみでなく、悪性腫瘍の新たな治療戦略を構築することが可能となり、多くの患者に福音をもたらすことが可能となる。また、ATBF1の悪性腫瘍における重要性を示すことは、新規抗がん剤の開発に結びつく可能性を秘めている

## 3. 研究の方法

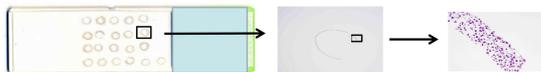
肺癌におけるATBF1の発現を調べるため、他の癌で既に用いられているD1-120抗体を用いて79例の肺癌組織に対し免疫染色を行った。更に新たに作成した4種類(MB34, MB39, MB44, MB47)に抗体を用いて、免疫染色条件を設定し免疫染色を行った(図2)。

図2. 抗ATBF1抗体認識部位とエストロゲン受容体結合部位



条件設定および種々の因子の免疫染色を行うには、臨床検定では同じ条件で染色出来ないため、17の肺癌培養細胞株からセルブロックを作成し、Spiral cell-line arrayを作成して同じ条件下で種々のATBF1関連因子と性ホルモンに対し免疫染色を行った(図3)。染色結果は核および細胞質での発現をそれぞれ評価し、解析を行った。

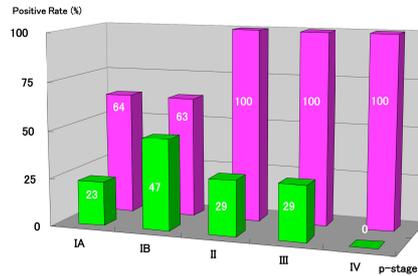
図3. Spiral cell-line array



#### 4. 研究成果

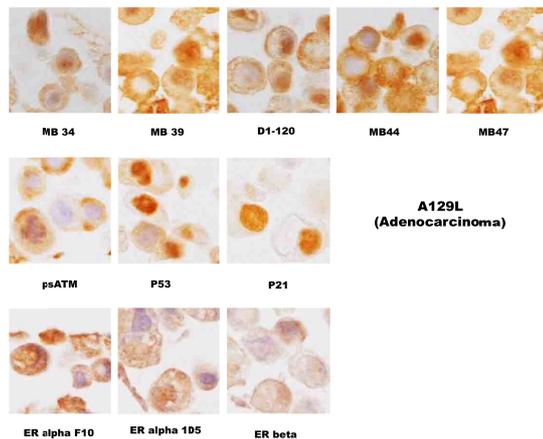
まず、肺癌でのATBF1の発現を調べるため、他の癌腫での研究で用いられた抗ATBF1抗体(D1-120)を用いて79例に対し免疫染色を行った。男性49例、女性30例。組織型は、腺癌57例、扁平上皮癌18例、大細胞癌2例、小細胞癌2例であった。ATBF1核陽性率は全体で29%、男性20%、女性43%、腺癌54%、扁平上皮癌11%であった。一方、細胞質陽性率は全体で71%、男性76%、女性63%、腺癌65%、扁平上皮癌83%であった。病理病期では、核陽性率はIA期23%、IB期47%、II期29%、III期29%、IV期0%で、細胞質陽性率はIA期64%、IB期63%、II期100%、III期100%、IV期100%であった。肺癌においてATBF1の核で発現IA期からIB期と病期の進行に伴い発現率は上昇するが、その後は病期の進行に伴い減少が認められた。一方、細胞質での発現は病期の進行に伴い上昇のみが認められた。(図4)

図4. 肺癌の病理病期別のATBF1発現率



次に、5種類の抗ATBF1抗体、ATBF1関連因子、および性ホルモンの染色性をSpiral cell-line arrayで確認した(図5)。

図5. 肺癌細胞における各因子の染色性



肺癌培養細胞株から作成したSpiral cell-line arrayを用い5種類のATBF1抗体を用いてその発現を調べた。ATBF1の発現は認識部位で異なったが多くは複数の抗体で発現率が高い傾向をしめした。そのため、一つの抗体でも発現が低い細胞株6種は限局的発現群(Limited expression group)としその他11種を高発現群と(Widerange expression group)した。一般的肺癌関連因子としてCEA、TTF-1、ATBF1関連因子としてはp53、p21、ATM、ps-ATM、性ホルモンとしてPR、ER、ER(F-10)、ER(1D5)、ER(H-150)の染色を行った。染色結果は図6に示す様にATBF1の発現にて2群に分けているため2群間に差を認め、抗体の認識部位がN末からC末に違つてつれて差は大きくなりBM44、

MB47 においては有意な差が認められた。関連因においてはリン酸化 ATM(psATM) 有意な関連が認められた。

図6 . 核における平均発現率

	Limited expression (%)	Wide range expression (%)	p
MB34	87.0	94.2	0.158
MB39	81.7	91.7	0.205
D1-120	80.8	91.1	0.178
MB44	67.7	84.5	0.045
MB47	58.2	75.3	0.025
-----			
p53	64.2	74.4	0.449
p21	24.7	18.3	0.497
psATM	27.7	52.5	<0.001
ER	41.3	33.0	0.643
Er $\alpha$ (F-10)	20.8	26.0	0.36
Er $\alpha$ (1D5)	20.6	28.3	0.15
ER $\beta$ (H-150)	21.8	25.4	0.457

次に、ER と ATBF1 の関係をみた。ER が ATBF1 と結合する部位を認識する ATBF1 抗体は 2 種類 (D1-120、MB44) あり、この二つの抗体での染色性で 17 種の肺癌細胞を高発現 (High expression) と低発現 (Low expression) に分類した。その 2 群で性ホルモンの発現をみると ER でその発現に有意な差が認められたが、ER では有意差は認められなかった (図7)。

図7 . ER 認識部位における ATBF1 発現と性ホルモンの発現

	High Expression	Low Expression	p
ER $\alpha$ (F-10)	27.9	17.0	0.013
ER $\alpha$ (1D5)	29.1	19.2	0.040
ER $\beta$ (H-150)	26.4	19.8	0.128

## 結論

肺癌細胞において ATBF1 はエストロゲン受容体と相互に作用して、エストロゲン受容体からのシグナル伝達に起因する遺伝子、細胞増殖、分化を抑制する。一方で ATBF1 とエストロゲン-エストロゲン受容体 間においてはフィードバック自動

調整で制御されており ATBF1 は性ホルモンと密接な関係が示されている。肺癌における報告はないため本研究を行った。肺癌における ATBF1 の核での発現においては、他の癌と同様に癌の進行に伴い発現が上昇しその後は発現が減少した。肺癌培養細胞株を用いたタンパク発現では ATBF1 の発現と ER、PR の発現に相関を認め、特に ER で強相関が示された。この結果は肺癌細胞で示された結果と矛盾しない結果であり、肺癌においても ATBF1-エストロゲン受容体シグナルが重要な悪性に関する因子であ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)

[学会発表] (計 1 件)

The expression of ATBF1 is in proportion to the expression of estrogen receptor in lung cancer cells.

Masaaki Inoue, Makoto Kawaguchi, Junya Fukuoka, Yutaka Miura

October 27-30, 2013. 15<sup>th</sup> World

Conference on Lung Cancer, Sydney, Australia.

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

井上 政明 (INOUE Masaaki)  
産業医科大学 医学部 第 2 外科学  
非常勤医師  
研究者番号 : 20330988

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

