

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659583

研究課題名(和文)転写因子Fra-1の上皮間葉転換(EMT)を中心とした機能解析

研究課題名(英文)Analyses of transcriptional factor Fra-1 function with a focus on EMT

研究代表者

星野 敢(Hoshino, Isamu)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10400904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子Fra-1が食道癌において浸潤転移に関与することを報告してきた。今回Fra-1の食道癌臨床検体における発現意義をあきらかにするため、細胞株を用いメカニズムの詳細の検討を行った。Fra-1高発現株であるTE10、TE11を使用し、knockdownを行った結果、増殖、移動、浸潤能が有意に低下した。Fra-1制御遺伝子をmicroarrayを用いて網羅的に検索、BIOBASE Upstream Analysisにてpathway解析を行った結果、Fra-1の制御遺伝子としてHMGA1が抽出され、その下流にHMMRを同定した。臨床検体を用いた解析の結果、その発現は有意な予後規定因子であった。

研究成果の概要(英文)：We have reported that Fra-1 was correlated with invasion and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma(ESCC). Herein, we tried to clarify the mechanism of the Fra-1 expression in ESCC. We constructed Fra-1 knock down cells using siRNA in Fra-1 high expressed cells, TE10 and TE11. Fra-1 knock down induced reducing of cell proliferation, migration, and invasion potentials. Then, we explored the Fra-1 regulated genes using microarray and they were analyzed by BIOBASE Upstream Analysis. HMGA1 was a candidate which was regulated by Fra-1 and HMMR was detected as a gene which was regulated by HMGA1. Moreover, immunohistochemical staining using clinical ESCC samples showed that HMMR was a significant prognostic factor in ESCC patients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：Fra-1 食道扁平上皮癌 HMGA1 HMMR

## 1. 研究開始当初の背景

食道癌は予後が不良とされ、その罹患率と死亡率が近接し、今日においても膵臓癌や胆管癌などとならび難治性の消化器癌の一つとして挙げられている。新たなモダリティによる診断技術の向上や、手術手技や周術期管理、放射線治療、化学療法の発達などにより予後は改善傾向にあるものの未だに治療後の再発率も高く、また再発後の治療の手段が得られないことも多い。食道癌が予後不良である代表的な要因として、リンパ節転移をきたしやすく、その転移箇所も頸部から縦隔、腹部と多岐にわたること。高い頻度で跳躍転移を伴うこと。血行性転移による、肺・肝への転移の頻度が高いことが挙げられる。われわれは、これまでに食道癌を対象として特異的な治療法・新規腫瘍マーカーの開発・同定に取り組んできた。

AP-1 (Activator Protein-1)は発癌機序と関連性のある転写制御因子と報告されている。そして AP-1 ファミリーの一つである Fra-1 (Fos related antigen-1)は多くの癌においてその活性化が報告されており、同遺伝子の制御により腫瘍の増殖・浸潤・転移が抑制されることが期待されている。そこで我々は、Fra-1 と浸潤転移能の関連性を検討する目的にて、食道扁平上皮癌切除症例における Fra-1 の発現を検討し報告を行ってきた。1999 年から 2004 年までの 5 年間に、当科において術前未治療で手術を施行した食道扁平上皮癌 169 例を対象とした。Fra-1 を発現している症例においては深達度、進行度がともに進行している症例が有意差をもって多く、リンパ節転移を有した症例が多い傾向を認めた( $p=0.089$ )。また Fra-1 の発現を認めた群は、5 年生存率が有意差をもって低かった( $p=0.02$ )。これらの結果、Fra-1 が食道扁平上皮癌においては浸潤転移を誘発する機能を有している可能性つまりは epithelial-mesenchymal transition (EMT:上皮間葉移行)との強い関連性を有する可能性が

高いものと考えられた。

## 2. 研究の目的

転写因子 Fra-1 の食道扁平上皮癌臨床検体における発現意義をあきらかにするために、細胞株を用いてそのメカニズムの詳細を検討する。転写因子 Fra-1 による制御因子の検索をアレイ解析を用いて網羅的に行い食道扁平上皮癌臨床検体における発現意義をあきらかとする。また、各因子についてカスケード解析を行い発現意義を検証するとともに、それら因子の機能解析を行い臨床応用へと展開するための研究基盤を確立する。

## 3. 研究の方法

(1) 食道扁平上皮癌細胞株 11 株 (TE1, TE2, TE4, TE5, TE6, TE8, TE10, TE11, TE14, TE15, T.Tn) における Fra-1 の発現を、real-time PCR 法を用いて確認した。

(2) Fra-1 が高発現する食道扁平上皮癌細胞株 (TE10, TE11) について、Neon system を用いて siRNA を導入して Fra-1 の発現を抑制し、その増殖能、走能および浸潤能の変化を確認した。

(3) siRNA 導入によって Fra-1 発現を抑制した食道扁平上皮癌細胞株において発現変化する下流制御遺伝子をマイクロアレイにて網羅的に検索し、標的因子を同定した。さらに、Biobase upstream analysis を用いて、得られた情報の統合的カスケード解析を行った。

(4) 臨床検体における標的因子の発現程度を、real-time PCR 法や免疫組織学的染色法を用いて確認し、臨床病理学的検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) 食道扁平上皮癌細胞株 11 株での Fra-1 の発現の検索

Real-time PCRにて食道がん扁平上皮株 11 種での Fra-1 発現を検討した。コントロールとして human の fibroblast である MRC-5 を用いた。すべての食道癌細胞株において MRC-5 より高い Fra-1 発現が確認された。これらの結果はさらに western blotting 法を用いて検証したが同様の結果であった。うち、TE10 および TE11 における Fra-1 の発現が有意に高く、それらを Fra-1 高発現株として今後の検討に使用することとした。

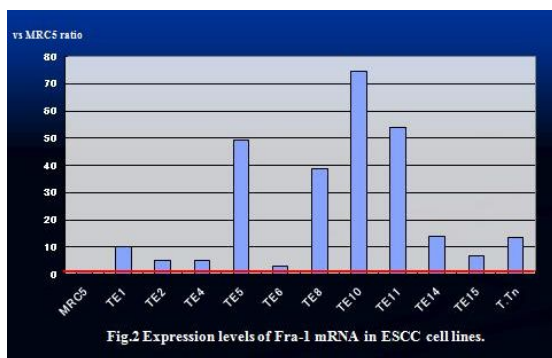


図 1 : 食道扁平上皮癌各細胞株における Fra-1 発現の検討

### (2) Fra-1 発現 knock down による機能解析

Fra-1 高発現株である TE10、TE11 について、Neon transfection system を用いてし Fra-1-siRNA を導入しその機能解析を行った。Fra-1 の発現を抑制した結果、その増殖能、遊走能および浸潤能が有意に低下することが確認された。

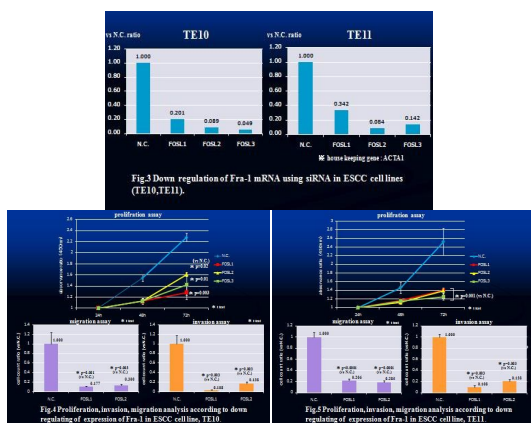


図 2 : TE10、TE11 における Fra-1-siRNA による Fra-1 knock down の効果 (上段)、TE10、TE11 における Fra-1 knock down 後の増殖能、移動能、浸潤能変化 (下段)

### (3) Fra-1 制御遺伝子のマイクロアレイを用いた網羅的解析

siRNA 導入によって Fra-1 発現を抑制した食道扁平上皮細胞癌株 (TE10、TE11) において発現変化する下流制御遺伝子をマイクロアレイ (Human Gene 1.0 ST array、Affymetrix) にて網羅的に検索した。標的因子を同定した。さらに、バイオインフォマティクス技術に基づいた BIOBASE Upstream Analysis (BIOBASE 社) を使用し Fra-1 制御遺伝子群による候補パスウェイ解析を行った。その結果、Fra-1 の標的として HMGA1 (high mobility group AT-hook 1) が第一の候補として検出され、その下流に HMMR (Hyaluronan-mediated motility receptor) が同定された。

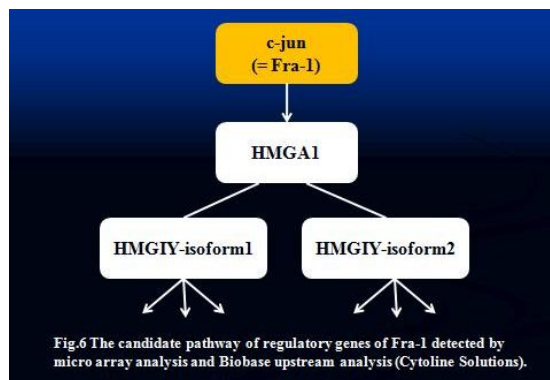


図 3 : Fra-1 の標的遺伝子としての HMGA1 の同定

### (4) 臨床検体における HMMR の発現と臨床病理学的検討

Fra-1 発現と、HMMR の発現の関連性を real-time PCR を用いて臨床検体 (84 検体) 中の mRNA の発現を確認し検証した。その結果、それらの発現の間には正の相関がみられた。また、HMMR の高発現群は低発現群に比して予後が不良である傾向を示した。また、さらに anti-HMMR 抗体を用いて免疫染色を行い、臨床病理学的検討を行ったところ、高発現群は低発現群に比較し有意に予後が不良であり、HMMR 発現が有意な予後因子であることが確認された。

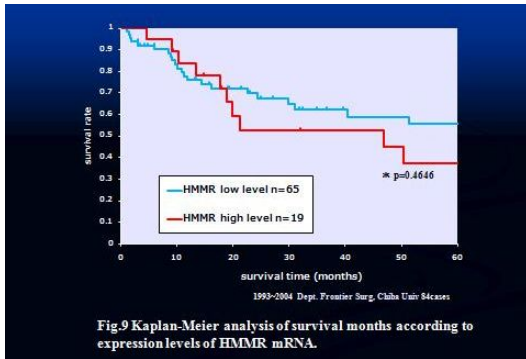


図4：HMMR 発現による予後曲線

## 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 3 件)

1. 豊住武司、星野敢、阿久津泰典ほか 「食道扁平上皮癌における Fra-1 制御遺伝子の網羅的検索」第 72 回日本癌学会学術総会 (2013 年 10 月 3 日、横浜)
2. 豊住武司、星野敢、阿久津泰典ほか 「食道扁平上皮癌における Fra-1 制御遺伝子の網羅的検索」第 34 回癌免疫外科研究会 (2013 年 5 月 17 日、岡山)
3. 豊住武司、星野敢、阿久津泰典ほか 「食道扁平上皮癌における Fra-1 制御遺伝子の網羅的検索」第 113 回日本外科学会定期学術集会 (2013 年 4 月 12 日、福岡)

[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

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

星野 敢 (HOSHINO ISAMU)

千葉大学・医学部附属病院

医員

研究者番号：10400904

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：