

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861252

研究課題名(和文)肺癌における浸潤・転移とS100A14の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of S100A14 in the invasion and metastasis of lung cancer

## 研究代表者

山内 良兼 (Yamauchi, Yoshikane)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30445390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌症例におけるS100A14が予後因子として関与している可能性を示唆する臨床データが得られた。

ヒト肺癌細胞株QG56細胞においてS100A14をノックダウンし細胞増殖能、細胞浸潤能、細胞遊走能について評価したところ、増殖能には影響なく浸潤能や遊走能は有意に減弱した。S100A14に関するsignal pathwayの検索を行い、S100A14の抑制によりMAPKのリン酸化の減弱を認めた。

研究成果の概要(英文)：Clinical data showed that S100A14 in lung cancer tumor may be one of the prognostic factor.

Human lung cancer cell line, QG56 cells, was used for the in vitro analysis. In S100A14-knocked down QG56 cells, the abilities of cell proliferation, cell invasion, and cell migration were evaluated. The assays showed that the abilities of cell invasion and of cell migration were significantly diminished, however the ability of cell proliferation was not changed significantly. The analysis of signal pathway related to S100A14 showed that the weakening of MAPK was revealed, induced by the inhibition of S100A14.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：原発性肺癌

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌治療の個別化に向けて多くの取り組みがなされており、幾つかの有用な分子標的薬が臨床応用されている。一方で、現在においても従来の病期分類を用いた staging により基本的な治療戦略を決めており、乳癌領域における HER2 のような病期分類を凌ぐマーカー分子は未だに見つかっていない。この背景には、一口に肺癌と言っても雑多な集団であり、遺伝子プロファイルが大きく異なるような検体を一纏めにしているために、一部の腫瘍には効果的な発現分子を特定できないのではないかと考える。例えば、一般に癌の転移には癌細胞の浸潤が不可欠であるとされるが、杉野らの先行研究において、浸潤を必要としない転移様式が存在することを発見した。杉野らはその転移モデルを作製し、このモデルを用いた遺伝子発現の網羅的解析により転移関連遺伝子をクローニングした<sup>1</sup>。この解析結果から拾い上げられた遺伝子群は、従来の検討方法では多くの症例で陰性と判定されるために有意な因子として拾い上げられていない可能性がある。

S100A14 はこの検討による候補遺伝子の一つであり、細胞内での発現操作により転移を促進する作用があることが明らかになった分子群の一つである。S100A14 は EF hand を持つカルシウム結合タンパクである S100 ファミリーの一員である。他の S100 ファミリーと同様、他の分子と結合することによって、その分子機能を表すと推定される。他の S100 ファミリーでは、S100A42, S100A83, S100A93 と肺癌予後との強い相関関係が既に報告されている。しかしながら、S100A14 についてはその結合タンパクや局在、機能、癌の悪性形質との関わり、臨床的意義はよく知られていない。

杉野らの先行研究において、これまでに S100A14 が乳癌・肺癌・胃癌など、さまざまなタイプのヒト癌の細胞膜に高発現することを見出した。興味深いことに、臨床病理学的解析から、S100A14 が高発現する乳癌症例は、発現の低い症例に比して生命予後が有意に低いことが明らかになった。

逆に、大腸癌では発現減弱が不良な予後に相関すると報告されている。さらに、S100A14 が転移を促進し、癌患者の予後を不良にする一因として、この分子が癌細胞の浸潤や遊走を促進する機能を持つことが報告されている。現在までの先行研究成果より、S100A14 は乳癌や肺癌の浸潤や転移能を増強し、患者の予後を不良にする新規の悪性形質関連因子と考えられる。

本研究では癌の浸潤・転移における S100A14 の役割を明らかにするために、この分子の結合タンパクを同定し、介在するシグナル伝達系を中心とした分子メカニズムを明らかにする。また、そのデータを基にこの分子を用いた癌の予後予測システムや分子標的治療法の開発など、臨床へ応用するため

の基礎研究を行いたいと考えるに至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、S100A14 の分子機能の解明、肺癌の浸潤・転移における S100A14 の役割の明確化、S100A14 の臨床応用のための基礎データ集積の3点であった。

#### (1) S100A14 の分子機能の解明

S100 ファミリーは他の分子との結合によって機能を発揮するという共通した性質を持っている。したがって、S100A14 の細胞膜への局在や機能を明らかにするために、S100A14 の結合タンパクを同定し、その分子間相互作用のメカニズム、および引き起こされる生理的機能(増殖・運動・接着・代謝など)やこれに関連するシグナル伝達系を探索した。

#### (2) S100A14 の浸潤・転移における役割

異なる浸潤性や転移能を有する種々の肺癌細胞株を用い、S100A14 の強制発現または抑制による細胞の浸潤能・転移能の変化を解析した。さらに、蛍光・発光イメージングの手法を用い、*in vitro* における S100A14 の分子局在や生体内での S100A14 発現癌細胞の動態を明らかにすることを目的とした。

#### (3) 臨床応用のための基礎研究

S100A14 を用いた予後予測診断システムの開発や S100A14 を標的にした癌治療法の開発を行いたいと考えていた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 肺癌症例の臨床病理学的解析

肺癌における S100A14 タンパク発現の臨床的意義を明らかにした。調査対象は 2002 ~ 2007 年に静岡県立静岡がんセンターにて手術を施行した肺癌症例約 750 例であった。腫瘍組織の病理組織標本を収集して S100A14 抗体で免疫染色し、その発現をスコア化した。S100A14 の発現と肺癌患者の臨床病理学的因子、5 年生存率、EGFR 遺伝子変異や KRAS 遺伝子変異の有無、化学療法の効果、などとの関連を統計的に解析した。また、腫瘍組織における組織型(腺癌であればその中での histological type)、核異型の程度、リンパ管侵襲や血管侵襲の有無、Mitotic count などとの相関も解析した。

#### (2) S100A14 の分子メカニズムの解析

マウス・ヒト乳癌細胞株を用いた S100A14 の機能解析と浸潤性や転移能の増強・抑制実験から構成された。

##### 機能解析

a) 適切なモデルの選択のために、ヒト肺癌細胞株 (A549, H460, H1299, PC-9) における S100A14 の発現を real-time PCR, Western blotting, 免疫蛍光法により検出・比較した。  
b) 当研究対象の細胞株における S100A14 の発現部位を確認した。S100 family 分子は構造的に膜貫通ドメインや分泌シグナルペプチドを持たないことから、S100A14 は他の膜タ

ンパクに結合する、もしくは GPI アンカー蛋白の介在によるメカニズムが想定された。本研究ではこれらの分子の結合物質を探索することにより、膜への局在のメカニズムとこれに続く何らかのシグナリングへの関与を検討する。まず、ホスファチジルイノシトールに特異的なホスホリパーゼで処理した後に、S100A14 の膜局在が失われるか否かを検証する。膜局在が失われれば、GPI アンカー型タンパク質であることが示される。GPI アンカー型でない場合、結合する膜タンパクは細胞からの膜蛋白抽出液を S100A14 抗体で免疫沈降し、質量分析により網羅的に解析した。結合蛋白の同定により関与することが予想されるシグナル伝達系だけでなく、MAPK 経路や PI3K-Akt 経路のような悪性腫瘍の進展に関与している経路についても、そのシグナル発現を検証した。

#### 浸潤・転移への関与

S100A14 の発現ベクターを導入する強制発現系、S100A14 に対する特異的な RNAi によるノックダウン系を用いて癌細胞の分子発現を変動させ、細胞の形質変化との関連を明らかにする。特に増殖/生存、遊走、運動、浸潤など癌の悪性形質に関わる性質を主体にアッセイを行った。

さらに、本研究ではマウス転移モデルにおける S100A14 の役割を解明するために、この分子を安定に発現亢進または発現抑制した細胞を作製し、転移能の変化を観察し、そのメカニズムを解析する。

## 4. 研究成果

### (1) 臨床的意義の検討

調査対象となった肺癌症例において腫瘍組織の病理組織標本から S100A14 の発現をスコア化した結果、そのデータと各症例の生存期間を比較し Kaplan-Meier 曲線を描くと下記図 1 および 2 のような結果が得られた。

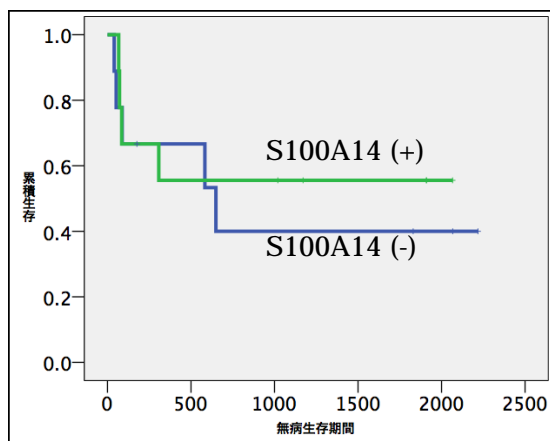


図 1 S100A14 と肺扁平上皮癌の予後

すなわち、原発性肺癌の中でも扁平上皮癌症例においては図 1 に示すように S100A14 陽性群が陰性群よりも有意に予後良好であった。一方、肺癌症例においては図 2 に示すように S100A14 陽性群が陰性群よりも有意に予

後不良であった。この結果は無再発生存期間との比較でも同様の結果が得られたことから、化学療法や放射線治療といった治療効果に大きな影響を受けない予後因子である可能性が示唆された。

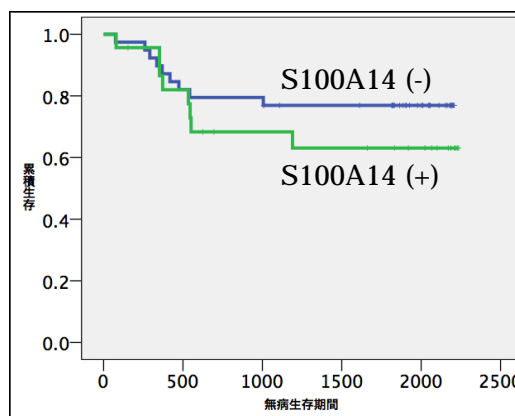


図 2 S100A14 と肺腺癌の予後

一方で、病理学的因子との相関関係を検討したが、EGFR 遺伝子変異や KRAS 遺伝子変異の有無、核異型の程度、リンパ管侵襲や血管侵襲の有無、Mitotic count などとの相関関係は認められなかったことから、独立した予後因子として S100A14 の臨床的意義が示唆された。

### (2) 分子メカニズムの解析

まずヒト肺癌細胞株における S100A14 の発現を比較し実験に最適な細胞株として QG56 細胞を選択した。S100A14 をノックダウンした QG56 細胞を用いて細胞増殖能、細胞浸潤能、細胞遊走能について、scratch healing assay, invasion assay, migration assay などを用いて評価したところ、ノックダウンの影響が増殖能には影響しなかったものの浸潤能や遊走能は有意に減弱した。S100A14 に関する signal pathway の検索を行い、S100A14 の抑制により MAPK のリン酸化の減弱を認めた。

肺癌細胞株における S100A14 の分子メカニズムの解析において、タンパク発現の細胞内局在を認識する実験系により予後予測因子をなりうるバイオマーカーや転移・浸潤に対する治療ターゲットを検索する予定であったが、2014 年 6 月より留学に伴い研究を中途終了した。

## 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 1 件)

1. Yamauchi Y, et al.

Chest tube tip culture as a predictor of postoperative infection in lung cancer operations.

Ann Thorac Surg. 2013 Nov;96(5):1796-802

doi: 10.1016/j.athoracsur.2013.06.043.  
( 査読あり )

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

1. Yamauchi Y, et al.  
SIGNIFICANCE OF THE PRESENCE OF  
MICROSCOPIC VASCULAR INVASION AFTER  
COMPLETE RESECTION OF NON-SMALL CELL LUNG  
CANCER  
22nd European conderence on general  
thoracic surgery  
2014 年 6 月 15 日 コペンハーゲン、デンマ  
ーク

2. Yamauchi Y, et al.  
Percutaneous cryoablation for the  
treatment of inoperable stage I non-small  
cell lung cancer: mid-term outcome  
15th World Conference on Lung Cancer  
2013 年 10 月 28 日 シドニー、豪州

3. Yamauchi Y, et al.  
DOES DRAIN TIP CULTURE PREDICT  
POSTOPERATIVE INFECTIONS IN LUNG CANCER  
SURGERY?  
21st European conderence on general  
thoracic surgery  
2013 年 5 月 28 日 バーミンガム、英国

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]  
出願状況 ( 計 0 件 )

取得状況 ( 計 0 件 )

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

山内 良兼 (Yoshikane Yamauchi )  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号 : 30445390

### (2) 研究協力者

杉野 隆 (Takashi Sugino )  
静岡県立静岡がんセンター・研究所・研究  
員  
研究者番号 : 90171165

涌井 昌俊 (Masatoshi Wakui )  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号 : 90240465

森 努 (Tsutomu Mori )  
福島県立医科大学・看護学部・准教授  
研究者番号 : 60244373