

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460438

研究課題名(和文) ヒト肺癌におけるAkt/mTORと周辺遺伝子群の解析と個別化治療への展開

研究課題名(英文) Involvement of Akt/mTOR in lung cancer and design of novel therapy targeting them

研究代表者

土橋 洋 (DOBASHI, Yoh)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90231456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌のAktの解析で、i)AKT1,2増幅で変動するmicroRNAをscreeningし、miR-200aは腺癌、早期癌でAKT2により亢進し、リンパ管侵襲と逆相関を示した。このmiR-200aのターゲットはEphA2であった(2017年日本病理学会)。ii)p27-ubiquitin ligase解析では、Pirh2はN因子、pStage、細胞質p27はN因子と相関し、p27の分解制御機構を示した(2016年日本病理学会、Hum. Path.2017)。iii)MLPAのAKT1,2プローブを独自合成し、遺伝子数を定量した結果、腫瘍内不均一性内での遺伝子増幅を同定した(論文準備中)。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the involvement of Akt in lung carcinomas. Results were, i) Microarray analysis revealed 28 miRNAs upregulated in AKT1 or AKT2-amplified carcinomas, including miR-200. Carcinomas with lymph vessel invasion had lower expression of miR-200a/b and in adenocarcinoma and in the early carcinomas, miR-200a was higher in AKT2-amplified group. MiR-200a was significantly correlated with the expression of its target, EphA. ii) Expressions of p27 and ubiquitin ligase Skp2, KPC and Pirh2 were analyzed. Cytoplasmic p27 was correlated with nodal metastasis and, inverse correlation between nuclear-p27 and Pirh2 was observed. Moreover, Pirh2 was correlated with Stage and overall survival. iii) We performed multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis with fluorescence in situ hybridization analysis and immunohistochemistry. By placing modified cutoff values, cases containing fewer cancer cells with gene increase could be picked up by MLPA using custom-made probes.

研究分野：人体病理学

キーワード：肺癌 Akt 遺伝子増幅 microRNA p27 MLPA Ubiquitin ligase

1. 研究開始当初の背景

受容体型チロシンキナーゼ(RTK)をはじめとする癌遺伝子は近年、“分子標的療法”の観点から細胞内分子も含めた遺伝子発現、異常の網羅的解析がなされ、そこに立脚したゲノム創薬は癌研究の大きな柱となった。しかし、多数の分子標的療法剤の中で奏効した抗癌剤は少数という背景があり、我々は原因が実験系とヒト体内の癌の差異や副作用の他、臓器特異性、個体間 heterogeneity による可能性もあると考え、多臓器の腫瘍で RTK を中心に遺伝子増幅、蛋白過剰発現様式、予後との相関等を報告してきた。結果、肺癌、骨軟部肉腫で EGFR 等の遺伝子、蛋白発現異常と下流因子活性化の関連の多様性も見出し、癌症例の更なる細分化の必要性を考えるに到った。一方、我々も含めた国内外の最近の研究で、癌における遺伝子多型、抑制系蛋白の分解亢進、microRNA(miR)の関与も報告され、細胞内エフェクター分子と周辺分子との相互作用の解析も必要とする新しい局面を迎えた。我々は治療プロトコルが確立した特定の癌以外ではこうした多因子を用いた詳細な層別化、個別化が必要と考え、個々の癌の形質(増殖、浸潤、転移、治療抵抗性)を規定する複数の因子の解明を目標とした。今回計画したターゲット因子の培養細胞での機能解析と、ヒト腫瘍材料での解析という“双方向からの制御機構の解明へのアプローチ”はこの分野における研究の王道であるが、Akt を軸とした複数因子の報告はほとんど無い。

2. 研究の目的

多数の基質を有する Akt、その下流の mTOR(mammalian Target of Rapamycin)を中心とし、周辺因子も含めた研究を目的とした。特に研究結果を臨床応用へ近づけるために、Akt/mTOR 系の周辺因子の異常にも注目し、Akt 自体の他、miR、遺伝子多型も解析対象に加え、機能的複合体として同時に解析する。その多因子の解析を行うと同時に、個々の症例ごとに複数の活性化エフェクターを特異的に抑制する多分子標的療法を目指して、Akt/mTOR ネットワークの多様な制御機構を包括的に解析する研究を計画した。

3. 研究の方法

Akt/mTOR の異常、その腫瘍間、腫瘍内 heterogeneity、更に周辺遺伝子の異常、蛋白の発現異常と活性化制御の相互関係を解明するため、

- (1) ヒト肺癌手術材料で Akt-isoform (Akt1-3)の発現、活性化の免疫組織化学的検索と共に、AKT1-3 の遺伝子増加を MLPA(Multiplex ligation dependent Probe Amplification)法と fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法で、腫瘍内 heterogeneity と共に検索し、多型は Illumina 社の CytoSNP チップで解析する。
- (2) アレイ解析で Akt, mTOR と共変動する蛋白、miR を同定し、ヒト肺癌組織で q-RT PCR により validation を行う。
- (3) 得られたターゲット遺伝子を培養細胞で knock-in, knock-out し、形質変化、周辺諸因子の活性化異常を検索する。
- (4) Akt の制御を受ける蛋白、特に p27 の独自の ubiquitin ligase による分解の異常を解析する。
- (5) 以上のデータを総括し、活性化以上のパターンで症例群を細分類し、臨床病理学的プロファイルと対照する。

4. 研究成果

- (1) 既に収集した症例も含む 108 例(全組織型)における免疫組織染色の結果、Akt 過剰発現 (pan-Akt 陽性)は 61%、活性化 (p-Akt 陽性)は 42%、Akt1, Akt2 は 47%, 41%に、Akt3 は 23%に認めた。これらの発現率に組織型、喫煙習慣との統計的有意差は認めなかった。臨床病理学的検索では、p-Akt 陽性群、特に細胞質陽性群、Akt2 発現群では有意にリンパ節転移の頻度が高かった。FISH 法による遺伝子増幅解析では、AKT1 遺伝子は増幅を全症例の 4%に、高レベル polysomy は 8%、AKT2 は増幅を 3%、高レベル polysomy を 11%に認めた。AKT3 遺伝子の増幅例は無く、高レベル polysomy による増加を 10%に認めたが、遺伝子増加と Akt3 蛋白質の発現は一致しなかった。AKT1 遺伝子の増加は腫瘍進展度(pT)と関連した(Can Sci. 2015)。
- (2) 遺伝子増幅の high throughput screening として MLPA 法を用いた。市販の多種の MLPA probe 含有キットを使用し、20 種類の癌関連遺伝子の増減を同時に解析することができた(Hum Pathol 2014, 2017, Paolo

Int 2014, Mod Pathol 2015)。

(3) またこの変法をデザインし、*AKT1*, *AKT2* のカスタムプローブを独自に合成し、遺伝子数を定量解析した。cut-off 値も独自で再設定することで、パラフィン切片上の腫瘍内不均一性を克服できるレベルで遺伝子増幅、polysomy が同定できた。連携研究者である金沢大学のグループと論文投稿準備中である。

(4) CytoSNP チップを用いた多型解析で、*AKT1*-rs2498794 の T-allele は短期間喫煙歴群(44 年未満)、少量喫煙群(<20 本/日)で有意に癌罹患性が低い事を見出した(Biomed. Res. Int. 2015)。

(5) *AKT1*, *AKT2* 遺伝子のみ増加群各 15 例を用い、各群で変動する miR を 2000 種搭載 Human miRNA oligo chip array で解析した。両群間で発現に 2 倍以上の差があり、かつ *AKT* 遺伝子増加の無い群よりも発現の高い miR を 112 種同定し、q-RT PCR による validation を行った。その中で、特に癌の増殖、浸潤、転移等に関わる miR-200a は腺癌、早期の癌(Stage-I, II)では *AKT2* により亢進する、miR-200a, b, c とともにリンパ管侵襲とは負の相関を示すが、血管侵襲とは相関しない(Hum Pathol, 2016, 日本病理学会発表 2015 年)、200a のターゲットの ZEB-1, PTEN, YAP-1, EphA2, b-catenin, E-cadherin の染色スコアを解析した結果、腺癌、Stage I+II 群では EphA2 の発現が *AKT2* 増幅群で有意に低かった。かつ EphA2 スコアと miR200a は逆相関を示し、*AKT2* miR200a の系で 200a のターゲットとして EphA2 の関与が示唆された(2017 年日本病理学会発表、論文準備中)。

(6) Akt の下流に位置する細胞周期制御因子 p27 とその分解系蛋白質の異常、活性化制御の機序を解析した。p27 は Akt にリン酸化を受けうる基質の 1 種であり、同時に独自の ubiquitin ligase により分解を受けるといふ複雑な機序で制御される蛋白質なので、我々は癌細胞の増殖制御という観点から注目していた。肺癌に関しては 2017 年初頭から組織亜系分類が、新 WHO 分類、新肺癌取り扱い規約に準じた分類へ全面的に移行したこともあり、1 年間の研究延長期間を置き、旧分類によるデータを再検した。93 症例(全組織型)の肺癌組織で p27 とその ubiquitin ligase の発現の関連を免疫染色で検索した。Skp2 は扁平上皮癌、小細胞癌で、Pirh2, KPC

は非小細胞癌で発現が高頻度だった。臨床病理学的に腺癌で KPC 発現は T 因子、Pirh2 は pN, pStage と、扁平上皮癌で細胞質 p27 は N 因子と有意な相関を示した。また、Pirh2 は腺癌では予後とも相関し、組織型特異的な p27 制御機構と、ligase の悪性度の規定因子としての有用性が示された。延長期間中に ubiquitin ligase の予後への関与に関して、overall survival に event-free survival 解析結果も加えた詳細な検討を行った(Hum Pathol, 2017, 日本病理学会発表 2016 年)。

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 39 件)

Dobashi, Y., Tsubochi, H., Minegishi, K., Kitagawa, M., Ohtani, S., Ooi, A. Regulation of p27 by ubiquitin ligases and its pathological significance in human lung carcinomas. Hum Pathol 66(8):67-78, 2017. doi: 10.1016/j.humpath.2017.05.022

Ooi, A., Oyama, T., Nakamura, R., Ikeda, H., Fushida, S. and Dobashi, Y. Gene amplification of *CCNE1*, *CCND1* and *CDK6* in gastric cancers detected by multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence *in situ* hybridization. Hum Pathol. 61:58-67, 2017. doi: 10.1016/j.humpath.2016.10.025

Ito T, Matsubara D, Tanaka I, Makiya K, Tanei Z, Kumagai Y, Shiu SJ, Nakaoka H, Ishikawa S, Isagawa T, Morikawa T, Shinozaki A, Goto Y, Nakano T, Tsuchiya T, Tsubochi H, Komura D, Aburatani H, Dobashi Y, Nakajima J, Endo S, Fukayama M, Sekido Y, Niki T and Murakami Y Loss of YAP1 Defines Neuroendocrine Differentiation of Lung Tumors. Can Sci. 107(10):1527-38, 2017. doi: 10.1111/cas.13013.

Goto A, Tanaka M, Yoshida M, Umakoshi M, Nanjo H, Shiraishi K, Saito M, Kohno T, Kuriyama S, Konno H, Imai K, Saito H, Minamiya Y, Maeda D. The low expression of miR-451 predicts a worse prognosis in non-small cell lung cancer cases. PLoS One. 2017 Jul 12;12(7):e0181270. doi: 10.1371/journal.pone.0181270.

Kitagawa M, et al(12 番目) Homeobox transcription factor NKX2-1

promotes *Cyclin D1* transcription in lung adenocarcinomas. *Mol Can Res* 2017 15:1388-97. doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0114.

Goto, A., Dobashi, Y., Tsubochi, H. and Ooi, A. MicroRNAs associated with increased *AKT* gene number in human lung carcinoma. *Hum Pathol.* 2016;56:1-6 doi:10.1016/j.humpath.2016.04.011.

Goto A, et al. (11 番目) Association of variations in HLA class II and other loci with susceptibility to EGFR-mutated lung adenocarcinoma. *Nat Commun.* 2016 9;7:12451. doi:10.1038/ncomms12451.

Goto A, et al. (5 番目) SKAP2 promotes podosome formation to facilitate tumor-associated macrophage infiltration and metastatic progression. *Can Res.* 2016 15;76(2):358-69. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1879.

Kitagawa M, et al. (15 番目) SCF^{Fbxo22}-KDM4A target methylated p53 for degradation and regulate senescence. *Nat. Commun.* 7, 10574, 2016. doi:10.1038/ncomms10574

Kitagawa M, et al (13 番目) UV damage-induced phosphorylation of HBO1 triggers CRL4^{DD2}-mediated degradation to regulate cell proliferation. *Mol. Cell. Biol.* 36:394-406, 2016. doi: 10.1128/MCB.00809-15

Goto A, et al. (6 番目) LPP inhibits collective cell migration during lung cancer dissemination. *Oncogene.* 2016 25;35:952-64. doi:10.1038/onc.2015.155.

Nishizawa, D., Kasai, S., Hasegawa, J., Sato, N., Tanioka, F., Sugimura, H., Ikeda, K. and Dobashi, Y. Association between *AKT1* gene polymorphism rs2498794 and smoking-related traits with reference to cancer susceptibility. *Biomed. Res. Int.* 94:1-12, 2015. doi: 10.1155/2015/316829.

Dobashi, Y., Tsubochi, H., Matsubara, H., Inoue, J., Inazawa, J., Endo, S., Ooi, A. Diverse involvement of isoforms and gene aberrations of Akt in human lung carcinomas. *Cancer Sci.* 106(6):772-781, 2015. doi: 10.1111/cas.12669.

Ooi, A., Oyama, T., Nakamura, R., Tajiri, R., Ikeda, H., Fushida, S., Nakamura, H., Dobashi, Y. Semi-comprehensive analysis of gene amplification in gastric cancers using multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence *in situ* hybridization. *Mod Pathol.* 28(6):861-871, 2015. doi: 10.1038/

modpathol.2015.33.

Kitagawa M, et al (8 番目) Histone H3 lysine 36 tri-methylation is established over the Xist promoter by antisense Tsix transcription and contributes to repressing Xist expression. *Mol. Cell. Biol.* 35, 3909-20, 2015. doi: 10.1128/MCB.00561-15

Kitagawa M, et al (14 番目) Regulation of GATA binding protein 2 levels via ubiquitin-dependent degradation by Fbw7: involvement of cyclin B-cyclin-dependent kinase 1-mediated phosphorylation of Thr176 in GATA binding protein 2. *J Biol Chem* 29:10370-10381, 2015. doi: 10.1074/jbc.M114.613018

Tajiri, R., Inokuchi, M., Sawada-Kitamura, S., Kawashima, H., Nakamura, R., Oyama, T., Dobashi, Y., Ooi, A. Clonal profiling of mixed lobular and ductal carcinoma revealed by multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence *in situ* hybridization. *Pathol. Int.* 64(5):231-6. 2014. doi: 10.1111/pin.12158.

Dobashi, Y., Goto, A., Endo, T., and Ooi, A. Genetic aberrations as the targets of oncology research: Involvement of paraffin-embedded tissues. *Histol. Histopathol.* 29(2):191-205, 2014. doi: 10.14670/HH-29.191

Tajiri, R., Ooi, A., Fujimura, T., Dobashi, Y., Oyama, T., Nakamura, R. and Ikeda, H. Intratumoral heterogeneous amplification of *ERBB2* and subclonal genetic diversity in gastric cancers revealed by multiple ligation-dependent probe amplification and fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Pathol.* 45(4):725-34, 2014. doi: 10.1016/j.humpath.2013.11.004.

Goto A, et al.(13 番目)HPV-associated lung cancers: an international pooled analysis. *Carcinogenesis.* 2014. 35(6):1267-75. doi:10.1093/carcin/bgu038

① Goto A, et al (5 番目) Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma and its significance in epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol.* 2014. 45:1397-405. doi:10.1016/j.humpath.2014.02.013.

② Kitagawa M, et al (8 番目) YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers. *Gene Cell* 19:504-16, 2014. doi: 10.1111/gtc.12150.

③ Kitagawa M, et al (5 番目) Interaction between RB protein and NuMA is required for

proper alignment of spindle microtubules. Genes Cells 19: 89-96, 2014. doi: 10.1111/gtc.12119.

〔学会発表〕(計 13 件)

土橋 洋、後藤 明輝、梶村 春彦、大井 章史. 肺癌で AKT 遺伝子増幅に伴い変動する microRNA とそのターゲット. 第 106 回日本病理学会総会 第 2017 年

大井 章史、土橋 洋. MLPA と FISH を用いた乳癌における遺伝子増幅の準網羅的検索. 第 106 回日本病理学会総会 2017 年

土橋 洋、後藤 明輝、大井 章史. ヒト肺癌における細胞周期抑制因子 p27 の 3 種 ubiquitin ligase による制御. 第 105 回日本病理学会総会 2016 年

大井 章史、土橋 洋. 胃癌におけるサイクリン E, D1, CDK6 増幅の MLPA および FISH による検索. 第 105 回日本病理学会総会 2016 年

大井 章史、土橋 洋. 胃癌における MLP と FISH 法による CCND1, CCND1, CDK6 遺伝子増幅の解析. 第 75 回日本癌学会総会 2016 年.

大井 章史、土橋 洋. MLPA と FISH を用いた進行胃癌における遺伝子増幅の準網羅的検索. 第 104 回日本病理学会総会 2015 年

土橋 洋、後藤 明輝、梶村 春彦、大井 章史. 肺癌で AKT 遺伝子増幅に伴い変動する microRNA とその意義. 第 104 回日本病理学会総会 2015 年

松原 大祐、土橋 洋. 肺癌における YAP1 欠如と神経内分泌分化について. 第 74 回日本癌学会総会 2015 年

土橋 洋、後藤 明輝、大井 章史. AKT increase and associated change in microRNA expression in human lung carcinomas. 第 74 回日本癌学会総会 2015 年

大井 章史、土橋 洋. MLPA と FISH を用いた胃癌における増幅遺伝子の準網羅的検索. 第 73 回日本癌学会総会 2014 年

土橋 洋、梶村 春彦、大井 章史. ヒト肺癌における AKT 遺伝子、蛋白質の異常とその意義. 第 103 回日本病理学会総会 2014 年

大井 章史、土橋 洋. MLPA と FISH を用いた胃癌における遺伝子増幅の準網羅的検索. 第 103 回日本病理学会総会 2014 年

土橋 洋、坪地 宏嘉、大井 章史. Significance of Akt activation and AKT gene increases in bone and soft tissue tumors. 第 73 回日本癌学会総会 2014 年

〔図書〕(計 1 件)

土橋 洋. 細胞傷害と細胞増殖 笹野

公伸, 岡田 保, 安井 弥編 シンプル病理学(第 7 版) 東京 南江堂 2015 年 5-19 頁.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土橋 洋 (DOBASHI, Yoh)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 90231456

(2) 研究分担者

坪地 宏嘉 (TSUBOCHI, Hiroyoshi)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50406055

北川 雅敏 (KITAGAWA, Masatoshi)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50294971

後藤 明輝 (GOTO, Akiteru)
秋田大学・医学部・教授
研究者番号: 90317090

(3) 連携研究者

大井 章史 (OOI, Akishi)
金沢大学・医学部・教授
研究者番号: 50160411

梶村 春彦 (SUGIMURA, Haruhiko)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00196742

松原 寛知 (MATSUBARA, Hirochika)
山梨大学・医学部・講師
研究者番号: 00374166