

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461180

研究課題名(和文) アスベスト関連腫瘍における新規アクチン結合蛋白質を介した新たな発癌機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of asbestos-induced carcinogenesis via actin-binding protein, p116Rip.

研究代表者

古賀 康彦 (YASUHIKO, KOGA)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10533862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：p116Ripはアクチンやミオシンなどのモーター分子に結合するタンパク質で細胞の走化性に大きく関わっているが、未だ不明な点が多い。アスベストは、全身の様々な臓器に集積し発癌に関わっていることが知られているが、その体内での移動や発癌のメカニズムもまたよくわかっていない。本研究では、アスベスト結合蛋白質のアクチンに着目し、アクチン結合蛋白質であるp116Ripの特異的抗体を用いて、アスベスト関連肺腫瘍でp116Ripと吸入分子との局在一致を確認した。さらにアクチンやその他の上皮間葉移行マーカーとの局在の相同性も認められ、p116Ripがアスベスト関連肺腫瘍に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that p116Rip has an ability to interact with cytoskeletal molecules such as myosin, actin, and myosin phosphatase, suggesting that p116Rip affects cell motility. However, the role of p116Rip has not been investigated well. In this study, we focused on the actin which binding to asbestos in vitro and on the role of p116Rip interacting with actin. We investigated the localization of p116Rip in lung tissues in patients with asbestos exposure and clarified the co-localization of p116Rip with EMT markers such as vimentin,  $\beta$ -catenin, and  $\alpha$ -smooth muscle actin. The results suggested that p116Rip has an interaction with EMT markers and plays a role of asbestos-induced carcinogenesis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：非閉塞性肺疾患 肺線維症 呼吸器感染症

### 1. 研究開始当初の背景

アスベストによる肺疾患の発症までには暴露から数十年かかると言われており、アスベストの輸入量が1974年にピークであった事を考慮すると今後、さらにアスベスト関連肺疾患数が増加していく事が懸念されている。アスベスト肺癌の発症要因として癌抑制遺伝子の異常や上皮間葉移行(Epithelial-mesenchymal transition:EMT)への影響などの報告があるが、未だに不明な点が多い。また、アスベスト関連肺癌の発症には、肺の腺維化が発癌メカニズムに重要であると考えられている一方で、アスベスト自体が肺癌発生に重要であるとの報告もある。アスベスト結合能を有するタンパク質の研究では、in vivoにおいてアスベストの肺胞上皮から間質への移動に際してアクチンフィラメントが重要とされており、近年、アスベスト繊維に特異的に吸着するタンパク質としてアクチンの結合能が高いことがわかっている。またアクチンは、数多くの結合タンパク質を有している事が知られており本稿では、アクチン結合能のあるp116Ripに着目したアスベスト関連肺腫瘍の研究について検討を行った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的はアスベスト関連肺腫瘍におけるp116Ripの関わりを見いだすことである。本研究にあたり、p116Ripの有用な特異的抗体が存在しないために免疫組織学的検討に使用可能な抗体を作製し、それらを用いることによって生体内でのp116Ripの局在を明らかにしていく。さらに、アクチンやその他のEMTマーカーとの局在比較を行い、p116RipとEMTとの関連性についても検討を行う。これらの検討により、p116Ripの生体内での役割の解明を目的とする。

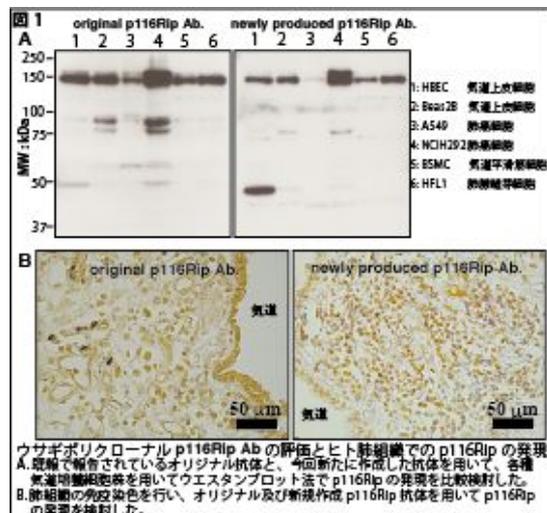
### 3. 研究の方法

#### 1) In-air micro particle-induced X-ray emission: In-air micro PIXE

肺切除検体のパラフィン切片を厚さ15 $\mu$ mのスライスに切り、厚さ5 $\mu$ mのポリカーボネートフィルムに載せて、パラフィン切片側が大気中、ポリカーボネート膜側が真空中になるように、イオンマイクロビーム照射装置にセットした。真空側からポリカーボネートの膜を通してイオンマイクロビームをパラフィン切片に照射し、特性X線を検出することで、パラフィン切片内の元素分布・濃度(Mg; マグネシウム, Si; ケイ素, Al; アルミニウム, P; リン, S; 硫黄, Cu; 銅, Fe; 鉄, Cl; 塩素, Zn; 亜鉛)を測定した。

#### 2) 特異的 p116Rip ポリクローナル抗体の作成

ヒトp116RipのC末端のペプチドシーケンス(KSKSNPDFLKKDRSCVTRQLRN, amino acids 988-1009)に対するポリクローナル抗体を外部委託(Medical&Biological Laboratories:MBL社)して作成し affinity purifyを行った。ヒト肺細胞株を用いたウエスタンブロット法による検討では、非特異的なバンドをほとんど認めずに気道上皮細胞、肺癌細胞、気道平滑筋細胞、肺線維



ウサギポリクローナル p116Rip Ab の評価とヒト肺組織での p116Rip の発現  
 A. 産卵で報告されているオリジナル抗体と、今回新たに作成した抗体を用いて、各種  
 気道平滑筋細胞株を用いてウエスタンブロット法で p116Rip の発現を比較検討した。  
 B. 肺組織の免疫染色を行い、オリジナル及び新規作成 p116Rip 抗体を用いて p116Rip  
 の発現を検討した。

芽細胞において p116Rip の発現を認め、特異性に優れている抗体作成に成功した(図 1A)。また、肺組織を用いた免疫組織学的検討では、気道上皮、気道粘膜下の平滑筋、線維芽細胞組織にも p116Rip の発現が認められ(図 1B)、ヒト肺組織での p116Rip の発現はウエスタンブロットの p116Rip の発現に合致した結果であった。

### 3) 肺切除標本の免疫組織染色

10 $\mu$ m スライスのパラフィン標本を 30 分間 60 °C で脱パラフィン化し、室温で 30 分間 0.3%過酸化水素入りの 100%メタノールで内在性ペルオキシダーゼ活性阻害処理を行った。段階的な一連のエタノールによる再水和の後、抗原賦活化を 30 分間 98-100 °C で ImmunoSaver 抗原レトリバ・システム(電子 Microscopic Sciences、Hattsfeld、PA、USA)を用いて行った。パラフィンセクションの非特異性の結合部位のタンパク質ブロッキングを無血清試薬(ダコ、Carpinteria、CA、USA)を 30 min 室温で incubation することで行いその後、1 次抗体を 4 °C で一晩、1:100 希釈(anti CD163 Ab:Novocastra) 1:400 希釈(anti SMA Ab:Dako、anti Vimentin Ab/anti -catenin Ab:Cell Signaling Technology)を用いて incubation を行った。

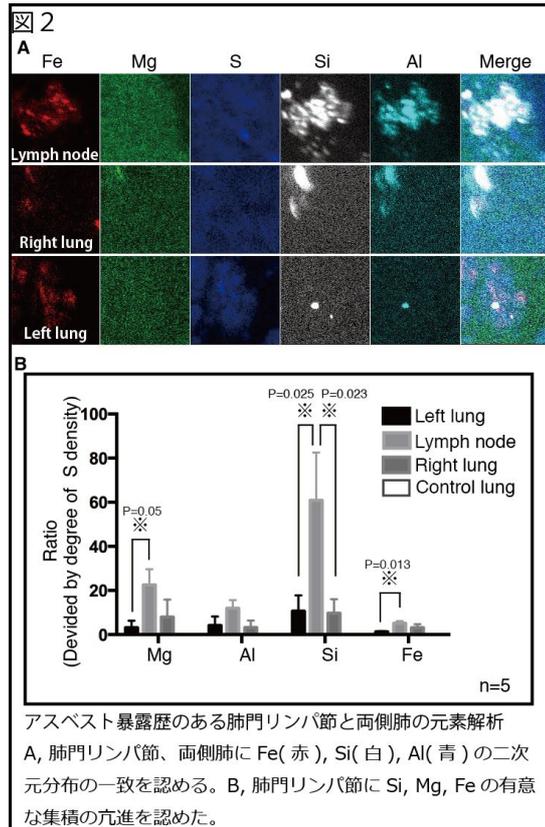
Histofine Simple Stain MAX PO キット(ニチレイ Biosciences)を用いて抗原の視覚化を行った。

## 4. 研究成果

### 1 In-air micro PIXE 解析による生体内での吸入分子の移動メカニズム

In-air micro particle-induced X-ray emission(In-air micro PIXE)は、微量な肺組織にイオンビームを照射して発生した特性 X 線を検出し、組織中の重金属含有とそれらの二次元分布の解析を可能とする極めて高感度の元素解析である。In-air micro PIXE 解析で

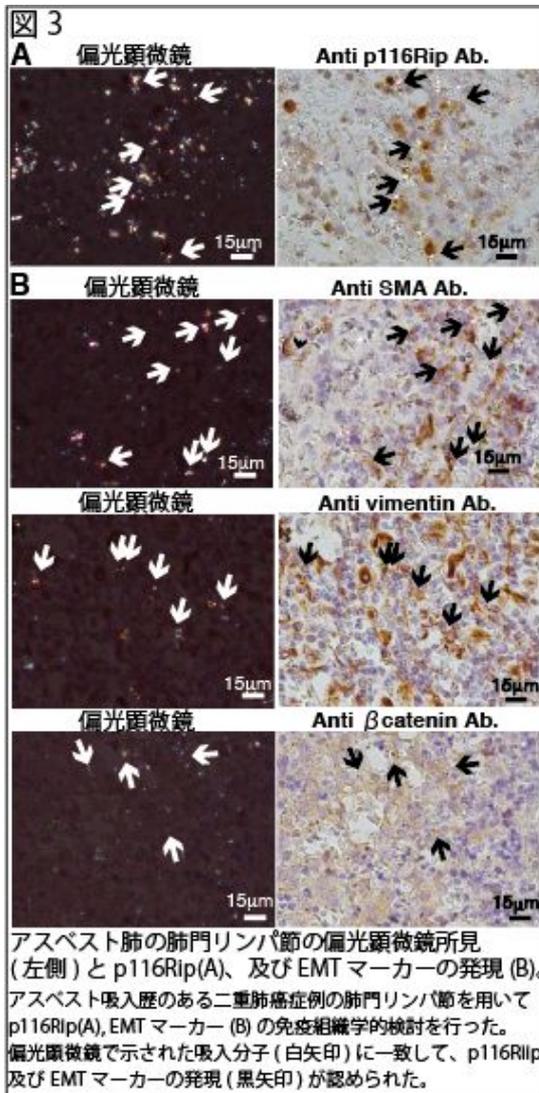
は、アルミニウム暴露歴のあるアルミニウム肺の同定も可能であり、アスベスト暴露歴があり二重肺癌を発症した肺と肺門部リンパ節を用いた in-air micro PIXE による吸入元素解析で、肺門部リンパ節においてシリカ、マグネシウム、アルミニウムなどの吸入元素が高濃度に集積していた(図 2)。



アスベスト暴露歴のある肺門リンパ節と両側肺の元素解析 A, 肺門リンパ節、両側肺に Fe(赤), Si(白), Al(青)の二次元分布の一致を認める。B, 肺門リンパ節に Si, Mg, Fe の有意な集積の亢進を認めた。

### 2 アスベスト関連肺腫瘍における p116Rip と EMT との関わり

アスベスト暴露歴があり二重肺癌を発症した肺と肺門部リンパ節の元素解析で用いた同じパラフィン切片を用いた p116Rip の免疫組織学的検討では、p116Rip が肺門部リンパ節にも有意に集積し、偏光顕微鏡で指摘できる吸入分子と共存して発現していることが示された(図 3A)。また、EMT マーカーの免疫染色においても、偏光顕微鏡で指摘できる吸入分子の周囲に p116Rip の発現と同様に SMA, vimentin, -catenin の発現が認められ(図 3B)、生体内での吸入元素のリンパ節への移動に p116Rip が EMT と関連して関わっていること

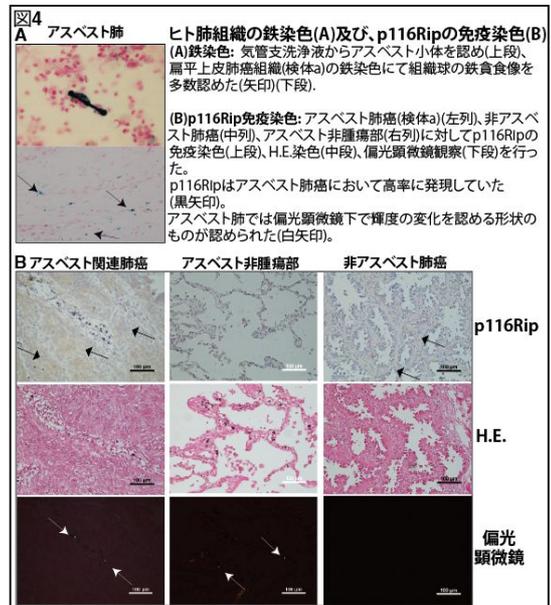


が示唆された。

また、気管支洗浄液検査にてアスベスト小体を認めたアスベスト関連肺癌 (図 4A) の p116Rip の免疫組織学的検討では、アスベスト吸入歴のある肺癌組織において、非アスベスト肺癌と比し、p116Rip の発現の亢進が認められ (図 4B、上段左側、黒矢印)、アスベスト関連肺腫瘍と p116Rip との関連性が示された。

以上の結果をふまえて、ヒトアスベスト関連肺腫瘍においてアクチン及び、ミオシン結合タンパクである p116Rip が生体内での吸入分子の移動及び、肺癌の発生に EMT と共に関わっていることが示唆された。

本研究において、ウエスタンブロットやヒ



トの組織を用いた免疫組織学的検査に有用であるウサギポリクローナル p116Rip 特異的抗体を新規に作成することに成功した。また、p116Rip 特異的抗体を用いたヒト肺組織中の p116Rip の局在の検討では、アスベスト関連肺腫瘍において EMT 関連マーカーと p116Rip との関与を示唆する結果が示された。今後、症例数を積み重ねることによりさらなる p116Rip の機能解析が進み、p116Rip の生体における役割が明らかになっていくことが期待される。

#### 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10件)

1. Elemental and immunohistochemical analysis of the lungs and hilar lymph node in a patient with asbestos exposure, a pilot study. Koga Y, Satoh T, Kaira K, Koka M, Hisada T, Hirato J, Altan B, Yatomi M, Ono A, Kamide Y, Shimizu Y, Aoki-Saito H, Tsurumaki H, Shimizu K, Mogi A, Ishizuka T, Yamada M, Dobashi K. Environ Health Prev Med. 2016 Nov;21(6):492-500 査読:有り。

2. CREB regulates TNF- $\alpha$ -induced GM-CSF secretion via p38 MAPK in human lung fibroblasts. Koga Y, Hisada T, Ishizuka T, Utsugi M, Ono A, Yatomi M, Kamide Y, Aoki-Saito H, Tsurumaki H, Dobashi K, Yamada M. Allergol Int. 2016 Oct;65(4):406-413. 査読:有り。

3. Phase I dose escalation study of amrubicin plus paclitaxel in previously treated advanced non-small cell lung cancer. Kaira, Kyoichi; Sunaga, Noriaki; Imai, Hisao; Kamide, Yosuke; Koga, Yasuhiko; Ono, Akihiro; Kuwako, Tomohito; Masuda, Tomomi; Hisada, Takeshi; Ishizuka, Tamotsu; Yamada, Masanobu. *Int J Clin Oncol.* 2016 Apr;21(2):240-7. 査読:有り.

4. Reversible Hypopituitarism Associated with Intravascular Large B-Cell Lymphoma: Case Report of Successful Immunochemotherapy. Sawada Y, Ishii S, Koga Y, Tomizawa T, Matsui A, Tomaru T, Ozawa A, Shibusawa N, Satoh T, Shimizu H, Hirato J, Yamada M. *Tohoku J Exp Med.* 2016;238(3):197-203. 査読:有り.

5. 17(R)-resolvin D1 ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Yatomi M, Hisada T, Ishizuka T, Koga Y, Ono A, Kamide Y, Seki K, Aoki-Saito H, Tsurumaki H, Sunaga N, Kaira K, Dobashi K, Yamada M, Okajima F. *Physiol Rep.* 2015 Dec;3(12). pii: e12628. doi: 10.14814/phy2.12628. 査読:有り

6. Hydroxyurea-induced Pneumonitis in a Patient with Chronic Myelomonocytic Leukemia: An Autopsy Case. Imai H, Matsumura N, Yamazaki Y, Kanayama Y, Masuda T, Kuwako T, Kamide Y, Tomizawa T, Matsumoto S, Mitsui T, Kaira K, Ono A, Koga Y, Shibusawa N, Sunaga N, Hisada T, Yokoo H, Yamada M. *Intern Med.* 2015;54(24):3171-6. 査読:有り.

7. Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Rearrangement-positive Lung Cancer with Transformation to Pleomorphic Carcinoma. Kamide Y, Kaira K, Watanabe T, Kuribayashi S, Ozawa A, Koga Y, Ono A, Sunaga N, Hisada T, Oyama T, Yamada M. *Intern Med.* 2015;54(22):2905-9..54.4987. 2015 Nov 15. 査読:有り.

8. Pulmonary Aluminosis Diagnosed with In-air Microparticle Induced X-ray Emission Analysis of Particles. Chino, Haruka; Hagiwara, Eri; Sugisaki, Midori; Baba, Tomonori; Koga, Yasuhiko; Hisada, Takeshi; Kaira, Kyoichi; Okudela, Koji; Takemura, Tamiko; Dobashi, Kunio; Ogura, Takashi. *Internal medicine* 2015;54(16):2035-40. 査読:有り.

9. Acidic environment augments FcεRI-mediated production of IL-6 and IL-13 in mast cells. Kamide, Yosuke; Ishizuka, Tamotsu; Tobo, Masayuki; Tsurumaki, Hiroaki; Aoki, Haruka; Mogi, Chihiro; Nakakura, Takashi; Yatomi, Masakiyo; Ono, Akihiro; Koga, Yasuhiko; Sato, Koichi; Hisada, Takeshi; Dobashi, Kunio; Yamada, Masanobu; Okajima, Fumikazu *Biochemical and biophysical research communications* 2015 Aug 28;464(3):949-55. 査読:有り.

10. Safety and efficacy of high-dose leukocytapheresis in patients with refractory

asthma. Ishizuka T, Hisada T, Hatori M, Koike A, Hanabuchi K, Matsuzaki S, Kamide Y, Utsugi M, Aoki H, Yoshino R, Yanagitani N, Koga Y, Ono A, Kaira K, Sunaga N, Dobashi K, Tsuburai T, Akiyama K, Yamada M, Suzuki K, Mori M. *Inflamm Res.* 2014 Sep;63(9):789-96. Epub 2014 Jul 8. 査読:有り.

〔学会発表〕(計 16 件;国際学会 4 件,国内学会 12 件)

〔国際学会〕

1) Y.Koga, K.Uchiyama, N.Tsukamoto, N.Shibusawa, A.Jingu, M.Utsugi, S.Kakizaki, J.Hirato, K.Dobashi, T.Hisada, M.Yamada. Primary Sjogren's syndrome presenting unilateral bloody pleural effusion complicated with Waldenstrom's macroglobulinemia. 6th Conference of International Union Against Tuberculosis and Lung Disease Asia Pacific Region (APRC). Japan, Tokyo, 2017.03.24 (Fri) (Poster)

2) Y.Koga, T.Satoh, K.Kaira, M.Koka, Y.Hachisu, T.Hisada, A.Ono, Y.Shimizu, T.Maeno, K.Shimizu,A.Mogi, T.Ishizuka, M.Yamada, K.Dobashi. Inhaled Inorganic Elemental Analysis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis by In-air Microparticle Induced X-ray Emission Analysis. American Thoracic Society Conference (ATS) 2016, San Francisco, CA, U.S.A., San Francisco Moscone Center. 2016.05.15(Sun). (Poster).

3) Y. Koga, K. Dobashi, K. Kaira, T. Satoh, M. Koka, N. Yamada, T. Hisada, M. Yatomi, A. Ono, Y. Kamide, K. Seki, H. Aoki, H. Tsurumaki, M. Yamada. In-air microparticle induced X-ray emission analysis of inhaled particulates in thoracic lymph node in a patient with asbestos exposure American Thoracic Society Conference (ATS2015), Denver, CL, U.S.A., Colorado convention center. 2015.05.18(Mon) . (Poster).

4) Y. KOGA, K. Dobashi, Y. Shimizu, S. Matsuzaki, K. Kaira, M. Fueki, T. Hisada, K. Okudera, M. Sugisaki, T. Ogura, M. Yamada. The efficacy of in-air microanalysis of particles in interstitial pneumonia lung tissue in patients with or without occupational exposure. American Thoracic Society Conference (ATS2014), San Diego, CA, U.S.A., San Diego convention center. 2014.05.19(mon). (Poster).

〔国内学会〕

1) 古賀康彦, 解良恭一, Bolag Altan, 久田剛志, 土橋邦生, 佐藤隆博, 山田尚人, アスベスト暴露患者の肺及び肺門リンパ節を用いた元素解析と免疫組織学的検討, QST高崎研シンポジウム, 2017.1.26、高崎量子応用研究所

2) Y. Koga, T. Satoh, K. Kaira, M. Koka, T. Hisada, M. Yatomi, A. Ono, Y. Kamide, Y. Shimizu, H. Aoki-Saito, H. Tsurumaki, T.

Ishizuka, M. Yamada, K. Dobashi. Elemental and immunohistochemical analysis of the lung and hilar lymph node in a patient with asbestos exposure. Japanese Respiratory Society, 2016.4.10 京都国際会館

3) Y.Koga, T.Hisada, T.Ishizuka, M.Utsugi, A.Ono, M.Yatomi, Y.Kamide, H.Aoki-Saito, H.Tsurumaki, Y.Hachisu, Y.Saito, T.Maeno, K.Dobashi, M.Yamada. The opposite effect of p38 MAP kinase and cAMP-elevating agents, Roflumilast and Rolipram, in the GM-CSF secretion from human lung fibroblasts. Japanese Society of Allergology 2016.6.18 (Sat), 東京国際フォーラム

4) 古賀康彦, 佐藤隆博, 解良恭一, 江夏昌志, 蜂巣克昌, 久田剛志, 矢富正清, 小野昭浩, 清水泰生, 青木悠, 鶴巻寛朗, 石塚全, 前野敏孝, 清水公裕, 茂木晃, 山田正信, 土橋邦生. 特発性肺線維症患者における予後予測因子としての肺内吸入元素の検討. 日本職業・環境アレルギー学会 2016.7.9、近畿大学

5) 古賀康彦, 佐藤隆博, 解良恭一, 江夏昌志, 久田剛志, 矢富正清, 小野昭浩, 上出庸介, 清水泰生, 青木悠, 鶴巻寛朗, 石塚全, 山田正信, 土橋邦生. アスベスト暴露患者の肺内リンパ節を用いた大気マイクロPIXEの元素解析と免疫組織学的検討. PIXE シンポジウム 2015.10.30、高崎量子応用研究所

6) 古賀康彦, 佐藤隆博, 解良恭一, 江夏昌志, 久田剛志, 矢富正清, 小野昭浩, 上出庸介, 清水泰生, 青木悠, 鶴巻寛朗, 石塚全, 山田正信, 土橋邦生. 大気マイクロPIXEによるアスベスト暴露患者の肺内リンパ節の元素解析と免疫組織学的検討. 高崎量子応用研究シンポジウム 2015.10.9、高崎量子応用研究所

7) 古賀康彦, 土橋邦生, 解良恭一, 佐藤隆博, 江夏昌志, 山田尚人, 喜多村茜, 横山彰人, 大久保 猛, 石井保行, 久田剛志, 矢富正清, 小野昭浩, 青木悠, 鶴巻寛朗, 石塚全, 山田正信. In-air micro-PIXEによるアスベスト暴露患者の肺内リンパ節の元素解析. 日本職業・環境アレルギー学会 2015.7.3、東京大学伊藤国際学術研究センター

8) 古賀 康彦、 矢富正清、 上出庸介、 関香織、 青木悠、 鶴巻寛朗、 小野昭浩、 今井久雄、 砂長則明、 久田剛志、 石塚全、 土橋邦生、 山田正信. Effect of p116Rip protein on the TNF -induced GM-CSF secretion in human pulmonary cells. 第64回日本アレルギー学会、2014.05.27、グランドプリンスホテル 新高輪

9) 古賀 康彦、 矢富正清、 上出庸介、 関香

織、青木悠、鶴巻寛朗、解良恭一、小野昭浩、砂長則明、久田剛志、桑子智人、増田友美、石塚全、土橋邦生、山田正信. Effect of p116Rip elimination on the PDGF-induced cell migration. 第55回 日本呼吸器学会、2015.4.25、東京国際フォーラム

10) 古賀 康彦、土橋 邦生、解良 恭一、佐藤隆博、松崎 晋一、久田 剛志、奥寺康司、杉崎 緑、小倉 高志、山田 正信. The efficacy of in-air microanalysis of particles in interstitial pneumonia lung tissue. 第9回高崎量子応用研究シンポジウム、2014.10.10、高崎量子応用研究所

11) 古賀 康彦、矢富正清、上出庸介、関香織、青木悠、鶴巻寛朗、西岡正樹、解良恭一、笠原礼充、小野昭浩、砂長則明、久田剛志、石塚全、土橋邦生、山田正信. p116Rip proteinの気道培養細胞での炎症性サイトカイン分泌に及ぼす影響について. 第26回日本アレルギー学会、2014.05.10、国立京都国際会館

12) 古賀 康彦、矢富正清、上出庸介、関香織、青木悠、鶴巻寛朗、西岡正樹、解良恭一、小野昭浩、砂長則明、久田剛志、石塚全、土橋邦生、山田正信. Effect of p116Rip protein on the cytokine secretion in human pulmonary cells. 第54回 日本呼吸器学会、2014.4.25、大阪国際会議場

〔図書〕(計1件)

土橋邦生、古賀康彦ら. 職業性アレルギー疾患診療ガイドライン2016 作製委員会. 職業性アレルギー疾患診療ガイドライン 2016. 協和企画.

〔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

古賀 康彦 (KOGA YASUHIKO)

群馬大学・医学部・医員

研究者番号：10533862

### (2) 研究分担者

研究者番号：

### (3) 連携研究者

解良 恭一 (KAIRA KYOICHI)

群馬大学・医学部・教授

研究者番号：40400783

土橋 邦生 (DOBASHI KUNIO)

群馬大学・保健学科・教授

研究者番号：00241894