

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590692

研究課題名(和文)悪性中皮腫におけるATBF1の細胞内動態解析と癌幹細胞マーカー発現の有無

研究課題名(英文)Analysis of ATBF1 expression in malignant mesothelioma with reference to its intracellular behavior and association with cancer stem cells

研究代表者

湊 宏(MINATO, Hiroshi)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：10293367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫における、癌抑制遺伝子ATBF1の発現を、各種ATBF1抗体を用いて解析した。D1-120抗体を用いた結果では、高悪性度であるほど核内の発現が低下し、細胞質での発現が増加し、細胞質での発現の増加は予後と関連した。一方、MB034抗体を用いた解析では、中皮腫で核内にドット状に陽性となり、反応性中皮では陰性であり、良悪の鑑別に有用なマーカーと考えられた。これらの結果より、中皮腫ではATBF1は悪性化に伴って発現が増加するが、核内から細胞質内に連続性に存在するか、細胞内で分断されて存在している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed expression of ATBF1 protein in malignant mesothelioma and reactive mesothelial cells. Using anti-D1-120 antibody, ATBF1 expressed less frequently in the nuclei of malignant mesotheliomas, and significantly increased its expression in the cytoplasm. The cytoplasmic expression significantly correlated with the prognosis of malignant mesothelioma. Using anti-MB043 antibody, ATBF1 expressed with large dots in the nuclei of malignant mesothelial cells, whereas did not stained in the reactive mesothelial cells, thus MB043 is considered to be a useful marker for differentiating between malignant and benign mesothelial cells. The results indicate that expression of ATBF1 increases in malignant mesothelioma, but its localization probably changes in the tumor cells. ATBF1 may exist through the nucleus to the cytoplasm, or may be segmented in the nucleus and the cytoplasm.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学、病態検査学

キーワード：悪性中皮腫 癌抑制遺伝子 ATBF1 癌幹細胞 免疫組織化学 細胞内局在

## 1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫(以下中皮腫)は平均生存期間が1-2年という非常に悪性度の高い腫瘍である。アスベストの使用歴により、今後40年間にわたり日本では中皮腫患者が増加しつづけることは確実で、その死亡数は10万人を超えると予想されている。中皮腫の腫瘍発生には長い年月が必要であることから多数の遺伝子異常が蓄積し癌化のプロセスをたどると推測されている。しかし、その早期の発生病態に関してほとんど解明されていない。

AT motif binding factor-1 (ATBF1)は、当初胎児性蛋白(AFP)の転写を抑制する大きな転写抑制因子として発見されたが、その後その転写抑制機能はp53による転写調節機能と深い関係があることが明らかとなった。ATBF1とp53は協調的にp21遺伝子を活性化し、増殖制御に関わることが明らかとなっている。ATBF1遺伝子は16番染色体に存在し、前立腺癌例の約4割で遺伝子変異が認められた。さらにATBF1は胃癌、乳癌、膀胱癌などに共通して感度の高い臨床的予後決定因子であり、新しい癌抑制遺伝子であることが証明された。しかし、マウス胚細胞性腫瘍株であるP19の神経分化誘導系ではATBF1が発現しても細胞周期が停止しないという矛盾する現象が認められる。その理由として抗ATBF1抗体を用いた検討によりP19細胞ではATBF1は細胞質に留まり、核内に存在していないことが判明した。すなわちATBF1が転写調節因子として機能するには核でDNAに結合する必要があると思われる。

## 2. 研究の目的

我々はこれまで2種のヒト中皮腫培養株においてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い、ATBF1遺伝子の存在を確認した。また患者より得られた中皮腫の病理組織標本を対象に抗ATBF1抗体を用いた免疫組織化学を行ったところ、多くの腫瘍細胞では細胞質に染色されるが、一部の症例では胸膜面に存在する非浸潤性の腫瘍細胞で核にのみ陽性像が認められた。また正常の胸膜中皮には通常陰性で、過形成を示す症例で核に陽性所見を示すものが認められた。これらの結果よりATBF1の発現及び細胞質内局在が中皮腫の発生・浸潤と何らかの関係がある可能性があると考えられた。また細胞間で染色強度の異なる場合や核と細胞質がともに陽性となる細胞が存在することも判明した。これらの結果をもとに以下の研究を目的とした。

### (1) ATBF1の細胞内局在および断片化の解析とその機能

最近、三浦らが作成した多種類のATBF1抗体を用いて、中皮や中皮腫細胞において酵素・蛍光抗体法を用い、ATBF1の細胞内局在とその断片化の有無を探る。組織型と染色性の違い、浸潤の有無による違いを解析する。

さらに癌幹細胞マーカーとして用いられているCD133/ABCG2/Bmi-1/OCT-4/uPARなどの発現とATBF1の発現・局在との関連も探る。

### (2) ATBF1mRNA発現量と形態像

中皮腫細胞と良性の中皮細胞にてATBF1メッセンジャー-RNA(mRNA)量の相違を解析し、酵素・蛍光抗体法の結果と比較分析する。可能であれば、中皮腫細胞株にはATBF1の低分子干渉RNA(siRNA)を投与し、細胞形態の変化を観察し、ATBF1の腫瘍における役割を解析する。

### (3) 酵素抗体法や蛍光色素標識ハイブリダイゼーション(FISH)法を用いて、他の癌抑制遺伝子とATBF1との関連性を探る。

## 3. 研究の方法

### (1) ATBF1の各種抗体を用いた免疫組織化学

ATBF1の各種抗体MB039、MB043、MB047、MB049等を用い、中皮腫と反応性中皮におけるATBF1の細胞内局在を観察する。MB039は最もN末端側に近く、MB049はC末端側に近い蛋白部分を認識するように作成されたものである。MB043は蛋白中央部分に近く、MB047はMB043とMB049の中間的な位置の蛋白を認識する。

### (2) 中皮腫における癌幹細胞マーカーの探索

CD133/ABCG2/Bmi-1/OCT-4/uPARなど癌幹細胞マーカーの発現解析とATBF1発現との関係を解析する。中皮腫と反応性中皮において、他臓器で癌幹細胞マーカーとして示唆されている種々のマーカーを用いて、中皮腫及び反応性中皮症例の免疫組織化学を行い、中皮腫での癌幹細胞マーカーを探索する。またそれらの結果とATBF1の染色性を比較する。

### (3) リアルタイムPCR法(RT-PCR)を用いたATBF1 mRNAの定量

中皮腫細胞株においてRT-PCRによりATBF1mRNAの定量を行う。また各種抗体を用いたWB法を施行し、RT-PCRの結果と比較検討する。

### (4) 他の癌抑制遺伝子とATBF1との関連

中皮腫培養株や手術材料を用いてp16、p21、p14等の癌抑制遺伝子の異常をFISHにより解析し、その欠失とATBF1の発現との関連性を検討する。可能であれば、DNAメチル化解析も行う。

## 4. 研究成果

癌抑制遺伝子ATBF1の細胞内局在と、中皮腫の発生・浸潤との関連性を検索する目的で、ATBF1蛋白のそれぞれ別部位を認識する複数の抗体で免疫染色を行った。

### (1) 各種ATBF1抗体を用いての中皮腫における免疫組織化学

手術剖検検体からそれぞれ約 20 例ずつの中皮腫症例と反応性中皮を抽出対象とし、各種 ATBF1 抗体の免疫組織化学を行った。

中皮腫では、MB039: 細胞質 > 核 8/23(35%)、核 > 細胞質 9/23(39%)、細胞質のみ 6/23(26%) で、MB043: 細胞質 > 核 5/24(21%)、核 > 細胞質 14/24(58%)、細胞質のみ 5/24(21%)、MB047: 細胞質 > 核 5/22(23%)、細胞質のみ 17/22(77%)、MB049: 細胞質のみ 22/22(100%) であった。反応性中皮では、MB039: 細胞質 > 核 5/15(33%)、核 > 細胞質 4/15(27%)、細胞質のみ 6/15(40%) で、MB043: 核のみ 15/18(83%)、核 > 細胞質 3/18(17%)、MB047: 細胞質 > 核 2/10(20%)、細胞質のみ 8/10(80%)、MB049: 細胞質のみ 10/10(100%) であった。MB049 がすべて細胞質に陽性を示し、中央部分の MB043 が最も高率に核内陽性像を示した。反応性中皮では MB043 が細胞質優位を示すものや細胞質のみに陽性を示すものはみられなかった。MB039 と MB043 の局在は一致する例が多かったが、MB039 がむしろ細胞質内陽性像が優位な症例がみられた。反応性中皮の染色性は、全体的に中皮腫症例より弱かった。

さらに、ATBF1 の別部位を認識する新規 ATBF1 抗体 MB034 と MB044 を用いて免疫組織化学を行った所、興味深い結果が得られた。MB034 では中皮腫の 22 例中 1 例を除き、すべての症例で核内にドット状の強い陽性像が認められた。反応性中皮 20 例ではほとんど染色されなかった。また MB044 では、中皮腫 22 例中 20 例で、核内にびまん性に強い陽性像が認められ、細胞質により弱い染色性が認められた。反応性中皮では、20 例のいずれも核と細胞質に弱い染色性が認められるのみであった。

これらの結果より、中皮腫と反応性中皮との間には ATBF1 の発現量および細胞内局在に明らかに違いがあると考えられた。MB034 がドット状に染色された理由は明らかでない。ドットは核小体の形状に類似していることから、ATBF1 は部分的に核小体に結合し、悪性腫瘍において何らかの機能を果たしている可能性がある。ATBF1 の中皮腫細胞での存在形式としては(i)核内から細胞質にかけて存在する、あるいは(ii)断片化し、核内に存在する部分と細胞質内に存在する部分がある、等の可能性が考えられる。さらに、今回の研究より、MB034 が中皮腫と反応性中皮との鑑別に有用である可能性が示された。

(2) 中皮腫と反応性中皮における ATBF1 の発現の違い、及び中皮腫における ATBF1 発現と悪性度との関連性

中皮腫 34 例と、反応性中皮 37 例の外科材料に対して、抗 ATBF1 抗体(D1-120)を用い免疫染色を施行した。染色の評価は、核・細胞質における染色強度をそれぞれ陰性=0~強陽性=3 の 4 段階に分け、陽性細胞の割合(%)と染色強度をかけた値を免疫染色指標とした。反応性中皮での核内染色指標は、160 ±

31 (中央値 ± 四分位偏差)で、中皮腫での核内染色指標は 95 ± 60 であり、中皮腫では有意に核内の染色性が低下した(p 値<0.01)。細胞質の免疫染色指標は反応性中皮で 20 ± 10 (中央値 ± 四分位偏差)、中皮腫で 123 ± 45 であり、中皮腫で有意に増加した(p 値<0.001)。核内の ATBF1 発現は乳癌や胃癌でも低下が報告されており、癌化に伴い核内への ATBF1 の移行が阻害されている可能性がある。また、中皮腫での ATBF1 の発現は肉腫型 > 2 相型 > 上皮型の順に細胞質内での発現が高い傾向にあったが、有意ではなかった。しかし、細胞質内の ATBF1 発現強度が強い症例ほど、有意に予後不良であり(p 値<0.001)、ATBF1 の中皮腫細胞での細胞質発現は、患者の予後と関連している可能性があると考えられた。

(1)(2)より、D1-120 抗体を用いた結果では、悪性度が高まるほど核内の発現が低下し、細胞質での発現が増加した。しかし、MB034 抗体を用いた解析では中皮腫で核内にドット状に陽性となり、反応性中皮ではほとんど陰性であった。これらの結果より、中皮腫では ATBF1 は悪性化に伴って発現が増加するが、核内から細胞質内に連続性に存在するか、細胞内で分断されて存在している可能性が考えられた。また、細胞質の ATBF1 は癌促進因子としての役割を果たしている可能性も否定できず、今後の解析が必要である。

(3) 癌幹細胞マーカーに関する解析

他臓器で癌幹細胞として報告のある Bmi-1、CD133、ABCG2(BCRP)、Nanog、Nestin、Oct3/4、uPAR などに対する抗体を用いて、それぞれ免疫染色を行った。中皮腫では Bmi-1、CD133、ABCG2(BCRP)、Nanog、Nestin は、それぞれ 17/20(85%)、14/20(70%)、10/20(50%)、10/21(48%)、3/20(15%)例に陽性であり、反応性中皮ではそれぞれ、23/23(100%)、2/22(9%)、3/23(13%)、0/23(0%)、0/23(0%)であった。ABCG2 では主に上皮型の中皮腫に陽性であったが、他は組織型との関連は不明であった。Oct3/4、uPAR は中皮腫、反応性中皮ともに陰性で、これらの中皮腫における意義は不明であった。上記結果より、CD133、ABCG2(BCRP)、Nanog は良悪の鑑別に有用である可能性があるが、中皮腫では多くの細胞が陽性となり、癌幹細胞を標識しているのかどうかは明確ではない。

また、種々の癌幹細胞マーカーの候補と ATBF1(D1-120)との二重染色を試みたが、互いにうまく発色せず、未だ成功していない。

また、最近脳組織において関連性が示唆されている ATM、CREB と、ATBF1 との関連性を解析しようと免疫染色を試みた。CREB は、中皮腫も反応性中皮もともに核に染色され、ATM は、中皮腫も反応性中皮もともに細胞質に染色され、それぞれ有意な関連性は免疫組織化学的には認められなかった。

(4) 中皮腫における癌抑制遺伝子 p16 の FISH  
中皮腫 16 例に p16 の FISH を施行し、12 例 (75%) に p16 遺伝子のヘテロ欠失あるいはホモ欠失を認めた。しかし、それらの結果と ATBF1 の細胞内局在との間に明確な関連性は認められなかった。

(5) マウス脳における ATBF1 の発現に関して

共同研究者の三浦らは、研究機関中にマウス脳組織での ATBF1 の発現解析を行った。その結果、胎仔脳組織では、ATBF1 蛋白は神経細胞の核内に豊富に認められるが、成体マウスでは、脳内にほとんど認められないことを確認した。さらに質量分析によって、その違いが ATBF1 のリン酸化に深く関連していることを見出した。すなわち胎仔の脳組織では ATBF1 はリン酸化部分が多く、蛋白分解酵素の作用に抵抗性であるが、成体マウスの脳組織では、ATBF1 のリン酸化は弱く、容易に蛋白分解酵素の影響を受けるのではないかと考察した。

これらの結果より、今後は悪性腫瘍においても ATBF1 のリン酸化の有無と細胞内局在との関連性に注目して研究を行っていく必要があるのではないかと考えられた。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 16 件)

Minato H, Kurose N, Fukushima M, Nojima T, Usuda K, Sagawa M, Sakuma T, Ooi A, Matsumoto I, Oda M, Arano Y, Shimizu J. Comparative immunohistochemical analysis of IMP3, GLUT1, EMA, CD146, and desmin for distinguishing malignant mesothelioma from reactive mesothelial cells. *Am J Clin Pathol*. 査読有 141, 2014, 85-93. DOI: 10.1309/AJCP5KNL7QTELLYI

Zhang S, Kim TS, Dong Y, Kanazawa S, Kawaguchi M, Gao N, Minato H, Takegami T, Nojima T, Miura Y. AT motif binding factor 1 (ATBF1) is highly phosphorylated in embryonic brain and protected from cleavage by calpain-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 427, 2012, 537-541. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.09.092

〔学会発表〕(計 12 件)

湊 宏、川口誠、三浦 裕、張勝、中田 聡子、他。反応性中皮と悪性中皮腫における ATBF1 の核細胞質発現：免疫組織化学的検討。第 102 回日本病理学会総会，2013 年 6 月 6-8 日，札幌。

Minato H, Fukushima H, Kurose N, Nojima T. Comparative immunohistochemical

analysis to distinguish malignant mesothelioma (MM) from reactive mesothelial cells (RMC). 101th Annual meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology, 2012 年 3 月 17-23 日，バンクーバー，カナダ。

Zhang S, Dong Y, Minato H, Nojima T, Asai K, Miura Y. ATBF1 is highly phosphorylated in embryonic brain. 第 34 回日本分子生物学会年会，2011 年 12 月 14 日，横浜。

湊 宏、他。ATBF1 の細胞内局在の悪性中皮腫の再評価。第 4 回 ATBF1 研究会，2011 年 11 月 12 日，名古屋。

〔図書〕(計 1 件)

湊 宏。中山書店，病理検体の取り扱い 癌治療指針のための病理診断プラクティス 肺癌，2011，304-311。

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.kanazawa-med.ac.jp/~clinpath/g1\\_study/index.html](http://www.kanazawa-med.ac.jp/~clinpath/g1_study/index.html)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

湊 宏 (MINATO, Hiroshi)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10293367

(2) 研究分担者

三浦 裕 (MIURA, Yutaka)  
名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授  
研究者番号：90285198

中田 聡子 (NAKADA, Satoko)  
金沢医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30569091

竹上 勉 (TAKEGAMI, Tsutomu)  
金沢医科大学・総合医学研究所・教授  
研究者番号：10113490