

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390329

研究課題名(和文) 肺胞上皮癌における浸潤性肺腺癌への悪性化進展メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of malignant transformation progress from bronchioloalveolar carcinoma to invasive adenocarcinoma

研究代表者

岡田 守人 (Okada, Morihito)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：70446045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：早期肺腺癌細胞株を用いてNotch2細胞内ドメイン高発現細胞株を樹立した。EMT促進関連分子(TGF- $\beta$ 、Smad3/4)の高発現が認められる細胞株を選出し、Notch2シグナル下流分子の遺伝子発現変化を調べた。当初予定の次世代シーケンサーによる検索は不能であった。肺腺癌細胞株およびヒト肺腺癌検体を用いて浸潤癌での高発現が確認できた分子としてGBP1を同定した。Wound healing assay, migration assayによりがん浸潤促進分子であることを確認した。さらにGBP1発現とNotchシグナルやRasシグナル下流分子、肺腺癌患者の予後との関連を検証していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Early lung adenocarcinoma cell line with constitutive Notch2 overexpression was established. TGF- $\beta$  and Smad3/4, which are related to promoting epithelial mesenchymal transition, were examined by RT-PCR. Subsequently, Six1, Slug, Snail, and Hey1, down-stream molecules of Notch2 signaling pathway, were also examined.

It is difficult for small lung adenocarcinoma, a target of this study, to be applied for next generation sequencer because of its small amount of RNA. Thus, we performed further investigation of the candidate molecules that have been identified in the previous study. GBP1 was identified as a promising molecule after validation with lung adenocarcinoma cell lines and human lung adenocarcinoma specimen. In addition, wound healing assay and migration assay demonstrated that GBP1 was involved in inducing cancer invasion. We now plan to examine the association between GBP1 expression and Notch or Ras signaling pathway and the prognosis of patients with lung adenocarcinoma.

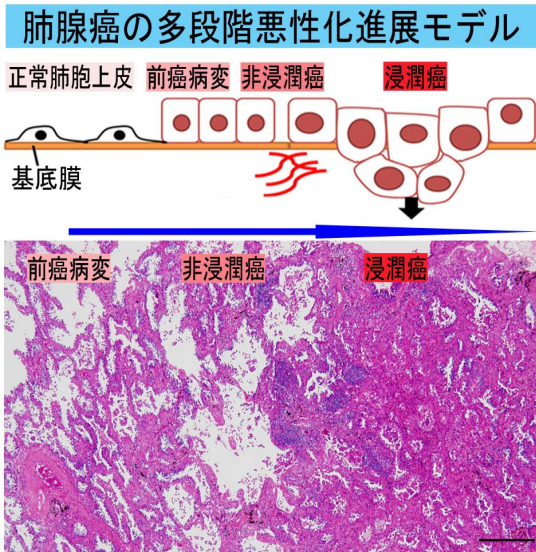
研究分野：胸部外科学

キーワード：肺癌 腺癌 悪性化

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌の多くを占める腺癌に対する治療は癌克服に関して重要である。我々は小型肺腺癌において非浸潤癌である肺胞上皮癌 bronchioloalveolar carcinoma(BAC)を含有する混合型浸潤性腺癌 invasive adenocarcinoma (AD)を同一生体内における多段階悪性化進展モデル(下図)として解析した。

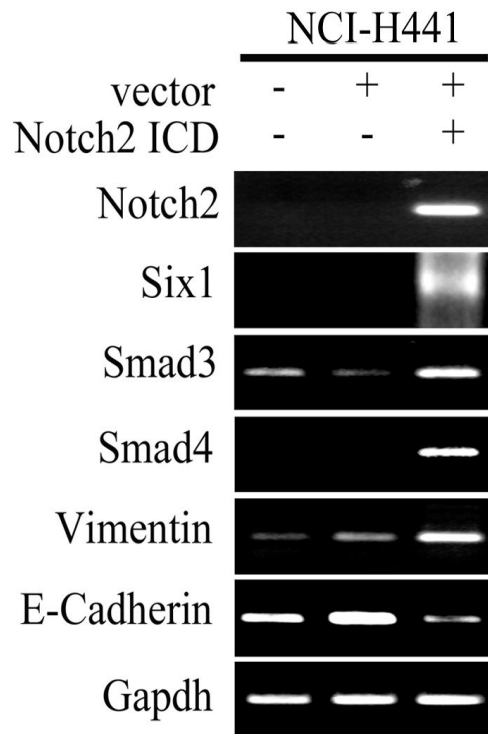
手術検体の凍結切片においてレーザー・マイクロダイセクションを用いて非浸潤部と浸潤部の癌細胞のみを正確に区別して採取した。それぞれ total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイに供することで網羅的に両成分間の遺伝子発現を比較した。



### 2. 研究の目的

浸潤部に高発現、つまり浸潤・転移を促進させると考えられる候補分子のうち、Notch2, Six1 について機能解析を行った。その結果、両分子が癌の悪性化進展に関与、特に Notch2 シグナル亢進が浸潤の initiation event である epithelial-mesenchymal transition(EMT)の誘導・促進に関与していた(下図)。よって Notch2 シグナル伝達系が肺腺癌悪性化の重要な因子の一つと判明した。有害事象の少ない創薬には悪性化に寄与するシグナルのみの制御が必要であることから、その

下流分子の癌悪性化機構の解明が不可欠である。これまで肺腺癌の悪性化進展における Notch2 シグナルに関する研究は殆ど報告されていない。本研究では次世代シーケンサーを用いて Notch2 シグナル亢進による悪性化促進の詳細な分子機構の解明を目指す。一方、先のマイクロアレイ解析とこれから行う次世代シーケンサーの両方で共通する浸潤部高発現遺伝子群の機能解析による肺腺癌の悪性化メカニズムの解明も目的とする。これらの研究結果により、新たな肺癌治療戦略の開発に繋がるのが本研究の最大の意義と考える。



非浸潤性肺腺癌細胞株NCI-H441にNotch2の細胞内ドメインを形質移入することで、Six1の発現上昇およびEMTを示唆する変化(Smad3/4, Vimentinの上昇E-cadherin低下)が認められる。

### 3. 研究の方法

1) Notch2 シグナル(下図)下流分子による肺腺癌悪性化進展メカニズムの解明  
・早期肺腺癌細胞株に Notch2 細胞内ドメインを強制発現し、浸潤型細胞株を樹立する。

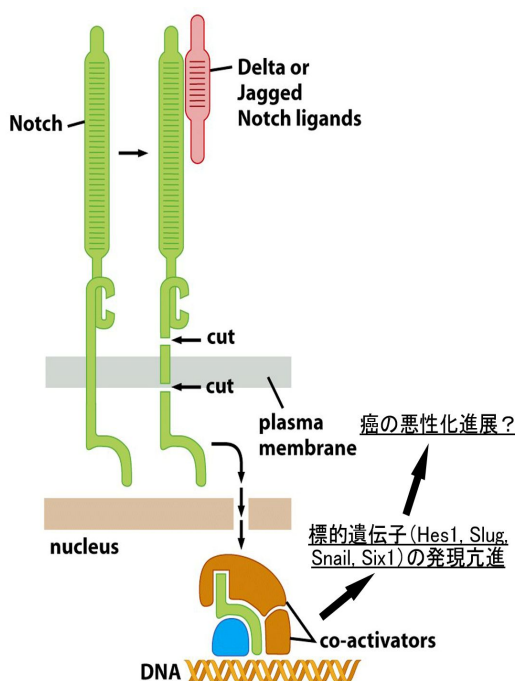
・次世代シーケンサーで遺伝子変化を全ゲノム網羅的に探索し、Notch2 の下流分

子を同定し、その機能解析を行う。ヒト検体で下流分子の発現を検証し臨床予後との相関性を解析する。

2) 癌悪性を促進する新たな候補遺伝子・遺伝子群ネットワークの同定と協調的機能の解析

・次世代シーケンサーにより更に浸潤部高発現遺伝子を探索しシグナル経路別分類を行う。

・複数遺伝子を同時に形質移入できる新開発ベクターで同一経路の悪性化相互作用を調べ、悪性転化遺伝子を特定する。ヒト組織でその発現を検証し臨床データとの関連を解析する。



#### 4. 研究成果

早期肺腺癌細胞株を用いて Notch2 細胞内ドメイン高発現細胞株を樹立した。EMT 促進関連分子(TGF-、Smad3/4)の高発現(浸潤傾向)が認められる細胞株を選出し、Notch2 シグナル下流分子 Six1, Slug, Snail, Hey1 の遺伝子発現変化を調べた。

当初予定の次世代シーケンサーによる検索は不能であった。肺腺癌細胞株およびヒト肺腺癌検体を用いて浸潤癌での高発現が確認できた分子として GBP1 を同定した。Wound healing assay, migration assay によりがん浸潤促進分子であることを確認した。さらに GBP1 発現と Notch シグナルや Ras シグナル下流分子(細胞運動に関与)、

肺腺癌患者の予後との関連を検証していく予定である。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

1. Mimae T, Okada M. Notch2 and Six1 are upregulated during progression of early-stage lung adenocarcinoma and define its unfavorable subset at advanced stages.

AACR Annual Meeting 2012, Chicago (USA), 03/31/2012 - 04/04/2012

2. 見前隆洋, 岡田守人. 転写因子 Notch2 と Six1 の肺腺癌における悪性化進展への関与  
第53回日本肺癌学会総会 岡山 2012年11月8-9日

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)無し

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)無し

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等 無し

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

岡田 守人(OKADA MORIHITO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所教授

研究者番号:70446045

(2)研究分担者 なし

( )

研究者番号：

(3)連携研究者 なし  
( )

研究者番号：