

令和元年6月25日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10270

研究課題名(和文) 肺癌におけるAMF及びそのシグナル伝達系に関する周辺タンパク質の解析

研究課題名(英文) Analysis of AMF and its related proteins in lung cancer

研究代表者

坪地 宏嘉 (TSUBOCHI, Hiroyoshi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50406055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌において、autocrine motility factorのターゲットであるAKT周辺遺伝子の解析を行うとともに、肺癌におけるAkt発現に関して免疫組織化学的解析を行い、臨床病理学的各因子及び予後との相関について検討した。total-Akt、Akt1、Akt2、Akt3がそれぞれ61%、47%、41%、23%の症例で過剰発現していることを見出した。Akt2、p-Akt、cytoplasmic-p-Aktの発現はリンパ節転移と有意に相関していた。AKT1及びAKT2遺伝子の増幅は腫瘍径と相関していた。total-Akt、p-Akt、Akt1-3の発現は予後と有意な相関はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌において、EGFR-Aktの相互関係、制御機構の意義を推定することができ、肺癌症例の層別化、個別化に結び付くことが期待される。さらに、臨床Stage分類では予見できない進展の早い癌、術後早期再発例を抽出することで、癌症例の更なる細分化につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Immunohistochemical staining for 108 cases revealed overexpression of total Akt, Akt1, Akt2 and Akt3 in 61.1, 47.2, 40.7 and 23.1%, respectively, and phosphorylated Akt in 42.6% of cases. Expression of total Akt, Akt2 and Akt3 were frequently observed in small cell carcinoma, but phosphorylated Akt and Akt1 were more frequently observed in squamous cell carcinoma. Although "FISH-positive" AKT1 and AKT2 gene increases (amplification/high-level polysomy) were found exclusively in the cases overexpressing total Akt, Akt1 or Akt2, respectively, AKT3 increase was irrelevant of Akt3 expression. Statistically, expressions of Akt2, p-Akt and cytoplasmic-p-Akt were correlated with lymph node metastasis. Although AKT1 and AKT2 gene increase showed positive correlation with, or trend towards a positive correlation with tumor size, AKT3 did not.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 AMF Akt p27

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

進行肺癌に対する術後療法や再発例に対する化学療法は、個々の症例の病理学的或いは分子生物学的背景に基づいた“個別化治療”の時代になりつつある。受容体型チロシンキナーゼ(RTK)をはじめ、細胞内エフェクター分子も含めた遺伝子異常、蛋白過剰発現の網羅的解析に立脚した国内外でのゲノム創薬は癌研究の大きな柱の一つとなっている。我々は分子レベルで 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を見出したが、臨床 Stage 分類では予見できない進展の早い癌、術後早期再発例の存在にも注目し、癌症例の更なる細分化の必要性を考えるに到った。特に最近では、化学療法の効果に直結する EGFR-Akt-mTOR の系を解析し、Akt の重要性を報告した。我々はガイドラインに則った治療プロトコールに加え、こうした多因子を用いた詳細なプロファイリングによる層別化、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による解明を目標としている。一方で、今回我々が企図している、AMF を軸とした浸潤、転移に着目した複数因子の解析研究の報告は現在までほとんど無いのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究では AMF とその制御関係にある分子群に着目し、これらの分子の発現と相互作用の多様性に基づいた癌の細分化、個別化を行う。(1) 解糖系酵素としての AMF の発現と PET 値の関連の解析、(2) 浸潤促進因子としての AMF と AKT の関連、さらには分解系蛋白質である AMFR の発現パターンも含めた解析、(3) Akt を制御し、AMF とのクロストークも予想される EGFR に関して、その過剰発現、遺伝子増幅、変異の解析、を行い、術前の PET 所見、局所、脈管侵襲、術後経過、化学療法感受性との関連など臨床的各因子と相関を解明する。以上の検索から予後不良群或いは良好群を抽出することの可否を明らかにする。また、分解系蛋白質として機能する AMF receptor(AMFR)、AMF のターゲットである Akt の異常、EGFR 変異等も解析対象に加える。これらの遺伝子、蛋白質の解析を念頭に、術前の PET 所見や切除標本における原発巣及びリンパ節転移における各分子の発現に関しても解析を行い、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、EGFR-Akt/AMF-AMFR ネットワークの多様な制御機構を包括的に解析する。

### 3. 研究の方法

肺癌を対象として、近年、癌の代謝活性と浸潤、転移の両面に関与する事で注目されている AMF を中心に、そのターゲットである Akt 周辺遺伝子、蛋白質の異常、受容体である AMFR の発現を精査し、臨床病理学的因子との関連を解析する。(1) 糖代謝の観点から術前 PET における SUV(standard uptake value)との相関、(2) 浸潤の観点から、リンパ節転移、術後早期再発等の臨床的背景との関連、(3) AMF は我々が解析を続けてきた EGF(R)-AMF-Akt の系にも関与しており、EGFR の遺伝子増幅、変異、AKT の遺伝子変化、活性化異常との相互関係、(4) AMFR は蛋白分解系因子なので、他の分解系蛋白質(Pirh2, Skp2)、それらのターゲット分子である p27 蛋白質発現、リン酸化異常を解析する。実験手法は、外科的切除された肺癌病理組織検体で各特異的抗体を用いた免疫組織染色、新鮮材料が入手できた症例については immunoblotting、定量 RT-PCR で行う。

### 4. 研究成果

- (1) 肺癌において、自律型細胞運動刺激因子 autocrine motility factor(AMF)のターゲットである AKT 周辺遺伝子の解析を行うとともに、肺癌における Akt 発現に関して免疫組織化学的解析を行い、臨床病理学的各因子及び予後との相関について検討した。108 例の肺癌組織の免疫組織学的検討により、total-Akt、Akt1、Akt2、Akt3 がそれぞれ 61%、47%、41%、23%の症例で過剰発現していることを見出した。個別にみると、total-Akt は小細胞癌では 62%の症例で強発現していた一方、腺癌では 40%の症例で発現していたにすぎなかった。Akt2、Akt3 は小細胞癌で、Akt1 は扁平上皮癌で高頻度に発現していた。Akt2、p-Akt、cytoplasmic-p-Akt の発現はリンパ節転移と有意に相関していた。Epidermal growth factor receptor (EGFR)の変異は腺癌 44 例のうち 19 例に認めた。腺癌における EGFR の変異例と予後は有意な相関はなかった。EGFR の変異と total-Akt、p-Akt、Akt1-3 の発現との関連についても検討したが有意な相関はなかった。Akt の発現及び活性化と喫煙歴について相関はなかった。免疫染色による Akt の発現と AKT 遺伝子の増幅とは相関していることを確認した。AKT1 と AKT2 に関して FISH 陽性の腫瘍はすべて total-Akt 及び p-Akt の過剰発現が認められたが、AKT3 については発現が認められなかった。AKT1 及び AKT2 遺伝子の増幅は腫瘍径と相関していた。予後との関連については、病理学的 T 因子と N 因子は予後と有意な相関があったが、total-Akt、p-Akt、Akt1-3 の発現は予後と有意な相関はなかった。これらの結果から、肺癌において、EGFR-Akt の相互関係、制御機構の意義を推定することができ、今後 AMF 及び AMF 受容体の系との相関関係を明らかにすることで、肺癌症例の層別化、個別化に結び付くことが期待される。
- (2) 肺癌検体を用いて AKT1,AKT2 遺伝子の増加群で変動する miRNA を解析した。その

結果、リンパ管侵襲の高度な癌では miR-200a,miR-200b が有意に低い発現であった。さらに病理病期 I,II 期の癌では、miR-200a は AKT1+群と比較して AKT2+群で高度に発現していた。miR-200a は ZEB1 や E-cadherin の発現との有意な相関は認められなかった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) Dobashi Y, Tsubochi H, Minegishi K, Kitagawa M, Otani S, Ooi A. Regulation of p27 by ubiquitin ligases and its pathological significance in human lung carcinomas. Hum Pathol. 66:67-78, 2017 (査読有)
- (2) Goto A, Dobashi Y, Tsubochi H, Maeda D, Ooi A. MicroRNAs associated with increased AKT gene number in human lung carcinoma. Hum Pathol. 56:1-10, 2016 (査読有)
- (3) Ito T, Matsubara D, Tanaka I, Makiya K, Tanei ZI, Kumagai Y, Shiu SJ, Nakaoka HJ, Ishikawa S, Isagawa T, Morikawa T, Shinozaki-Ushiku 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, Murakami Y. Loss of YAP1 defines neuroendocrine differentiation of lung tumors. Cancer Sci. 107:1527-1538, 2016 (査読有)
- (4) 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. 106:772-81, 2015 (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

土橋 洋、後藤 明輝、坪地 宏嘉、井上 純、稲澤 譲治、大井 章史 ヒト肺癌における AKT 遺伝子増加による発現変動 microRNA と病理学的意義。第 74 回日本癌学会学術集会, 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：遠藤俊輔  
ローマ字氏名：(ENDO, shunsuke)  
所属研究機関名：自治医科大学  
部局名：医学部  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：10245037

研究分担者氏名：遠藤哲哉  
ローマ字氏名：(ENDO, tetsuya)  
所属研究機関名：昭和大学  
部局名：医学部  
職名：講師  
研究者番号(8桁)：50528601

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：土橋洋  
ローマ字氏名：(DOBASHI, yoh)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。