

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20790982

研究課題名（和文） 肺がんにおけるカルボキシペプチダーゼMの発現と予後の研究

研究課題名（英文） Study of Carboxypeptidase M expression profiles in patients with lung cancer

## 研究代表者

藤原 直之（FUJIWARA NAOYUKI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・医系・助教

研究者番号：80451912

## 研究成果の概要（和文）：

ヒトおよびラット肺がんにおける Carboxypeptidase M(CPM)の解析を行った。ラット肺がんモデルはBHPを投与して作製し、腺がん様の組織が形成された。抗ラット CPM 抗体 7F9等を用いた免疫組織染色で CPM は、正常組織部分で II 型肺胞上皮細胞の細胞膜に局在し、肺がん組織部分でも同様の局在であった。またそれらは抗 TTF-1 抗体と陽性細胞がよく一致した。ウェスタンブロッティングで発現量が経時的に増加した。以上より CPM はがん関連分子の1つと考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

We investigated the localization of CPM in lung cancer of human and rat. Anti-rat CPM antibody 7F9 was applied to a BHP-induced rat lung cancer model. In immunohistochemistry, CPM was localized in the cell membrane of pulmonary alveolar type II epithelial cells in normal tissue part, and also was in the cell membrane of pulmonary cancer part. In immunohistochemistry for CPM and TTF-1, positive cells were well consistent. Expression level of CPM in western blotting was increased with time. Therefore, CPM was considered one of the cancer-related molecules.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2000000	600000	2600000
2009年度	500000	150000	650000
2010年度	500000	150000	650000
2011年度	500000	150000	650000
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：カルボキシペプチダーゼ M/Carboxypeptidase M/CPM/肺がん/Lung Cancer/肺胞上皮細胞/発がん動物モデル

## 1. 研究開始当初の背景

Epidermal growth factor receptor (EGFR)は非小細胞肺がんの約 80%に発現しており、がんの進展に重要な役割を果たすと

考えられている。近年 EGFR チロシンキナーゼ阻害薬が臨床応用され、急性肺障害や間質性肺炎などの副作用があるものの、東洋人、非喫煙者のサブグループに効果を認めてい

る。すなわち EGFR より下流のシグナル伝達経路を遮断することが、がんの抑制に寄与していると考えられている。

一方 EGFR の上流についてはどうであろうか。EGFR のリガンドの一つに EGF があるが、これはカルボキシペプチダーゼ M (Carboxypeptidase M: CPM) というタンパクにより制御されることが知られている。CPM は、肺に特異性が高い分子であり、標的とするペプチドやタンパクの C 末端の、アルギニンやリシンの組合せ配列を認識し、これを切断・分解して、標的分子の活性を制御する酵素タンパクである。標的分子としては EGF の他にブラジキニンやカリジンなどの肺における炎症性メディエータが知られている。Wnt シグナル伝達経路から正の制御を、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ファミリーから負の制御を受けるため、発生の初期段階から細胞の増殖、分化、形態形成などの役割に関与していることが予想されている。

CPM が過剰発現しているならば、EGF が活性化されていることが予想され、EGFR より下流のシグナル伝達経路が活性化され、がんの増殖、浸潤、転移が活発であることを意味すると考えられる。

## 2. 研究の目的

肺がんにおけるカルボキシペプチダーゼ M の発現と局在を調べ、病理学的診断に有用なマーカータンパクとなり得るかを検討する。またヒト肺がんでの発現の特徴と患者予後の関係を明らかにする

## 3. 研究の方法

### (1) 正常肺におけるカルボキシペプチダーゼ M の局在について

Nagae らは、ヒトの肺胞上皮 I 型細胞およびマクロファージに存在するとしたが、Rehli らはマウスのマクロファージには存在しないと示し、Fujiwara らはラットの肺胞上皮 II 型細胞に存在すると述べた。このように肺胞内のカルボキシペプチダーゼ M の局在については議論があった。この点を明らかにするため、ヒトの手術切除標本を使用して、正常な肺組織におけるカルボキシペプチダーゼ M の局在を免疫組織化学的に検討した。

### (2) ヒト肺がんにおけるカルボキシペプチダーゼ M の局在と発現量について

Tsakiris らは、肺がんにおけるカルボキシペプチダーゼ M の局在は、腫瘍細胞のうち腺がんの細胞膜に強く発現しているとした。また病期 I および II 期においてカルボキシペプチダーゼ M の発現が認められた群で有意に予後が悪いと述べた。これらのことをふまえ、主に病理病期 I 期の肺腺がんについて、免疫

組織化学を行い局在と発現量を評価した。組織型(腺房型、乳頭型、細気管支肺胞上皮型、粘液産生充実型)によって発現が異なるのか、分化度(低分化、中分化、高分化)によって発現が異なるのか、臨床的な各因子(性別、年齢、喫煙指数、CEA などの腫瘍マーカー、脈管侵襲など)と相関があるのか、生命予後と相関があるのか、等を統計学的に処理した。

### (3) ラット肺がんモデルを使用したカルボキシペプチダーゼ M の検討

ラットの肺がんモデルは N-ニトロソビス(2-オキソプロピル)アミン(BHP)を 12 週間投与して作製した。Fujiwara らが作製したラット肺に対するモノクローナル抗体を用いて、ラットの肺がんに対する免疫組織化学を行った。ラットの肺がんの CPM の局在を、ヒトとの結果と比較しモデルの整合性を検討した。またこのモノクローナル抗体はウェスタンブロッティングに使用できることが確立されているため、生化学的手法で発現量を検討した。

### (4) ラット肺がん組織からがん幹細胞の抽出

Shirasawa らが記述した肺細胞初代培養の方法を用いて、ラットの肺がんから細胞培養を行い、自己複製能のある細胞群、すなわちがん幹細胞群を抽出できるか検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 肺におけるカルボキシペプチダーゼ M の局在について

市販の抗ヒト CPM 抗体を使用して免疫組織化学の条件検討を行ったが、肺がん組織から陽性所見が得られるも、正常組織からは陽性所見を得られなかった。これは I 型肺胞上皮細胞または II 型肺胞上皮細胞に局在するという Fujiwara らの知見と矛盾することになり、市販抗体の信頼性に疑問が表出した。これを受けて新たに自家製のポリクローナル抗体の作製を開始した。抗原部位解析、立体構造解析を行い、適切なペプチド配列を選択し、ウサギに免疫を行った。免疫組織化学の条件検討を行ったが、やはり肺がん組織からは陽性所見が得られるも、正常組織から明らかな陽性所見を得られなかった。

### (2) ヒト肺がんにおけるカルボキシペプチダーゼ M の局在と発現量について

上記の市販抗体または自家製抗体で免疫組織化学を行うも、組織像の非整合性を認めため、途中で解析を中止した。

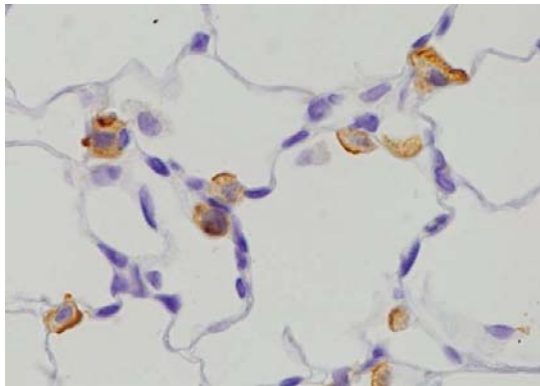
### (3) ラット肺がんモデルを使用したカルボキシペプチダーゼ M の検討

ラット肺がんモデルを作製するため、N-ニトロソビス(2-オキソプロピル)アミン(BHP)

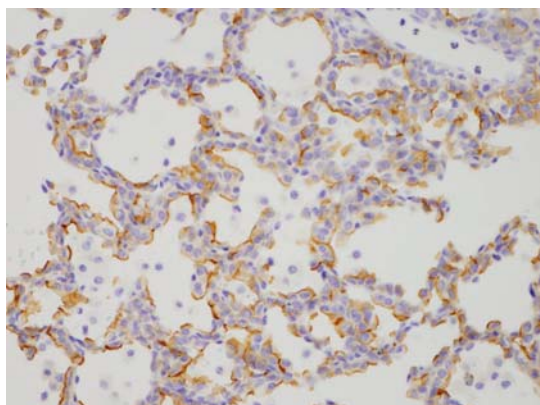
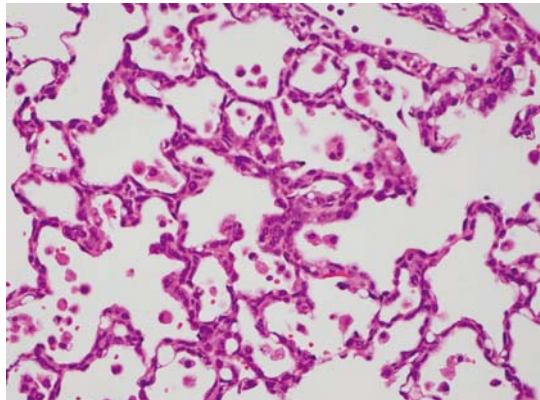
を12週間経口投与し、それからさらに12週間後に安楽死させた。結果はBHPを投与したすべてのラットに腺がん様の肺腫瘍が複数個ずつ形成された。小動物向けのCTを使用して満遍なく肺腫瘍が分布することを確認した。この方法は安定してラット肺がんモデルを作製できることが確認された。続いてラット肺がん標本におけるCPMの発現量と局在を検討するため、この標本に対して、抗ラットCPM抗体7F9で免疫組織化学およびウェスタンブロッティングを行った。

結果は、

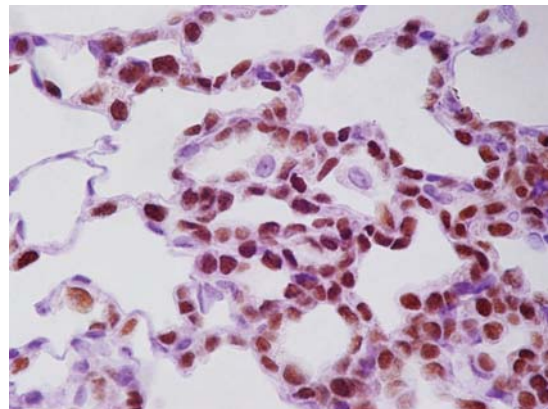
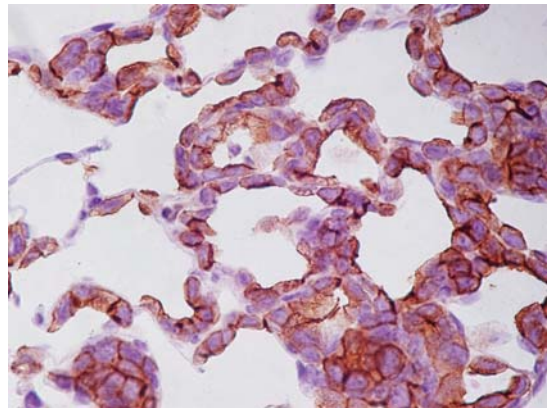
- ① 正常組織部分ではCPMはII型肺胞上皮細胞の細胞膜に局在していた(下図)。



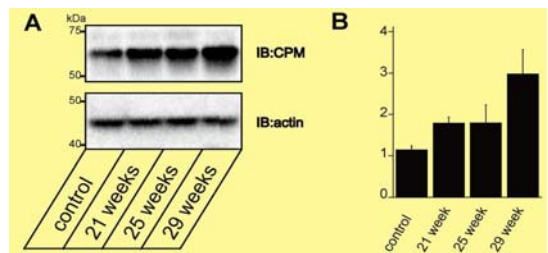
- ② 腫瘍組織部分では異型度が低い部分に強く発現する傾向があった(下図, 上 HE, 下 IHC)。



- ③ 抗TTF-1抗体と陽性細胞がよく一致した。(下図, 上 CPM, 下 TTF-1)



- ④ ウェスタンブロッティングで発現量が正常組織よりも腫瘍組織で増加していることが示された(下図)。



以上より CPM は II 型肺胞上皮細胞に局在することが確認され、II 型肺胞上皮細胞由来の肺がんについては発がんや増殖などに関連があると考えられた。

- (4)ラット肺がん組織からがん幹細胞の抽出  
抽出された細胞群を限界希釈して観察すると、一部の細胞群で sphere の形成を認めるようになった。これらの性質については解析途中である。

## 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)

〔学会発表〕（計 2 件）

1. Naoyuki Fujiwara, Katsuo Kojima, Hirokuni Arai, Jiro Kumagai, Yutaka Hata: Localization of Carboxypeptidase M in BHP-induced rat lung adenocarcinomas. 13th World Conference on Lung Cancer, San Francisco, California, USA, 2009, July 31-August 4
2. 藤原直之, 小島勝雄, 荒井裕国, 熊谷二郎, 畑裕 ラット肺癌モデルを使用したカルボキシペプチダーゼMの局在の検討  
第 49 回日本呼吸器学会学術講演会 東京 2009 年 6 月 12 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤原 直之 (FUJIWARA NAOYUKI)  
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・医系・助教  
研究者番号：80451912

### (2) 研究分担者

明石 巧 (AKASHI TAKUMI)  
東京医科歯科大学医学部附属病院・医系・准教授  
研究者番号：60242202