

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：92720

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07388

研究課題名（和文）ECT2-FAK結合を介したRac1活性による肺腺癌初期悪性化分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular analysis of the Rac1 activation for malignant progression of early lung adenocarcinoma via ECT2-FAK binding

研究代表者

野口 雅之（NOGUCHI, Masayuki）

医療法人徳洲会湘南鎌倉総合病院（臨床研究センター）・湘南先端医学研究所 がん医療研究部・主席研究員

研究者番号：00198582

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：肺腺癌の多段階増悪機構を患者の予後に基づいて研究を行う過程で肺腺癌の初期から遺伝子増幅がみられるECT2を明らかにした(Cancer Science 2014, Lab Invest 2018)。本研究では、リン酸化ECT2(pECT2)がFAKと直接結合することでRac1を活性化しfocal adhesion signalingに関わるであろうことを報告できた(Cancer Science, 2021)。さらにpECT2の機能がRasGRF2の発現とリンクしていることを明らかにした(Pathol Int, 2021)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺腺癌は今なお予後が悪い癌腫であり、早期発見、早期治療が重要である。本研究では申請者が発見した極めて早期の肺腺癌で増幅する遺伝子であるECT2の機能をより明らかにし、ECT2発現抑制の治療導入を目指した研究を行った。pECT2と結合するFAKが重要であることを明らかにし、次にpECT2-FAKの結合阻害を行うことが本研究の主目的であったが、研究終了までに確実な成果が上がらなかった。ただし、本研究でECT2の機能をより詳細に明らかにすることができ、今後の創薬研究に寄与できる成果が上がった。

研究成果の概要（英文）：We have found ECT2 gene as the amplified driver gene for the malignant progression of early-stage lung adenocarcinoma (Cancer Science 2014, Lab Invest 2018). In this study, we made clear the activation of Rac1 via pECT2 and FAK binding and its association of focal adhesion signaling (Cancer Science, 2021). Besides, we found the functional association between pECT2 and RasGRF2 (Pathol Int, 2021).

研究分野：人体病理学

キーワード：Lung adenocarcinoma ECT2 FAK Rac1

1. 研究開始当初の背景

申請者は1995年、*Cancer*に小型肺腺癌の分類「野口分類」を発表し、悪性度の高い難治癌とである肺腺癌にも上皮内癌や切除により完治できる比較的初期の腺癌が存在することを明らかにした。その後、申請者は上皮内腺癌と初期浸潤癌の差異を研究してきた。いくつかの特徴的な遺伝子増幅、発現の差異が明らかになったが、初期から遺伝子増幅が見られる遺伝子はECT2のみであった(*Cancer Science* 2014)。

ECT2は生理的に核に発現し、核分裂に関与する重要な遺伝子であるが、応募者は腫瘍細胞においては高発現するECT2は核ばかりでなく、細胞質にも存在することを明らかにした。しかし細胞質におけるECT2の機能は明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、初期肺腺癌腫瘍細胞の細胞質に特異的に発現するECT2の生物学的意義を解明し、肺腺癌の予後に与える影響を明らかにし、さらに肺腺癌の治療戦略を構築することである。

(1) ECT2はguanine-nucleotide exchange factor (GEF)である。本研究では肺腺癌で、同じGEFであるRasGRF2の発現とpECT2の発現を比較検討し、これらのGRF発現が肺腺癌の予後にどのような影響を与えるかを検討した。

(2) pECT2とFAKの共局在を蛍光抗体法で明らかにし、膜に存在するpECT2がどのように肺腺癌の予後に関与するか、ヒト肺腺癌切除症例を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 筑波大学附属病院で1999年から2007年に切除された肺腺癌179例を用いた。これらの症例は10%緩衝ホルマリンで固定され、パラフィンで胞埋された。HE標本作製してWHO分類(第5版)に基づいて組織診断され、UICCシステム(第8版)で病期分類された。免疫染色はAutostainer Link 48 platform (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)を用いて行った。一次抗体として、抗RasGRF2抗体(1:100; Abcam, Cambridge, UK)と抗ECT2抗体(1:200; Milipore, Billerica, MA)を用いた。免疫染色の評価はRasGRF2に関しては細胞質の染色性についてH-scoreを用いて行った。pECT2は細胞質の染色性について1000個の細胞について陽性比率を評価した。RasGRF2に関しては免疫染色の結果を担保するために、高発現症例と低発現症例の3例ずつをwestern blot法を用いて確認した。

(2) 筑波大学附属病院、国立病院機構・茨城東病院における肺腺癌の外科的切除検体の新鮮剖面から腫瘍細胞を擦過、回収し、セルブロック法にてFFPEブロックを作製した。両院合わせて121例についてセルブロックを作成できた。まず、蛍光抗体法を用いてpECT2とFAKの局在を検討した。さらにすべての症例についてpECT2およびFAKの免疫細胞化学を施行し、発現強度をスコア化して、それらの関連性と臨床病理学的意義を検討した。

4. 研究成果

(1) 179例の肺腺癌についてRasGRF2の免疫染色を行うと、100例は高発現、で79例は低発現であった。(図1) RasGRF2の発現は患者の性、喫煙歴、病理学的病期、T因子、リンパ節転移、胸膜浸潤、脈管浸潤、腺癌の組織亜型と関連していた。RasGRF2は浸潤性肺腺癌に高発現群が多かった(73/145:50% vs 6/34:18%)。高発現群は低発現群より有意に予後が悪かった($p < 0.028$)。さらにpECT2の発現も併せて検討した。pECT2蛋白の陰性群は陽性群に比べて有意に予後が良かった。興味あることに、RasGRF2とpECT2のどちらも高発現群は共に陰性群に比べて極めて予後が悪かった($p < 0.004$)。(図2) (引用文献1)

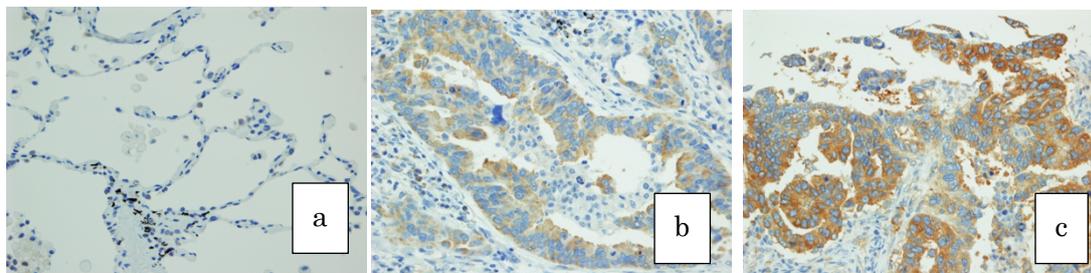


図1 a: 正常末梢肺組織、b: 肺腺癌 (RasGRF2 低発現例)、c: 肺腺癌 (RasGRF2 高発現例)

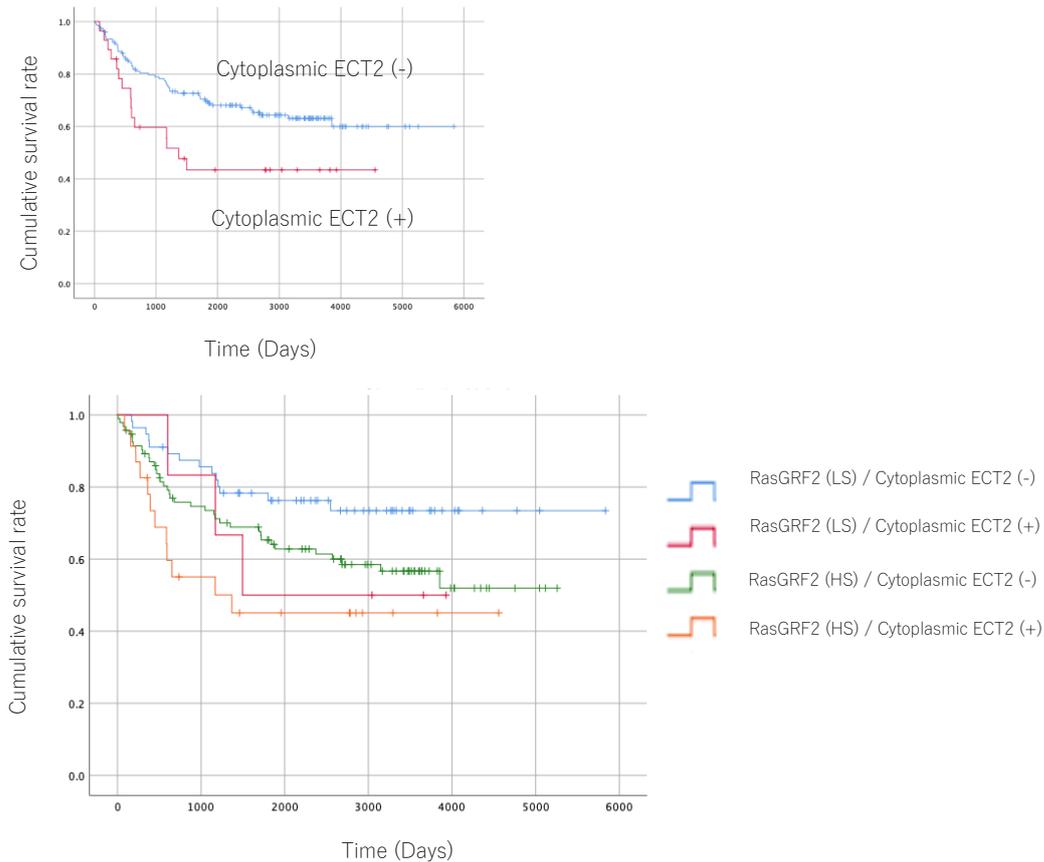


図2 上：細胞質内 ECT2 の発現と予後
下：細胞内 ECT2 発現と RasGRF2 の発現どの肺腺癌の予後との関係

(2) 蛍光免疫染色を行ったところ、一部の細胞膜において pECT2 と FAK の共局在が確認された。(図3) さらに 121 例中、解析可能であった 113 例について pECT2 と FAK の免疫細胞染色をおこなった。pECT2 と FAK がともに高発現であった群と、ともに低発現であった群を比較すると、年齢 ($p=0.026$)、浸潤の程度 (上皮内腺癌+微小浸潤性腺癌 vs 浸潤性腺癌、 $p=0.014$)、リンパ管侵襲 ($p=0.006$) において有意差が認められ、pECT2, FAK 高発現群が予後不良であることが明らかになった。(表1) (引用文献2「作成中」)

(3) まとめ

pECT2 はこれと同様な guanine-nucleotide exchange factor (GEF) である RasGRF2 と同様に高発現することで肺腺癌の予後と関係することを明らかにし(1)、さらに pECT2 が細胞膜上で FAK と結合することで肺腺癌の悪性化に関与することを明らかにした。(2)

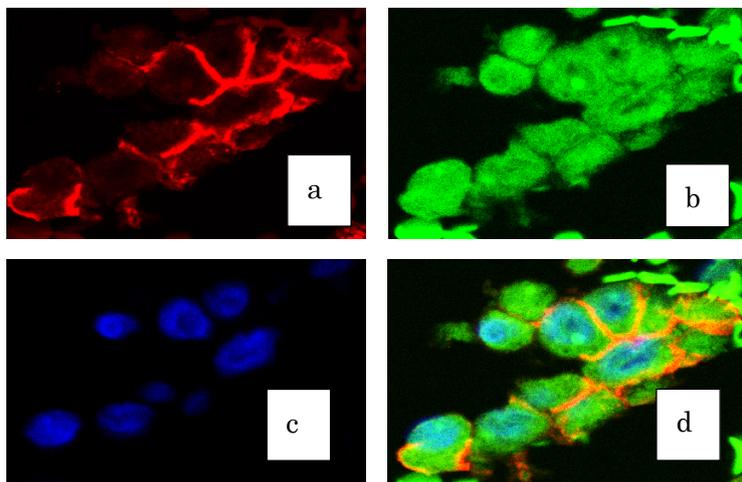


図3 a:pECT2、b:FAK、c:DAPI、d:Merge

	pECT2, FAK 低発現群 (n=34)	pECT2, FAK 高発現群 (n=31)	P値
年齢 (≤60歳 / >60歳)	2/32	8/23	0.026
性別 (男 / 女)	19/15	14/17	0.388
浸潤の程度 (上皮内腺癌 / 微小浸潤性腺癌 / 浸潤性腺癌)	1/11/22	0/3/28	0.046
原発腫瘍の拡がり (is, 1mi, 1a, 1b, 1c / 2a, 2b, 3, 4)	25/9	16/15	0.067
腫瘍径 (≤30mm / >30mm)	28/6	21/10	0.172
リンパ節転移 (- / +) -; 0 +; 1, 2	17/8	15/8	0.838
遠隔転移 (- / +)	2/2	1/1	-
臨床病期 (0, I / II, III, IV)	29/5	20/11	0.052
血管侵襲 (- / +) -; 0, +; 1, 2	26/8	18/13	0.113
リンパ管侵襲 (- / +)	30/4	18/13	0.006
胸膜侵襲 (- / +) -; 0, +; 1, 2, 3	26/8	23/8	0.831
喫煙歴 (- / +)	18/16	15/16	0.714
EGFR変異 (- / +)	6/10	6/13	0.713

表1 : pECT2 と FAK 発現の臨床病理学的意義

引用文献

1. Nakagawa T, Kim YJ, Kano J, Murata Y, Kosibaty Z, Noguchi M, Sakamoto N. High expression of Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor 2 (Ras-GRF2) in lung adenocarcinoma is associated with tumor invasion and poor prognosis. *Pathol Int* 2020;71:255-260.
2. Murata Y, Yoshida A, Minami Y, Kosibaty Z, Noguchi M. Phosphorylated epithelial cell transforming sequence 2 is significantly associated with lung adenocarcinoma invasion. (in preparation)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakagawa T, Kim YJ, Kano J, Murata Y, Kosibaty Z, Noguchi M, Sakamoto N	4. 巻 71
2. 論文標題 High expression of Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor 2 (RasGRF2) in lung adenocarcinoma is associated with tumor invasion and poor prognosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 255-260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kosibaty Z, Murata Y, Minami Y, Noguchi M, Sakamoto N.	4. 巻 112
2. 論文標題 ECT2 promotes lung adenocarcinoma progression through extracellular matrix dynamics and focal adhesion signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 703-714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14743	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kosibaty Z, Noguchi M.
2. 発表標題 ECT2 promotes cancer progression through alterations of cell-extracellular matrix interaction.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	臺 知子 (DAI Tomoko) (20835194)	湘南先端医学研究所・がん医療研究部・非常勤研究員 (92720)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------