

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4月24日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390390

研究課題名（和文）小型肺腺癌における悪性を規定する新規遺伝子の網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of novel genes regulating the malignant transformation in small-sized lung 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

研究成果の概要（和文）：

がん浸潤部において高発現が確認された Notch2 と Six1 について機能解析を行い、Notch2-Six1 転写カスケードとして 2 分子が協調的に一連の遺伝子群の発現を活性化し、肺上皮細胞において epithelial-mesenchymal transition, EMT や核の腫大を促進させることにより肺腺癌の悪性が進展する可能性を明らかにした。新たに GGO/Solid 混在の肺腺癌症例において 2 分子の免疫組織染色による発現パターンと臨床データとの関連性の検討を行い、2 分子が浸潤部で高発現を認める肺腺癌症例は浸潤部で高発現を認めない症例よりも悪性度が高い可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The transcription factors Notch2 and Six1 were upregulated in invasive cancer cells in all minimally invasive adenocarcinomas. Exogenous Notch2 transactivated Six1 followed by Smad3, Smad4, and vimentin, and enlarged the nuclei of NCI-H441 lung epithelial cells. Immunochemical staining for the transcription factors was double positive in the invasive, but not in the lepidic growth component of a third of advanced Ads, and the disease-free survival rates were lower in such tumors. Paired upregulation of Notch2 and Six1 is a transcriptional aberration that contributes to preinvasive-to-invasive adenocarcinoma progression by inducing epithelial-mesenchymal transition and nuclear atypia. This aberration persisted in a considerable subset of advanced adenocarcinoma and conferred a more malignant phenotype on the subset.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	12,500,000	3,750,000	16,250,000

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：腫瘍学, 小型肺がん, 肺胞上皮癌, 肺腺癌

1. 研究開始当初の背景

癌死亡を臓器別で見ると第一位である肺癌において、画像診断の向上とCT検診の普及によって近年小型肺癌が爆発的に増加している。小型肺癌には早期癌のみならず進行癌が存在し、手術後に再発を来し、現在の医療を駆使しても予後不良なものが多く含まれる。

2. 研究の目的

小型肺癌には胸部薄切HR-CT画像上すりガラス陰影（ground-glass opacity:GGO）と非すりガラス陰影（Solid）、さらに両者の混在陰影がある。CT画像上でのGGO-混在型-Solidの流れは腫瘍病理学的にはAtypical adenomatous hyperplasia（AAH）-Bronchioloalveolar carcinoma（BAC）-Invasive adenocarcinoma（AD）の悪性化シーケンスに相当すると考えられる。小型肺腺癌の約70%を占める混在型は悪性化シーケンスが実際に同一生体内で具体化した理想的なモデルケースと捉えられる。したがって、この混在病変において、それぞれの成分間に存在する分子機序の差異を明らかにすれば、肺腺癌における浸潤・転移機構に直接関与する遺伝子の同定につながるので、小型肺腺癌に対する治療戦略において非常に重要である。本研究では、HR-CT上GGO・Solid混在病変において病理組織学的なBAC成分と進行癌成分との間で腫瘍細胞レベルでの遺伝子発現・変異比較を網羅的に行い、病変に関連する遺伝子を同定し、有望なmRNAについてはコードする蛋白の機能解析まで行う。これらの解析結果によって、肺腺癌の悪性化シーケンスの分子機構をより深く理解し、新たな肺癌

治療戦略を開発することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

小型肺腺癌のGGO/Solid混在病変において進行癌成分とBAC成分に強く関連する遺伝子発現及び遺伝子増幅を見出すために、以下の手順で実験を行う。

（1）術前の薄切HR-CT所見に基づきGGO/Solid混在病変を有する小型肺腺癌症例を選定する。術後に病理組織診断にてBAC成分と進行癌成分を確認する。

（2）レーザー・マイクロダイセクション法により混在病変内のBAC成分と進行癌成分を構成する腫瘍細胞のみを選択的に採取し、全RNAとゲノムDNAを抽出する。

（3）微量のmRNA及びゲノムDNAを最新の分子生物学的手法によりバイアスなく増幅する。

（4）DNAマイクロアレイ、cDNAライブラリー・サブトラクション、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーションによって遺伝子発現及び遺伝子増幅を比較検討する。

（5）有望な遺伝子については浸潤・転移に関する機能解析を行う。

4. 研究成果

研究の目的である小型肺腺癌における悪性化シーケンスの分子的機序を解析すべく、研究実施計画において挙げた1) 小型肺腺癌 GGO/Solid 混在病変の収集 2) GGO/Solid 混在病変における網羅的な遺伝子発現・遺伝子増幅比較 3) 候補遺伝子の機能解析 の中で、平成22年度までに1)と2)および3)の一部を施行されている。GGO/Solid 混合病変の凍結標本をレーザー・マイクロダイセク

ション法に供して BAC 成分と進行癌成分、すなわち浸潤部と非浸潤部における腫瘍細胞のみを厳密に選択的に採取し、それぞれを抽出した。抽出した total RNA のうちで微量の mRNA を最新の分子生物学的手法により増幅し、増幅 RNA を DNA マイクロアレイに供して浸潤部と非浸潤部との遺伝子発現の違いを網羅的に比較した。浸潤部において高発現する候補遺伝子について、RT-PCR と免疫組織染色にて再現性を確認した。再現性が確認された Notch2 と Six1 について機能解析を行い、Notch2-Six1 転写カスケードとして 2 分子が協調的に一連の遺伝子群の発現を活性化し、肺上皮細胞において epithelial-mesenchymal transition, EMT や核の腫大を促進させることにより肺腺癌の悪性化が進展する可能性を明らかとした。平成 23 年度は 3) として新たに GGO/Solid 混在の肺腺癌症例において 2 分子の免疫組織染色による発現パターンと臨床データとの関連性の検討を行い、2 分子が浸潤部で高発現を認める肺腺癌症例は浸潤部で高発現を認めない症例よりも悪性度が高い可能性が明らかとなった。さらにここまでの研究結果をまとめ、論文として報告した (Clinical Cancer Research 2012 18(4):945-55.)。

これまでの研究結果より明らかとなった肺腺癌悪性化進展メカニズム、Notch2-Six1 転写カスケードの亢進がどのように悪性化進展に寄与するのかに関して更に深く探究することを予定している。同定した転写カスケードではその亢進の引き金として Notch2 の高発現が予想されるが、その高発現の制御は肺腺癌の治療開発に寄与することが考えられる。そこで高発現のメカニズム解析を予定し

ている。また、下流にあたる Six1 の更なる機能解析や、この度の研究で挙げられた悪性化進展促進に働く候補分子の機能解析などの研究の裾野を広げる予定である。

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 1 件)

Mimae T, Okada M, Hagiyaama M, Miyata Y, Tsutani Y, Inoue T, Murakami Y, Ito A. Upregulation of notch2 and six1 is associated with progression of early-stage lung adenocarcinoma and a more aggressive phenotype at advanced stages.

Clinical Cancer Research 査読あり
2012 18(4):945-55.

[学会発表] (計 1 件)

Takahiro Mimae, Morihito Okada, Man Hagiyaama, Yoshihiro Miyata, Yasuhiro Tsutani, Takao Inoue, Kenjiro Aogi, Yoshinori Murakami, Akihiko Ito. Notch2 and Six1 are upregulated during progression of early-stage lung adenocarcinoma and define its unfavorable subset at advanced stages. March 31- April 4, American Association of Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2012, Chicago, USA

[その他]

ホームページ等

なし

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

伊藤 彰彦 (ITO AKIHIKO)
近畿大学・医学部・教授

研究者番号：30273647

(3) 連携研究者

()

研究者番号：