

## 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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591430

研究課題名（和文）

微小転移における網羅的遺伝子解析とその結果に基づく新規癌転移抑制療法の開発

研究課題名（英文） Novel cancer therapy based on gene profiling in micrometastasis

研究代表者

角田 伸行 (TSUNODA NOBUYUKI)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：40542684

研究成果の概要（和文）：

EpCAM陽性乳癌細胞ではFAK (focal adhesion kinase) の発現が亢進しており、FAKの抑制により浸潤能、運動能の優位な低下を認めた。乳癌症例101例でアクチン結合タンパクであるGirdin (Girders of actin filament) 陽性例はKi67陽性例よりもリンパ節転移に関して強い相関を示した。ルミナルタイプ乳癌73例ではKi67とGirdinが陽性であった症例はKi67単独陽性例、Girdin単独陽性例よりリンパ節転移と強い相関を示した。またKi67とGirdinが陽性であった症例は5年無再発生存率が低く、Girdinは乳癌リンパ節転移のマーカーになる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

FAK (focal adhesion kinase), a metastasis related gene, was highly expressed in the EpCAM-positive breast cancer cells. FAK siRNA suppressed the invasion and the motility in breast cancer cell lines. Subsequently, we focused on Girdin (Girders of actin filament), which was actin-binding protein and a substrate of AKT. Immunohistochemistry revealed that the expression of Girdin was significantly associated with lymph node metastasis. We next examined the combined expression of Ki67 and Girdin in the 73 luminal type breast cancer cases. 5-year disease free survivals in Ki67-positive and Girdin-positive cases were the worst, in comparison with other cases.

Our data suggested that Girdin can be a marker for the lymph node metastasis and poor prognosis in patients with breast cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：微小転移、微小転移関連遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

癌転移は手術適応、術式の決定、手術根治度、予後などと関係する診断、治療における重要な因子である。癌転移を認めた症例の5年生存率は5-10%であり、癌転移を認めな

った症例の5年生存率80-96%と比較して、その予後は極めて不良である。従来、癌転移の機序は原発巣から遊離した癌細胞が転移臓器へ到達し、そこで増殖して転移巣になると考えられており、転移能は癌の

進行により獲得されると考えられていた。しかし最近の癌転移に関する研究により癌の転移能は発癌早期に既に決定されており、転移巣が画像診断的に確認されていなくても、既に微小転移が存在していることが明らかになっている (*McGuckin MA, Br J Cancer 1996*)。

これまで行われてきたCT、PETなどの画像検査および切除標本の病理学的検査は微小転移の診断法として不十分である。

また切除または化学療法や放射線療法による治療法も微小転移を考慮したものではなく、新たな診断治療法の開発が必要である。微小転移をおこす癌細胞は転移直後、休眠状態にあり、その大きさを変えないが、その後のシグナル発現により増殖能が亢進し増大すると考えられている。

一般に癌の転移能を原発巣から遊離し、転移臓器に到達するまでの「運動能」と転移臓器で増殖する「増殖能」の2つに分けた場合、運動能より増殖能が重要と考えられている。したがって今後の癌転移治療戦略においては微小転移の増殖抑制が重要であり、そのためには発癌初期の転移巣における微小転移の増殖メカニズムの解明が必要である。

これまで多くの研究者が癌転移に関する標的遺伝子の検索、転移機構に関する新たな知見を得るために転移巣と原発巣を比較した網羅的遺伝子解析の研究 (*Wang Y et al. Lancet. 2005*) を行っており、リンパ節転移と原発巣を比較した研究も散見される (*Wang L et al. World J Gastroenterol. 2006*) が、微小転移および微小転移の増殖能に関する研究報告はない。

そこで、われわれはDNAアレイ法による乳癌のセンチネルリンパ節(腫瘍からの直接リンパ流をうける最初のリンパ節で、ここに最初の転移が生じると1939年Grayが提唱した)と肉眼的転移陽性リンパ節の網羅的遺伝子解析をおこない、微小転移の進行に関するメカニズムを解明する。

問題点としてリンパ節は網内系器官であり、癌は上皮系臓器から発生するため、リンパ節と癌は発生学的に全く異なるものである。センチネルリンパ節そのものの遺伝子解析ではリンパ節由来の遺伝子が混入し、本来上皮に存在していない遺伝子の発現が影響する可能性があるため、セルソーティング法によりリンパ節から転移癌細胞のみを単離し、遺伝子解析をおこなう。網羅的遺伝子解析にて微小転移関連遺伝子を同定し、これらの遺伝子を標的にした分子標的治療を開発する。

## 2. 研究の目的

乳癌センチネルリンパ節における微小転移の同定とリンパ節からのセルソーティング法による転移癌細胞を分離する。分離した転移癌細胞の網羅的遺伝子解析により微小転移関連遺伝子を同定し、分子標的治療およびバイオマーカーの開発を行う。

最終目的は微小転移の関連遺伝子を標的にした新たな分子標的治療により微小転移を制御し、またバイオマーカーにより微小転移の早期診断を可能にし、癌転移の治療成績を向上させることである

## 3. 研究の方法

(1) 乳癌センチネルリンパ節の微小転移の同定およびその網羅的遺伝子解析

セルソーティング法によりリンパ節より転移細胞を分離する。分離した転移癌細胞に対して網羅的遺伝子解析をおこない、微小転移関連遺伝子を同定する。

(2) 微小転移関連遺伝子を標的にした siRNA の開発

微小転移関連遺伝子を標的にした siRNA を作成し、この siRNA を乳癌細胞株に導入し、その発現抑制効果を real time PCR 法、ウェスタンブロット法にて検討する。配列の異なる siRNA、化学修飾をした siRNA を数種類作成し、乳癌細胞株に導入し、その発現抑制効果を real time PCR 法、ウェスタンブロット法にて検討する。

(3) 乳癌細胞株を用いた siRNA の機能解析、とくに副作用などの検討

微小転移関連遺伝子を標的にした siRNA を乳癌細胞株に導入し、MTT アッセイによる増殖能、インベーションアッセイによる浸潤能、トリパンブルー色素排出試験による細胞死の検討を行なう。正常由来細胞、造血幹細胞、骨髄細胞に微小転移関連遺伝子を標的にした siRNA を導入し MTT アッセイによる増殖能、インベーションアッセイによる浸潤能、スクラッチアッセイ法によりその運動能の検討を行なう。

(4) 微小転移関連遺伝子のバイオマーカーとしての有用性に関する検討

乳癌組織を用いて転移関連遺伝子の免疫染色を行いその発現について検討する。

## 4. 研究成果

(1) 乳癌センチネルリンパ節の微小転移の

### 同定およびその網羅的遺伝子解析

乳癌リンパ節標本からセルソーティング法により EpCAM 陽性癌細胞の分離を行なったが、研究に必要な十分量の細胞数を得ることができなかった。そのため磁気ビーズを用いる方法に変更した。乳癌切除標本より EpCAM に対する磁気ビーズを用いて、EpCAM 陽性乳癌細胞と陰性乳癌細胞に分離し、遺伝子解析を行った。EpCAM 陽性乳癌細胞では浸潤転移関連遺伝子 FAK (focal adhesion kinase) の発現が亢進していた。ウェスタンブローディング法でも EpCAM 発現と FAK の発現との間に有意差を認めた。

### (2) 微小転移関連遺伝子を標的にした siRNA の開発

浸潤転移関連遺伝子である FAK (focal adhesion kinase) を標的にした siRNA を作成した。乳癌細胞株 MCF7、Hs578T、MDA-MB231 に導入し、ウェスタンブローディング法により、その FAK タンパクの発現抑制を検討した。いずれの細胞株においても FAK タンパクは抑制された。FAK (focal adhesion kinase) を標的にした配列の異なる siRNA を数種類作成し、同様に乳癌細胞株に導入した。いずれの細胞株においても FAK タンパクは抑制された。また乳癌以外の胆管癌細胞株 HuCCT1、膵癌細胞株 KLM1 においても FAK siRNA による FAK の発現抑制効果が可能であった。

### (3) 乳癌細胞株を用いた siRNA の機能解析、とくに副作用などの検討

FAK (focal adhesion kinase) を標的にした siRNA を作成し、乳癌細胞株 MCF7、Hs578T、MDA-MB231 に導入し、MTT アッセイによる増殖能を検討した。FAK siRNA 導入群と Control siRNA 導入群では増殖能に有意差は認めなかった。膵癌細胞株 KLM1 においても FAK siRNA 導入群と Control siRNA 導入群では増殖能に有意差は認めなかった。また乳癌細胞株 MCF7、Hs578T、MDA-MB231 でのインベーションアッセイによる浸潤能、スクラッチアッセイ法による運動能の検討では、Control siRNA 導入群と比較して FAK siRNA 導入群において浸潤能の有意な低下を認め、運動能の優位な低下を認めた。膵癌細胞株 KLM1 においても同様に浸潤能の有意な低下を認め、運動能の優位な低下を認めた。

### (4) 微小転移関連遺伝子のバイオマーカーとしての有用性に関する検討

FAK 以外の転移関連遺伝子として AKT の基質でアクチン結合タンパクである Girdin (Girders of actin filament) に注目した。乳癌症例101例に関して Ki67、Girdin の免疫染色

(図1)を行ない、臨床病理学的検討を行なった。これら101例において乳癌のマーカーとして通常用いられる ER、PR、Her2 とリンパ節転移には相関を認めなかった。Ki67 陽性例は陰性例と比較してリンパ節転移との相関を認めた。Girdin 陽性例もリンパ節転移との相関を認め、Girdin 陽性例は Ki67 陽性例よりもリンパ節転移に関して強い相関を示した。

次に乳癌症例101例のうち73例のルミナルタイプについて検討した。ルミナルタイプにおいても Ki67 単独陽性例および Girdin 単独陽性例はリンパ節転移と相関を認めた。また Ki67 と Girdin が陽性であった症例では、それぞれの単独陽性例よりリンパ節転移と強い相関を示した。また Ki67 と Girdin が陽性であった症例は、それ以外の症例と比較して5年無再発生存率が低かった (図2)。Girdin は乳癌リンパ節転移のマーカーになる可能性が示唆された。今後臨床応用のためには Girdin 関連分子および分子機構のさらなる解明が必要である。

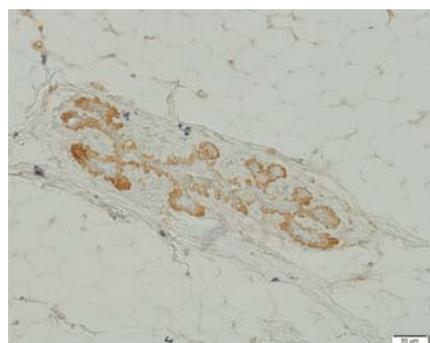


図1. 乳癌における Girdin の発現

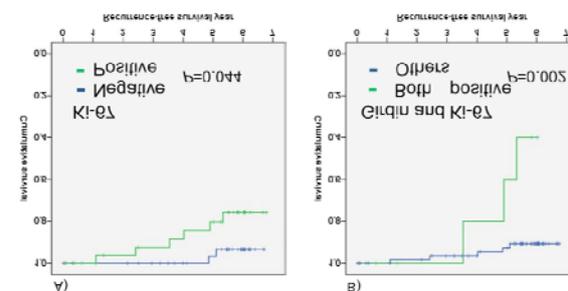


図2. 乳癌における Ki67 と Girdin の発現と5年無再発生存率

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 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角田伸行 (TSUNODA NOBUYUKI)

名古屋大学 医学部附属病院 病院講師

研究者番号 : 40542684

(2) 研究分担者

榑野正人 (NAGINO MASATO )

名古屋大学 大学院医学系研究科 教授

研究者番号 : 20237564

横山幸浩 (YOKOYAMA YUKIHIRO )

名古屋大学 医学部附属病院 講師

研究者番号 : 80378091

國料俊男 (KOKURYO TOSHIO )

名古屋大学 大学院医学系研究科

特任講師

研究者番号 : 60378023

(3) 連携研究者

なし