

## 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3月 31日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659317

研究課題名（和文） 上皮間葉移行から見た小児固形腫瘍の浸潤・転移機構の解明

研究課題名（英文） The role of epithelial-mesenchymal transition in metastasis and progression of pediatric solid tumors.

研究代表者

小室 広昭 (KOMURO HIROAKI)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80296128

研究成果の概要（和文）：上皮-間葉移行(EMT)は上皮細胞が上皮の性質を失い間葉細胞に変化する現象で、近年、癌の浸潤・転移機構に大きく関与していることが明らかになってきた。我々は小児固形腫瘍の代表である神経芽腫における EMT 関連遺伝子の発現レベルを調べ、腫瘍の進展と EMT との関係性を明らかにすることを目的として研究を行った。結果、*KRT19* の低発現は神経芽腫の浸潤・転移と関連があり、さらには予後良好な限局した腫瘍 (stage1, 2) における転移機構にも関与している可能性が示された。*ERBB3* の低発現もまた、神経芽腫の進展に関与していることが示唆された。このように EMT 関連遺伝子の発現は神経芽腫の新しい予後予測因子になる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The epithelial to mesenchymal transition (EMT) is an important mechanism for both the initiation of tumor invasion and subsequent metastasis. We investigated the role of EMT in the progression of Neuroblastoma (NB). Downregulation of *KRT19* was highly associated with tumor progression in NB as well as metastasis in localized primary NB. Low expression of *ERBB3* was also associated with progression of NB. Expression levels of EMT-related genes might become new promising prognostic markers for neuroblastoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	540,000	3,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科

キーワード：上皮間葉移行、小児固形腫瘍、神経芽腫、遺伝子発現、浸潤転移、予後、MYCN

## 1. 研究開始当初の背景

上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)) は細胞同士が接着し一定の極性を持って配列している上皮細胞が、細胞接着性から解放され運動性を獲得した間

葉細胞に移行する現象であり、個体の発生の際にしばしば見られる現象である。ところが最近になって、この EMT が様々な癌の浸潤・転移機構に大きく関与していることが明らかになってきた。すなわち、原発巣において

上皮の性質を保持して互いに接着して腫瘍を形成していた癌は、EMT によって細胞同士の接着性を失い間葉系の性質を獲得して運動能を獲得することによって原発巣から離れることで、浸潤・転移していく。そして転移巣にたどり着いたのちには今度は EMT と逆の形質転換 (MET) によってふたたび接着性を獲得して腫瘍を形成し転移巣となる、という仮説である。一方で小児固形腫瘍は発症時に既に浸潤・転移を伴うことが多く、このことが予後不良の大きな要因になっている。

## 2. 研究の目的

本研究は浸潤や転移を起こしやすい小児固形腫瘍においてこの EMT がどのように関与しているか研究し、小児固形腫瘍における浸潤・転移のメカニズムを解明し、将来的に浸潤・転移を抑制する新たな治療法の開発を目指すことを目的とした。今回は、特に転移・浸潤を起こしやすいことで知られる神経芽腫を用いて小児固形腫瘍の浸潤における EMT の関与について検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) 小児固形腫瘍の代表である神経芽腫の臨床検体から RNA を抽出し、11 検体を用いて 84 の EMT マーカーの発現について RT-PCR アレイキットを用いて定量的にスクリーニングを行った。
- (2) そこで次に神経芽腫 96 症例についてスクリーニングで有意差の見られた EMT 関連遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR 法を用いて比較し、high stage (stage 3, 4) と low stage (stage 1, 2) での比較、stage 1, 2 と stage 4S における比較、MYCN 遺伝子の増幅の有無による比較を検討した。
- (3) さらには、(2) で差の見られた遺伝子について、それぞれの遺伝子発現の高低による生存分析を行った。
- (4) 最後に 5 つの細胞株を用いて Matrigel invasion assay を行い、神経芽腫における細胞浸潤と EMT 関連遺伝子発現の関係について検討した。

## 4. 研究成果

- (1) 11 検体を用いて行ったアレイ解析によるスクリーニングにおいて 7 つの遺伝子 (CALD1, EGFR, DSP, SNAIL2, SPARC, ZEB1 and ZEB2) が high stage と low stage の間で発現に有意な差がみられた。また、5 つの遺伝子 (KRT19, ERBB3, RGS2, TCF3 and TWIST1) の発現が MYCN 遺伝子の増幅の有無によって有意な差がみられた。
- (2) (1) で発現の差がみられた 12 遺伝子について 96 検体を用いて解析した結

果、High stage と low stage の神経芽腫の比較では、high stage で KRT19 の発現が有意に低く、TWIST1 の発現が優位に高いことが判明した。さらに Stage 1, 2 と stage 4S との比較でも KRT19 の発現が stage 4S で有意に低下していることが判明した。MYCN 遺伝子との関連では KRT19、ERBB3 が MYCN 遺伝子増幅症例で有意に低発現だったのに対し、TCF3、TWIST1 は MYCN 遺伝子増幅症例で有意に高発現であった。

- (3) Kaplan-Meier による生存分析を行った結果、KRT19、ERBB3 低発現群では有意差を以って予後が不良であることが判明した。
- (4) 細胞株を用いた *in vitro* 実験では、浸潤率は MYCN 遺伝子増幅と必ずしも相関するものではなかったのに対し、KRT19 および ERBB3 の低発現とは明らかに相関関係があることが判明した。

このような結果から、EMT は神経芽腫の浸潤・転移機構に関与している可能性が示唆されるとともに、KRT19 や ERBB3 など EMT 関連遺伝子の発現が MYCN 以外の新たな予後予測因子になる可能性が示された。

## 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 2 件)

- (1) Nozato M, Kaneko S, Nakagawara A, Komuro H: Epithelial mesenchymal transition-related gene expression as a new prognostic marker for neuroblastoma. International Journal of Oncology 42: 134-140, 2013 査読有 doi:10.1016/j.jpedsurg.2012.11.003
- (2) Hagiwara K, Chen G, Kawazoe N, Tabata Y, Komuro H: Promotion of muscle regeneration by myoblast transplantation using the controlled delivery system of bFGF. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 査読有 doi: 10.1002/term.1732. [Epub ahead of print]

- (3) Komuro H, Hoshino N: Management of cervico-mediastinal neuroblastoma presenting with life-threatening tracheal obstruction in infancy. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* in press 査読有 [Epub ahead of print]
- (4) Ishimaru T, Komura M, Komura H, Otani Y, Komuro H, Sugiyama M, Terawaki K, Suzuki K, Tabata Y, Iwanaka T: Slow release of basic fibroblast growth factor (b-FGF) promotes growth of tracheal cartilage. *J Pediatr Surg.* 48:288-292, 2013 査読有 doi: 10.1016/j.jpedsurg.2012.11.003.
- (5) Fujishiro J, Komuro H, Ono K, Urita Y, Shinkai T, Minami Y, Kawabata Y, Kishimoto H, Masumoto K: Massive pneumatic expansion of lymphatic vessel resulting in cystic lesions in the pulmonary parenchyma: A rare case of persistent interstitial pulmonary emphysema in a non-ventilated infant. *J Pediatr Surg.* 47(12):e21-25, 2012 査読有 doi: 10.1016/j.jpedsurg.2012.09.035
- (6) 石丸哲也、内田広夫、川嶋 寛、小室広昭、古村 眞、杉山正彦、鈴木 完、小西健一郎、魚谷千都絵、岩中 督: 小児固形腫瘍における内視鏡下生検術。小児血液がん学会雑誌 49:289-293, 2012 査読無
- (7) 小室広昭、藤代準、瓜田泰久、新開統子、五藤周、増本幸二、福永潔、大河内信弘、堀哲夫: 肝移植後に肝内胆管の狭窄をきたした1例。日本小児外科学会雑誌 48: 1037-1041, 2012 査読有
- (8) Komuro H, Gotoh C: A case of intrauterine gastric perforation in congenital diaphragmatic hernia. *Pediatric Radiology* 42:1267-1268, 2012 査読有 doi: 10.1007/s00247-012-2435-x.
- (9) Komuro H, Gotoh C, Urita Y, Fujishiro J, Shinkai T: A pediatric case of an unusual type of annular pancreas presenting with duodeno-pancreatic reflux. *Pediatric Surgery International* 28:715-717, 2012 査読有 doi: 10.1007/s00383-012-3065-y.
- (10) Komuro H, Ono K, Hoshino N, Urita Y, Gotoh C, Fujishiro J, Shinkai T, Ikebukuro K: Bile duct duplication as a cause of distal bowel gas in neonatal duodenal obstruction. *Journal of Pediatric Surgery* 46:2301-2304, 2011 査読有 doi: 10.1016/j.jpedsurg.2011.09.018.
- (11) Fujishiro J, Urita Y, Shinkai T, Gotoh C, Hoshino N, Ono K, Komuro H: Clinical characteristics of liver fibrosis in choledochal cyst. *Journal of Pediatric Surgery* 46: 2296-2300, 2011 査読有 doi: 10.1016/j.jpedsurg.2011.09.017
- (12) Fujishiro J, Kaneko M, Urita Y, Hoshino N, Jinbo T, Sakamoto N, Suzuki H, Komuro H: Enteric duplication cyst of the pancreas with duplicated pancreatic duct. *Journal of Pediatric Surgery* 46:e13-6, 2011 査読有 doi: 10.1016/j.jpedsurg.2011.04.056.
- [学会発表] (計4件)
- (1) 小室広昭、野里恵、金子節子、中川原章: 神経芽腫における上皮間葉移行 (EMT) と腫瘍の進展に関する研究。第50回日本小

児外科学会学術集会、東京、2013.5.30

- (2) Komuro H, Nozato M, Kaneko S, Hoshino N, Nakagawara A: Epithelial mesenchymal transition and tumor progression in neuroblastoma. The 44th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, London, 2012.10.7
- (3) 小室広昭、中川原章：神経芽腫における上皮間葉移行（EMT）と腫瘍の進展の関する研究。第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012.9.21
- (4) 野里恵、小室広昭、星野倫子、金子節子、中川原章：EMT関連遺伝子が神経芽腫患者の予後に与える影響。第53回日本小児血液・がん学会学術集会、前橋、2011.11

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

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

○取得状況（計 件）

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

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小室 広昭 (KOMURO HIROAKI)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80296128