

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 29 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791325

研究課題名（和文） 肺腺癌におけるアクアポリン1の発現制御のメカニズム

研究課題名（英文） A mechanism of the aquaporin 1 expression control in the lung adenocarcinoma.

研究代表者 町田 雄一郎(MACHIDA YUICHIRO)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：50460366

研究成果の概要（和文）：アクアポリン(AQP)1の発現メカニズムに関して、エピジェネティック機構のヒストン修飾に注目して研究を行った。AQP1とヒストン修飾に直接関連を認めなかった。しかし、ヒストン修飾の一つである Dimethylated histone3 lysine4(H3K4dime)は肺癌の術後再発と病期と細胞分化で関連を認めた。H3K4dimeはHIF-1とも関連していた。H3K4dimeは、腫瘍の進展や悪性度と関連し、肺癌の予後因子として重要である。

研究成果の概要（英文）：About the expression mechanism of aquaporin (AQP)1, we studied to the histone modification of the epigenetics mechanism. AQP1 was not associated with histone modification directly. However, a postoperative recurrence and a stage and cell differentiation of lung cancer were associated with dimethylated histone3 lysine4(H3K4dime) which was histone modification one. H3K4dime was associated with HIF-1, too. H3K4dime is associated with extension and the grade of the lung cancer, and is important as a prognostic factor of lung cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,600,000 | 780,000 | 3,380,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：胸部外科学

キーワード：肺腺癌、アクアポリン1、ヒストン修飾、術後転移

1. 研究開始当初の背景

肺癌は高い浸潤・転移能を特徴とする。HRCT、FDG-PET、VATSの導入により術前診断と外科的治療は格段に進歩した。しかし、未だ多くの肺癌患者は転移再発の

ため悲惨な転帰をとる。近年、PDGFR・チロシンキナーゼ系やVEGF系を標的にした生物学的製剤の応用が開始されたが、その効果は満足できるものではない。アクアポリン aquaporin (AQP)は、あらゆる生命現象の基盤をなす水分子に対する特

異的チャンネルとして 1992 年 Agre らにより発見された。現在までにヒトでは 13 種の異なる分子種が同定され、チャンネル機能と DNA 配列の相同性から 4 群に分類され、それらの生理的、病理的状态での機能解析が精力的に進められている。近年、AQP には本来の水チャンネル機能のほかに、アポトーシス阻止、細胞周期の調節、移動能亢進、血管新生など予期せぬ機能があることが見いだされ、細胞増殖や浸潤・転移などがんの生物学的特性に重要な役割を果たしている可能性が提唱された。近年、分子標的薬の開発により治療に幅が生まれたが、その効果は満足できるものではない。AQP は、あらゆる生命現象の基盤をなす水分子に対する特異的チャンネルとして発見され、細胞増殖や浸潤・転移などに重要な役割を果たしている可能性が提唱され、我々は AQP1 の過剰発現が術後転移発生と生命予後に密接に関係していることをこれまでに明らかにした。

エピジェネティックは、同一 DNA 配列から異なった表現型を誘導する仕組みで、癌における遺伝子発現抑制での役割が現在注目されている。肺癌細胞を含め AQP1 の腫瘍細胞での発現調節機構の報告は数少なく、エピジェネティック制御機構に関しては全く知られていない。種々の腫瘍におけるこれまでの情報から、「肺癌浸潤先進部での AQP 遺伝子の発現誘導においてヒストン修飾が重要な役割を演じているのでは」という仮説に至った。

2. 研究の目的

肺癌術後転移克服のための癌浸潤性局所制御法の確立を目標とし、肺癌浸潤先進部における AQP1 の発現誘導とヒストン修飾の関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 組織標本

組織標本は、2001 年から 2008 年の間に、金沢医科大学病院呼吸器外科で切除された肺癌標本 92 例を対象とした。そして、癌浸潤部を Spiral array 法により組織マイクロアレイを作製した。

(2) ヒストン修飾

Dimethylated histone3 lysine 4 (H3K4dime), Acetylated histone3 lysine9 (H3K9Ac), Acetylated histone3 lysine18 (H3K18Ac), Trimethylated histone3

lysine27 (H3K27trime), Dimethylated histone4 arginine3 (H4R3dime) の 5 つを使用した。

(3) 免疫組織染色

① AQP1 の免疫染色

AQP1 (alpha diaganosis) の濃度は 150 倍で行われた。腫瘍細胞の 10% 以上の反応があった場合、発現は陽性であると定義した。さらに腫瘍細胞の 10% 以上過剰反応があった場合、発現は過剰発現であると定義した。

② ヒストン修飾の免疫染色

H3K4dime・H3K9Ac・H3K18Ac・H3K27trime・H4R3dime (5 つ全て abcam) の 5 つともに濃度は 100 倍で行われた。50% 以上発現のものを高発現、50% 以下発現のものを低発現とした。

③ HIF-1 α の免疫染色

HIF-1 α (Epitomics) の濃度は 100 倍で行われた。50% 以上発現しているものを高発現、50% 以下発現のものを低発現とした。

④ 癌関連マーカー (CEA, p53, Ki67) の免疫染色

癌関連マーカー (CEA, p53, Ki67) の濃度は 100 倍で行われた。CEA は腫瘍細胞の 60% 以上を陽性、p53 は腫瘍細胞の 30% 以上を陽性、Ki67 は腫瘍細胞の 10% 以上を陽性と判断した。

(4) Western blot

H3K4dime の Western blot は、肺癌の腫瘍組織に対して行われた。タンパクはリーシス・バッファ (50mM のトリス-HCl, pH 7.6、10% のグリセロール、5mM の酢酸マグネシウム、0.2mM のエチレンジアミン四酢酸、1mM のフェニルメチルスルホニル弗化物と 1% のナトリウム・ドデシル硫酸塩) を使用して抽出された。抽出されたタンパク (10 μ g) は、10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。電気泳動した抗原タンパクをニトロセルロース膜に電気的に移行させた。ニトロセルロース膜は、2 μ g/ml の濃度で、抗 H3K4dime ポリクローナル抗体を使用して、4 $^{\circ}$ C で終夜反応した。二次抗体は、室温で 1 時間ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いて行った。ニトロセルロース膜は Chemiluminescence Luminol Reagent で反応し、ATTO Light-capture を使用して撮影された。

(5) 統計解析

臨床的エンドポイントは、治療開始から転移のない生存期間とした。AQP 発現と臨床病理因子の間の比較のために、 χ^2 検定を使用し、 $p < 0.05$ で統計学的に有意であるとみなした。すべての統計解析は、StatView ソフトウェアを使用して行われた。

4. 研究成果

(1) AQP1 の過剰発現と HIF-1 α ・癌関連マーカーの関連

AQP1 の過剰発現と HIF-1 α の関係に関して、有意差を認めなかった。しかし、AQP1 の過剰発現と癌関連マーカーである Ki67 に有意差を認めた。その他の癌関連マーカーとは有意差を認めなかった。

(2) 肺癌におけるヒストン修飾の関係

① 肺癌術後再発

肺癌術後再発とヒストン修飾に関して、H3K4dime の発現で有意差を認めた ($p=0.0391$)。また、Kaplan-Meier 法で、log-rank 検定で $p < 0.05$ で有意差を認め、H3K4dime の高発現は肺癌術後再発と関連があるということが示された。単変量解析では、H3K4dime の発現は有意差を認めたが、多変量解析では、有意差を認めなかった。Western blot 法では、術後再発を認めない症例で H3K4dime の発現を認めず、術後再発を認めた症例で H3K4dime の発現を認めた。

② 肺癌の病期

肺癌の病期とヒストン修飾に関して、H3K4dime で有意差 ($p=0.005$) を認めた。

③ 細胞分化度 (肺腺癌のみ)

肺癌の細胞分化とヒストン修飾に関して、H3K4dime ($p < 0.001$) ・ H3K9Ac ($p < 0.017$) ・ H4R3dime ($p < 0.002$) で有意差を認めた。

④ ヒストン修飾と HIF-1 α の関係

HIF-1 α の発現とヒストン修飾の関係に関して、H3K4dime で有意差を認めた。

以上のことより、H3K4dime は、腫瘍の進展や悪性度と関連し、肺癌の予後因子として重要であることが示唆された。

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 町田雄一郎、上田善道、田中良、上野正克、相川広一、薄田勝男、佐川元保、佐久間勉. 肺腺癌におけるアクアポリンの役割. 肺癌 52(1):17-22, 2012, 査読有り
- ② Yuichiro Machida, Yoshimichi Ueda, Miyako Shimasaki, Katsuaki Sato, Motoyasu Sagawa, Shogo Katsuda and Tsutomu Sakuma. Relationship of aquaporin 1, 3 and 5 expression in lung cancer cells to cellular differentiation, invasive growth and metastasis potential. Human Pathology 42(5):669-78, 2011, 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

- ① 町田雄一郎、上田善道、田中良、上野正克、相川広一、薄田勝男、佐川元保、佐久間勉 AQP1 は粘液産生型細気管支肺胞上皮癌の予後因子 第 52 回肺癌学会大阪 2011. 11. 3
- ② 町田雄一郎、上田善道、田中良、上野正克、相川広一、薄田勝男、佐川元保、佐久間勉 Micropapillary pattern を含む肺腺癌の検討 第 28 回日本呼吸器外科学会総会 別府 2011. 5. 12
- ③ Yuichiro Machida, Yosimichi Ueda, Miyako Simasaki, Katsuaki Sato, Motoyasu Sagawa, Shogo Katsuta, Tsutomu Sakuma. Relationship of aquaporin 1, 3 and 5 expression in lung cancer cells to cellular differentiation, invasive growth and metastasis potential. , American Thoracic Society, New Orleans, 2010. 5. 16
- ④ 町田雄一郎、上田善道、田中良、上野正克、相川広一、薄田勝男、佐川元保、佐久間勉 肺癌におけるアクアポリン 1, 3, 5 の役割。第 27 回日本呼吸器外科学会仙台 2010. 5. 13

6. 研究組織

(1) 研究代表者

町田 雄一郎 (MACHIDA YUICHIRO)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：50460366