

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590395

研究課題名(和文) 肺癌におけるオートファジー関連因子の意義と癌化バイオマーカーとしての有用性

研究課題名(英文) Importance of autophagy-associated molecules in lung cancer cases

研究代表者

瀧北 幹子(鈴木幹子)(Takikita-Suzuki, Mikiko)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90335167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌手術検体を含むTMA (tissue microarray) を用いてautophagyに關与するRB1CC1とp62の染色態度のスコアリングを行った。肺癌ではRB1CC1が細胞質に発現しており、予後不良を反映していた。p62の発現を検討したところ、RB1CC1およびp62が共発現している群は他に比べて特に治療成績不良で、p62は肺癌症例予後不良のバイオマーカーになり得ると考える。

口腔扁平上皮癌では、p62は癌細胞のグルタチオン誘導に寄与し、放射線治療抵抗性を惹起した。臨床病理評価に於いてもp62蓄積を認める症例は予後不良であり、p62は新規の臨床病理的バイオマーカーになると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Stainings of autophagy-associated molecules, p62/SQSTM1 and RB1CC1, were scored by using a tissue microarray of lung cancers. RB1CC1 is expressed only in the cytoplasm of lung cancers, suggesting to the poor prognosis. p62/SQSTM1 accumulation was further associated with the worse survival, especially the worst in the cases with both expressions of p62/SQSTM1 and RB1CC1. p62/SQSTM1 could become a biomarker of worse prognosis in lung cancer cases.

In oral squamous cell carcinoma, p62/SQSTM1 contributed to induce glutathione in oral carcinoma cells, and to cause a resistance to radiation therapy. Clinico-pathological detection of p62/SQSTM1 accumulation could predict poor prognosis, and could be a novel biomarker in the cases of oral squamous cell carcinomas.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：tissue microarray biomarker autophagy RB1CC1/FIP200 p62/SQSTM1 Nrf2

1. 研究開始当初の背景

Autophagy 経路の異常と癌化については医科学における hot topic である。しかし、未だ確定的見解には乏しい。本経路の選択的基質である p62/SQSTM1 (sequestosome1) は Caspase8 apoptosis 経路と NFκB survival 経路、両経路の調節をするハブ機能を持ち、その蓄積は Nrf2-Keap1 系を調節することで、細胞死抵抗性を亢進させる (Komatsu, et al. Nat Cell Biol 2010)。一方、p62 の蓄積自身が組織の酸化ストレスも上昇させ、DNA damage を増加し、更なる genome instability、癌化を促進させる (Mathew, et al. Cell 2009)。

我々は RB1CC1 分子の同定 (Chano, et al. Nature Genet 2002; Oncogene 2002; Gene 2002) 以来、分子機能解析とともに各種癌のバイオマーカー探索も続けてきた (Minami et al. Clin Cancer Res 2010、他)。RB1CC1 は RB 経路を増強する癌抑制機能を持つ一方 (Ikebuchi, et al. Int J Cancer 2009; Chano et al. PLoS One 2010)、autophagy 必須分子としても機能する (Mizushima. Curr Opin Cell Biol 2010; Morselli & Chano, et al. 2011) が、我々は RB1CC1 機能の異常が乳癌や神経変性疾患と深い関わりを持ち (Chano, et al. PLoS One 2010; Brain Res 2007)、p62 の蓄積を伴うことも見出して来ていた。

本研究では、肺癌、頭頸部癌 (特に口腔内癌) で p62 蓄積が顕著であり、本分子が早期癌臨床診断マーカーになる可能性を見出していたので、先ず、肺癌、口腔内癌における RB1CC1-p62 経路の異常を検討し、臨床経過等との関連を評価した。

2. 研究の目的

発癌過程における、RB1CC1-p62 経路の異常を検討することで、autophagy と癌化という医科学上の hot topic の解明に寄与する。

とともに、臨床病理学、臨床検査医学によりダイナミックに貢献して行くことも目標とした。肺癌や口腔内癌など酸化ストレス抵抗性組織の発癌過程における発現解析を病理組織学的に遂行することで、当該組織の発癌における RB1CC1-p62 経路異常、特に早期発癌における意義を解明できると考えた。

肺癌に於いては、早期癌の検出が重大且つ困難な課題となっているが、血清学的にも p62 検出 (異常蓄積) が可能になれば、早期の肺癌の検出限界を大きく改善し、臨床医学的にも非常に大きな貢献になると考えた。

これらを目標として研究を進めた。

3. 研究の方法

本研究では、発癌過程における RB1CC1-p62 経路異常を、まず免疫組織化学的手法にて検討し、早期発癌過程におけるその異常の意義を検証する。肺癌や口腔内癌など酸化ストレス抵抗性の高い組織に於ける発癌過程に特に注目している。当該組織での発癌における RB1CC1-p62 経路異常、酸化ストレス抵抗性との関連等、早期発癌における意義を明らかにしたい。

一方、早期の肺癌検出は極めて困難であり、現在もこれが診療上の大きな課題として残っている。早期肺癌症例の p62 検出 (異常蓄積) を血清学的に可能にすることは、肺癌の早期発見検出限界を大きく改善する可能性があったので、これにも挑戦した。

(1) 肺癌を中心とした RB1CC1, p62/SQSTM1 のバイオマーカー的評価

本研究では、これまでの我々の予備的研究を系統的に完成させ、腫瘍状病変における p62/SQSTM1 の検出が、肺癌、口腔内癌を代表として、各種の癌の早期発見や病期の診断に有用であるのか否かを検証する。肺癌、口腔内癌において、この解析を迅速に遂行する為、186 例の日本人、非小細胞型肺癌組織を含む Tissue Microarray を用いて、臨床病理

学的な RB1CC1-p62 の評価を行い、これらのバイオマーカー的意義の検証を行った。

(2). 肺癌、口腔内癌における RB1CC1～p62/SQSTM1、Nrf2 発現異常の検討

肺、気管支、口腔内組織は、食物、タバコ等、通常時より酸化ストレス物質に曝されており、酸化ストレス抵抗性の高い組織である。肺上皮、口腔内上皮は、抗酸化ストレス分子 Nrf2 が元来、発現しており、酸化ストレス抵抗性が高い。このような組織に於いて autophagic-lysosome 分解経路異常により p62/SQSTM1 の蓄積が生ずると、蓄積組織は容易に酸化ストレス抵抗性、細胞死抵抗性となる。この観点より、肺、気管支、口腔内組織における癌化、酸化ストレス抵抗性、等を検証した。

肺癌、口腔内癌における RB1CC1-p62 の発現異常を検討すると併行して、抗酸化ストレス分子である Nrf2 の発現状態（発現量とともに細胞核内での分布や発現状態）、これらを臨床病理組織学的に解析し、肺癌、口腔内癌の発癌過程、癌化促進過程を詳細にした。そして、本知見を臨床病理学的診断における診断指標としてベッドサイドに役立てて行くことを企画した。

(3). 早期肺癌症例における血清内 p62/SQSTM1 検出への挑戦

肺癌は約半数以上が進行癌状態で発見され、治療成績も芳しくはない。より早期の病変検出、早期治療は肺癌治療に於ける最大の重要課題である。本観点から、早期肺癌症例における p62/SQSTM1 分子の血清学的検出に挑戦する計画であった。臨床検査医学的汎用性、実施医療への適用性を鑑みて、肺癌症例血清中の p62/SQSTM1 蛋白の検出を ELISA アッセイの系にて試行した。

4. 研究成果

肺癌手術症例を含む TMA (tissue microarray) を用いて autophagy に関与する

RB1CC1とp62の免疫染色を施行し、腫瘍細胞の細胞質および核における染色態度のスコアリングを行った。RB1CC1の核内発現は腫瘍抑制に関与していると考えられ、乳癌においてはその発現の増加が臨床的予後の良好なことを示唆する。しかし、肺癌ではRB1CC1の核内発現は乏しく、細胞質にのみ発現しており、腫瘍抑制的には機能していないことが示唆された。このことよりRB1CC1は組織依存性のバイオマーカーである可能性が示唆された。一方、RB1CC1の細胞質発現はオートファジーの制御に必須と考えられている。肺癌ではRB1CC1が細胞質で発現しており、肺癌自身の治療成績、予後の不良と関連している可能性が考えられた。次にp62/SQSTM1の発現を検討したところ、RB1CC1およびp62が共発現している群は他に比べて5年生存率は不良であった。p62の発現を陰性、弱陽性、強陽性に分けて評価したところ、p62強陽性群では5年生存率が最も不良となり、p62/SQSTM1の過剰発現、蓄積は肺癌症例予後不良のバイオマーカーになり得ると考えた。本内容は、論文にて発表を準備中である。

一方、口腔扁平上皮の癌化における p62/SQSTM1 の役割とその臨床的意義を検討した。口腔扁平上皮癌、異形成上皮、正常上皮において p62 の免疫組織化学的評価を行い、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株を用いた p62 の生物学的機能解析も行った。細胞生物学的な解析より、p62 は癌細胞のグルタチオン誘導に寄与し、放射線治療抵抗性と関連することが示唆された。組織評価において口腔扁平上皮癌で p62 の過剰発現を示す症例は予後不良であった。p62/SQSTM1 の過剰発現、蓄積は口腔扁平上皮の癌化に寄与し治療抵抗性、予後不良のバイオマーカーになり得ることが実証し得た。本内容は論文として報告したが、2013 年 8-9 月に新聞各紙でも報道された。

肺癌患者の p62/SQSTM1 蛋白の血清学的検出を目的として ELISA 法の確立を現在も

試行錯誤中である。市販の各種抗 p62/SQSTM1 抗体を用いた ELISA の系にて、段階的希釈した p62 抗原との反応性、定量性について検討しているが、安定した結果を得られる抗体の組み合わせについて、未だ決定できていない。今後の課題と考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Isono T, Chano T, Kitamura A, Yuasa T. Glucose deprivation induces G2/M transition-arrest and cell death in N-GlcNAc₂-modified protein-producing renal carcinoma cells. **PLoS One**. 2014. 9(5): e96168. (査読有)
2. Kitano H, Chung JY, Ylaya K, Conway C, Takikita M, Fukuoka J, Doki Y, Hanaoka J, Hewitt SM. Profiling of Phospho-AKT, Phospho-mTOR, Phospho-MAPK and EGFR in Non-small Cell Lung Cancer. **J Histochem Cytochem**. 2014; 62(5): 335-346. (査読有)
3. Inui T, Chano T, Takikita M, Nishikawa M, Yamamoto G, Okabe H. Association of p62/SQSTM1 excess and oral carcinogenesis. **PLoS One**. 2013. 8(9): e74398. (査読有)
4. Isono T, Chano T, Okabe H, Suzaki M. Study of Global Transcriptional Changes of N-GlcNAc₂ Proteins-Producing T24 Bladder Carcinoma Cells under Glucose Deprivation. **PLoS One**. 2013. 8(4): e60397. (査読有)
5. Uchiyama K, Nakanishi G, Fujimoto N, Takikita M, Tanaka T. Localized linear epidermolytic epidermal nevus of male genitalia with a recurrent keratin 10 mutation, p.Arg156His. **Eur J Dermatol**. 2013; 23(4): 557-558. (査読有)
6. Chung JY, Kitano H, Takikita M, Cho H, Noh KH, Kim TW, Ylaya K, Hanaoka J, Fukuoka J, Hewitt SM. Synaptonemal complex protein 3 as a novel prognostic marker in early stage non-small cell lung cancer. **Hum Pathol**. 2013; 44(4): 472-479. (査読有)
7. Yoshida K, Miyahira Y, Ishida M, Iwai M, Kagotani A, Arita N, Iwamoto N, Takikita M, Kojima F, Okabe H. Ascitic fluid due to type II herpes simplex virus infection: report of a case with immunocytochemical confirmation. **Diagn Cytopathol**. 2013; 41(4): 354-359. (査読有)
8. Hama Y, Chano T, Inui T, Matsumoto K, Okabe H. Preparation of mouse monoclonal antibody for RB1CC1 and its clinical application. **PLoS One**. 2012. 7(3): e32052. Epub 2012 Mar 1. (査読有)
9. Lenz P, Pfeiffer R, Baris D, Schned AR, Takikita M, Poscablo MC, Schwenn M, Johnson A, Jones M, Kida M, Cantor KP, Rothman N, Silverman DT, Hewitt SM, Moore LE. Cell-cycle control in urothelial carcinoma: large-scale tissue array analysis of tumor tissue from Maine and Vermont. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2012; 21(9): 1555-1564. (査読有)
10. Levine PH, Portera CC, Hoffman HJ, Yang SX, Takikita M, Duong QN, Hewitt SM, Swain SM. Evaluation of lymphangiogenic factors, vascular endothelial growth factor D and E-cadherin in distinguishing inflammatory from locally advanced

breast cancer. **Clin Breast Cancer.**

2012; 12(4): 232-239. (査読有)

11. 茶野徳宏. 診療における新規マーカーの探索と適用. 臨床病理. 60(2): 167-173. 2012. (査読無)
12. Takikita M, Xie R, Chung JY, Cho H, Ylaya K, Hong SM, Moskaluk CA, Hewitt SM. Membranous expression of Her3 is associated with a decreased survival in head and neck squamous cell carcinoma. **J Transl Med.** 2011; 9: 126. (査読有)

[その他]

新聞報道

2013年8月24日	中日新聞 (朝刊) 産経新聞 (夕刊)
2013年8月27日	朝日新聞 (朝刊)
2013年8月30日	京都新聞 (朝刊)
2013年8月30日	毎日新聞 (朝刊)

6. 研究組織

(1)研究代表者

瀧北 幹子 (TAKIKITA-Suzuki Mikiko)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90335167

(2)研究分担者

茶野 徳宏 (CHANO Tokuhiro)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 40346028

(3)連携研究者

なし

研究者番号: