

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590428

研究課題名(和文) 異型性の分子基盤の追求(がん遺伝子KRAS下流分子のプロテオーム解析から)

研究課題名(英文) The molecular basis of morphological atypism (proteome analysis of KRAS downstream factors)

研究代表者

奥寺 康司 (OKUDELA, KOJI)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：10326027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：研究の目的は、プロテオーム解析によるKRAS下流分子の網羅的検索から、異型性発現の責任分子を同定し、その分子基盤の一端を明確にすることであった。本課題では、細胞内塩素イオン制御分子であるCLIC4に着目して研究を進めた。複数の肺がん細胞株において非がん細胞と比較して顕著な発現低下が認められた。肺癌外科切除材料での解析では、分化度の低下に伴ってCLIC4発現レベルが低下する傾向が見られた。不死化細胞にCLIC4のノックダウンを行ったところ、核の腫大など形態変化が現れた。KRAS下流分子のプロテオーム解析からCLIC4を同定し、その発現低下が異型性の一因であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A purpose of present study is to elucidate a molecular basis of morphological atypism. This study investigated the proteome modulated by oncogenic KRAS in immortalized airway epithelial cells. We here focused on CLIC4 to investigate its potential involvement in an induction of the morphologic atypism in lung cancers. CLIC4 protein levels were reduced in some lung cancer cell lines. The knockdown of CLIC4 in an immortalized airway cell line modulated a cell shape as marked enlargement of cells and nuclei. CLIC4 protein levels tended to be lower in high-grade tumors. These results suggest that the alteration in CLIC4 could induce some morphological atypism of neoplastic cells and could be involved in carcinogenesis of the lung.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：atypism lung cancer

## 1. 研究開始当初の背景

形態異常(異型性)はがん細胞に共通にみいだされる特徴であり、がんの病理組織診断において極めて重要な指標である。しかしながら、異型性を引き起こす分子基盤について積極的な研究がなされていない。申請者は、2009年までの研究において、がん遺伝子 **KRAS** が、ヒト気道上皮細胞に著しい形態変化を誘導することを明らかにしていた(Okudela-K et al., Am J Pathol 2009)。**KRAS** よって誘導される形態変化は、細胞の大型化・大小不同・歪化、多数の突起物の出現(仮足の進展)、核の大型化・大小不同・歪化、核クロマチン不規則な凝集、細胞間結合の不安定化が本態であった(図1)。これらは、がん細胞にみられる異型性と極めて類似した変化であり、**KRAS** 導入細胞は異型性の分子基盤を追求するうえで有用な研究材料となると考えられた。更に研究を進め、細胞の大型化、仮足の進展、細胞間結合の不安定化の一部が **KRAS-PI3K** 経路を介した細胞膜リン脂質の過剰な集積によってもたらされることを明らかにした(Okudela-K et al., Pathol Int 2008)。また、一方、遺伝子発現マイクロアレイを用いた **KRAS** 下流分子の網羅的検索から異型性に関わる複数の候補分子を抽出し、塩素イオンチャンネル制御因子 **FXYD3** の発現低下が細胞輪郭の歪化を引き起こすことを明らかにしてきた(Okudela-K et al., Am J Pathol 2009)。この成績は、**KRAS** 導入細胞の発現解析が異型性の分子基盤を追求するうえで優れた戦略であることを示していた。

## 2. 研究の目的

当該研究の目的は、二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析による **KRAS** 下流分子の網羅的検索から、異型性発現の責任分子を同定し、その分子基盤の一端を明確にすることであった。

## 3. 研究の方法

### (1) **KRAS** 下流分子群のプロテオーム解析

空ベクター、野生型 **KRAS**、活性変異型 **KRAS** (がん遺伝子 **KRAS**) を不死化気道上皮細胞株に導入、蛋白質を抽出、それぞれを蛍光ラベルし、二次元電気泳動で展開した(図2)。空ベクター導入細胞と野生型 **KRAS** 導入細胞の何れと比較しても変異型 **KRAS** 導入細胞において2倍以上の輝度変化を示すスポットの一次構造解析を行い、変異型 **KRAS** 下流蛋白質群を同定した(**CLIC4** [NM\_013943]; **CSTL1** [NM\_001912]; **VIM** [NM\_003380]ほか)。

### (2) 候補分子の選抜

表1で同定した候補分子群のなかから複数回でされた分子(**VIM**、**CLIC4**、**CSTL1**)に焦点を当てて解析を進めた。これらの分子の発現が変異型 **KRAS** 遺伝子の導入によって発現変動することを検証し、これまでの申請者らの研究(塩素イオンチャンネル制御因子 **FXYD3** の発現低下が細胞輪郭の歪化を引き起こすことを明らかにした成果(Okudela-K et al., Am J Pathol 2009))を考慮し、当該課題では、特に、細胞内塩素イオン制御分子である **CLIC4** に着目して研究を進めた。

### (3) 肺がん細胞株における発現解析

肺がん細胞株18株における **CLIC4** の発現をウエスタンブロット法で解析した。非がん不死化細胞(**NHBE-T**)と比較して、3細胞株で低い **CLIC4** 蛋白質発現が見られた。

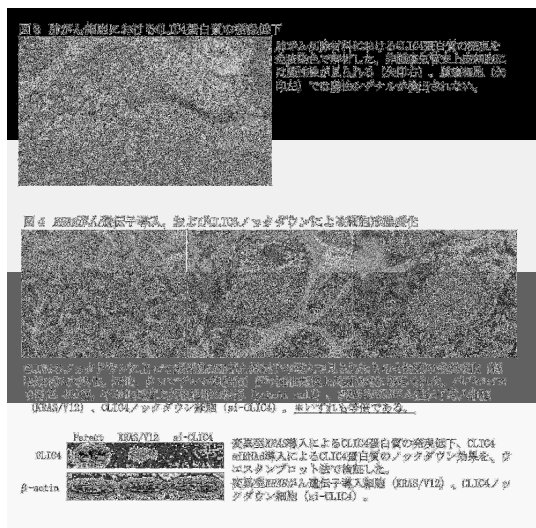
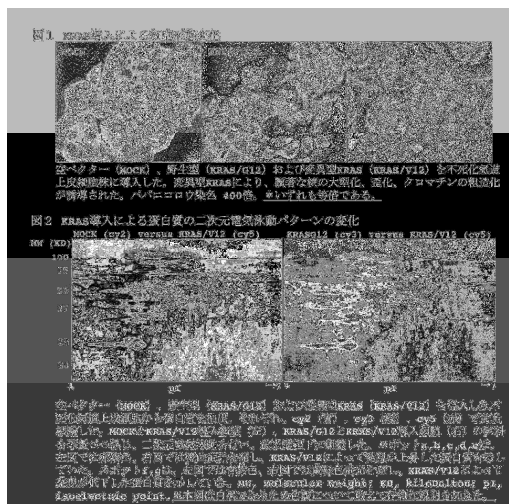
### (4) 肺がん組織における発現解析

肺がん切除組織235例における **CLIC4** の発現を免疫染色法によって解析した。非がん部組織では、気管支上皮細胞と肺胞上皮細胞において **CLIC4** の発現が確認できた(図3)。がん細胞では、**CLIC4** の発現レベルは症例によって様々であったが、全体としては非がん部上皮細胞と比較してがん細胞で発現レベルの低い傾向が見られた(図3)。また、腺癌においては、分化度の低下に伴って **CLIC4**

発現レベルが低下する傾向が見られた。

#### (5) CLIC4 発現操作の生物学的作用

不死化気道上皮細胞に、siRNA による CLIC4 のノックダウンを行った。細胞の大型化、核の腫大など形態変化が現れた (図 4)。増殖は低下した。一方、CLIC4 の発現低下を示す肺癌細胞株 A549 細胞に、CLIC4 の強制発現を行った。増殖活性の高度抑制認められたが、細胞形態の変化は顕在化しなかった (結果示さず)。



#### 4. 研究成果

申請当初の計画とおり研究を遂行した。KRAS 下流分子のプロテオーム解析から CLIC4 を同定し、その発現低下が細胞の大型化や核腫大といった異型性の一因であることを示唆する結果を得ることができた。当該課題の成果の一部を論文発表した (Okudela-K et al., PLoSOne 2009)。特に培養条件下での細胞形態の変化については更に検証を進めており論文作成・投稿準備中である。

#### 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 16 件)

① Sekine A, Takemura T, Baba T, Oda T, Iwasawa T, Okudela K and Ogura T. Two cases of pulmonary sarcoidosis presenting with subpleural reticular shadows in the lower lobes. Intern Med 2014; 53: 455-460. 査読有り

② Oshiro H, Fukumura H, Nagahama K, Sato I, Sugiura K, Iobe H, Okiyama E, Nagao T, Nagashima Y, Aoki I, Yamanaka S, Murakami A, Maegawa J, Chishima T, Ichikawa Y, Ishikawa Y, Nagai T, Nomura M, Ohashi K and Okudela K.

Establishment of successively transplantable rabbit VX2 cancer cells that express enhanced green fluorescent protein. Med Mol Morphol 2014;

DOI10.1007/s00795-013-0052-x 査読有り

③ Okudela K, Katayama A, Woo T, Mitsui H, Suzuki T, Tateishi Y, Umeda S, Tajiri M, Masuda M, Nagahara N, Kitamura H and Ohashi K. Proteome Analysis for Downstream Targets of Oncogenic KRAS - the Potential Participation of CLIC4 in Carcinogenesis in the Lung. PLoS One 2014; 9: e87193. 査読有り

④ Ikeda S, Sekine A, Kato T, Yoshida M, Ogata R, Baba T, Nagahama K, Okudela K and Ogura T. Diffuse alveolar hemorrhage as a fatal adverse effect of bevacizumab: an autopsy case. Jpn J Clin Oncol 2014; 44: 497-500. 査読有り

⑤ Arai H, Inui K, Watanabe K, Watanuki K, Okudela K, Tsuboi M and Masuda M. Lung abscess combined with chronic osteomyelitis of the mandible successfully treated with video-assisted thoracoscopic

surgery. Clin Respir J 2014; DOI 10.1111/crj.1211 査読有り

⑥ Tateishi Y, Furuya M, Kondo F, Torii I, Nojiri K, Tanaka Y, Umeda S, Okudela K, Inayama Y, Endo I and Ohashi K. Hepatocyte nuclear factor-1 alpha inactivated hepatocellular adenomas in patient with congenital absence of the portal vein: a case report. Pathol Int 2013; 63: 358-363. 査読有り

⑦ Okudela K, Woo T, Mitsui H, Suzuki T, Tajiri M, Sakuma Y, Miyagi Y, Tateishi Y, Umeda S, Masuda M and Ohashi K. Downregulation of ALDH1A1 expression in non-small cell lung carcinomas--its clinicopathologic and biological significance. Int J Clin Exp Pathol 2013; 6: 1-12. 査読有り

⑧ Okudela K, Mitsui H, Suzuki T, Woo T, Tateishi Y, Umeda S, Saito Y, Tajiri M, Masuda M and Ohashi K. Expression of HDAC9 in lung cancer - potential role in lung carcinogenesis. Int J Clin Exp Pathol 2013; 7: 213-220. 査読有り

⑨ Okudela K. An association between nuclear morphology and immunohistochemical expression of p53 and p16INK4A in lung cancer cells. Med Mol Morphol 2013; 査読有り

⑩ Nishii T, Tanabe M, Tanaka R, Matsuzawa T, Okudela K, Nozawa A, Nakatani Y and Furuya M. Unique mutation, accelerated mTOR signaling and angiogenesis in the pulmonary cysts of Birt-Hogg-Dube syndrome. Pathol Int 2013; 63: 45-55. 査読有り

⑪ Arai H, Okudela K, Oshiro H, Komitsu N, Mitsui H, Nishii T, Tsuboi M, Nozawa A, Noishiki Y, Ohashi K, Inui K and Masuda M. Elevated microsatellite alterations at

selected tetra-nucleotide (EMAST) in non-small cell lung cancers--a potential determinant of susceptibility to multiple malignancies. Int J Clin Exp Pathol 2013; 6: 395-410. 査読有り

⑫ Woo T, Okudela K, Mitsui H, Tajiri M, Yamamoto T, Rino Y, Ohashi K and Masuda M. Prognostic value of the IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma in stage I disease of Japanese cases. Pathol Int 2012; 62: 785-791. 査読有り

⑬ Okudela K, Woo T, Mitsui H, Tajiri M, Masuda M and Ohashi K. Expression of the potential cancer stem cell markers, CD133, CD44, ALDH1, and beta-catenin, in primary lung adenocarcinoma--their prognostic significance. Pathol Int 2012; 62: 792-801. 査読有り

⑭ Kobayashi N, Uemura H, Nagahama K, Okudela K, Furuya M, Ino Y, Ito Y, Hirano H, Inayama Y, Aoki I, Nagashima Y, Kubota Y and Ishiguro H. Identification of miR-30d as a novel prognostic maker of prostate. Oncotarget. 2012; 3: 1455-71. 査読有り

⑮ Arai H, Inui K, Hashimoto K, Kan OK, Nishii T, Kishida H, Okudela K, Nozawa A, Kaneko T and Masuda M. Pulmonary adenocarcinoma, Lambert--Eaton myasthenic syndrome, and voltage-gated calcium channels: a case report. J Med Case Rep 2012; 6: 281. 査読有り

⑯ Woo T, Saito H, Yamakawa Y, Komatsu S, Onuma S, Okudela K, Nozawa A, Aihara M, Ikezawa Z and Ishigatsubo Y. Severe obliterative bronchitis associated with Stevens-Johnson syndrome. Intern Med 2011; 50: 2823-2827. 査読有り

- ① 奥寺康司他 [Significant association between EGFR-mutated lung adenocarcinoma and past illness from gastric cancer or uterine myoma] 第103回 日本病理学会総会 2014年4月25日 広島
- ② 奥寺康司他 [Proteome Analysis for Downstream Targets of Oncogenic KRAS - the Potential Participation of CLIC4 in Carcinogenesis in the Lung] 第101回 日本病理学会総会 2012年4月26日 東京

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0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 0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

奥寺康司 (OKUDELA, Koji)  
横浜市立大学・医学部・講師  
研究者番号：10326027

### (2) 研究分担者

片山映 (KATAYA, Akira)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10333113

永原則之 (NAGAHARA, Noriyuki)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10208043

禹哲漢 (WOO, Tetsukan)  
横浜市立大学・医学研究科・共同研究員  
研究者番号：90537177

矢澤卓也 (YAZAWA, Takuya)  
杏林大学・医学部・准教授  
研究者番号：50251054  
(平成24年度まで)

下山田博明 (SHIMOYAMADA, Hiroaki)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号：60381472  
(平成24年度まで)

(3) 連携研究者  
該当しない