

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591174

研究課題名(和文) 肺癌組織におけるペプチドトランスポーターPEPTの発現と機能：臨床指標との関連

研究課題名(英文) Expression and function of peptide transporter in the lung cancer

研究代表者

竹村 昌也 (TAKEMURA, MASAYA)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30378707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌患者29人(男19名:女10名 68.8歳 腺癌21名 扁平上皮癌8名)より肺癌組織および正常気管支組織を採取した。肺癌組織および正常気管支におけるPEPT2の基質である蛍光ペプチドD-Ala-Lys-AMCAを作成し、取り込み実験を行った。腺癌に比べ扁平上皮癌で取り込みが強い傾向( $p=0.09$ )を認めたが有意差はなかった。肺癌組織および正常気管支におけるPEPT2の蛍光免疫染色を行い癌細胞表面および正常気管支上皮に染色を確認した。リアルタイムPCRによる検討では、腺癌と比べ扁平上皮癌においてPEPT2のmRNAレベルの発現が有意に強いことが確認された( $p=0.038$ )

研究成果の概要(英文)：Lung cancer tissue and normal bronchial tissue were obtained from surgically resected lung specimens of 29 patients with lung cancer (19 male, mean age 68.8 years, 21 adenocarcinoma and 8 squamous carcinoma). Uptake experiments of the fluorescent D-Ala-Lys-AMCA which is identified as peptide transporter substrate for peptide transporter (PEPT2) showed higher tendency of accumulated fluorescence intensity in the squamous cell carcinoma tissue compared to adenocarcinoma ( $p=0.09$ ). Positive staining of immunohistochemistry for PEPT2 showed in both cancer tissues and normal bronchial tissues. Quantitatively, mRNA levels of PEPT2 were significantly higher in the squamous cell carcinoma tissues compared to adenocarcinoma ( $p=0.038$ ).

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺癌 ペプチドトランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜上に発現するトランスポーター群は生体に必要な栄養物等を積極的に取り込み利用する一方で、代謝物や薬物等の異物を代謝・解毒し細胞外へと排出する上で重要な役割を果たしている。近年、トランスポーターのクローニング、機能解析が進むとともにその広い基質認識性と高い薬物輸送能を有することが明らかになっておりドラッグデリバリーの観点から重要な標的分子として注目されている。

近年 PEPTs が膀胱癌や線維肉腫など多くの腫瘍細胞株にも発現および機能していることが報告されており(Gonzalez et al. *Cancer Res* 1998, Nakanishi et al. *Int J Cancer* 2000)、PEPTs が癌治療および診断の標的分子としても期待されている。肺組織においては PEPT2 の発現がみられ、PEPT2 は肺癌の治療および診断においても薬物送達の標的分子となる可能性が想定されるが、肺癌組織における PEPT2 の発現や機能については不明であり検討されていない。癌細胞増殖には多くのアミノ酸・ペプチド基質をその細胞内に取り込む必要があること、多くの癌細胞株で報告されているように肺癌組織内でも PEPTs 特に PEPT2 の発現や活性が高まっていることが想定される。

## 2. 研究の目的

肺癌患者手術検体で得られた肺癌組織について PEPT2 の発現および、その機能について、定量的 RT-PCR、生化学、免疫組織学的検討およびペプチド輸送能について検討する

## 3. 研究の方法

### 対象:

研究期間中に当院を受診し、病理組織学的に

肺癌(転移性含む)と診断され、外科的手術切除が必要な患者を対象とした。

### 組織検体採取:

外科手術で得られた標本を使用する(腫瘍病変部および非腫瘍部を採取)

### PEPT2 の発現:

肺癌組織および非癌組織における PEPT2 の発現について

- (1) 蛋白レベルで PEPT2 の発現を蛍光免疫染色法で調べる。
- (2) 検体から RNA を採取し mRNA レベルで PEPT2 の発現をリアルタイム PCR システムを用いて定量的に測定する。

### PEPTs の機能:

PEPTs の特異基質である D-Ala-L-Lys-AMCA (蛍光標識化) およびその競合阻害剤である Glycyl-(L)-Glutamine (Gly-Gln) を作成し、癌組織における PEPT2 の取り込み能を検討した。

### 組織画像の評価:

画像ソフトを用いて癌組織および非癌組織の PEPTs 蛍光強度を定量解析する。

免疫染色および取り込み試験で得られた切片標本は現有の蛍光顕微鏡にて観察する。

CCD カメラにて一定露出下で撮影を行う。画像解析は Image-J を用いて行われ癌組織の蛍光強度を解析した。基質取り込み試験の評価は、その基質取り込みの程度から以下の3段階で訂正評価した。

- 1+: 顆粒状蛍光が僅かに認められる。
- 2+: 顆粒状蛍光戸と伴に粒状蛍光が認められる
- 3+: 粒状蛍光が認められる。

評価については3人で行い、2人以上の意見が一致した方の評価を採用した。

#### 4. 研究成果

肺癌患者 29 人(男 19 名:女 10 名 68.9 歳 腺癌 21 名 扁平上皮癌 8 名)より肺癌組織および正常気管支組織を採取した。

(1).

肺癌組織および正常気管支における PEPT2 の基質である蛍光ペプチド D-Ala-Lys-AMCA を作成し、取り込み実験を行った(図 1)。基質取り込みの程度を定性的に 3 段階評価した。腺癌に比べ扁平上皮癌で取り込みが強い傾向( $p=0.09$ )を認めたが有意差はなかった。

図 1

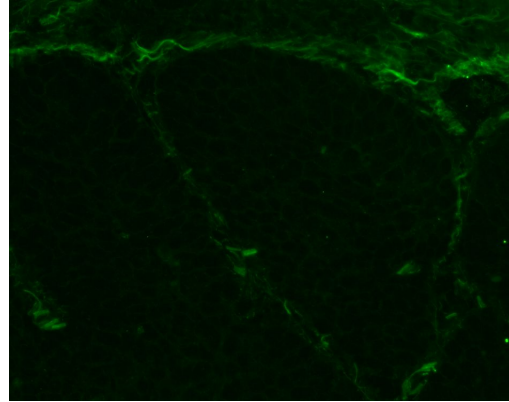


基質取り込み試験：扁平上皮癌検体がん細胞表面に粒状の蛍光物質の取り込み像を認めた。

(2)

肺癌組織および正常気管支における PEPT2 の蛍光免疫染色を行った。癌細胞および正常気管支上皮に染色を確認した(図 2)。

図 2

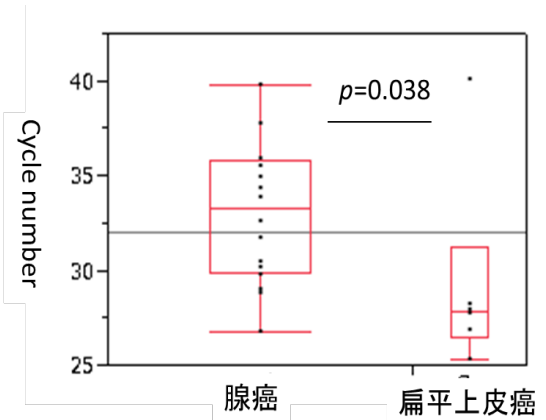


蛍光免疫染色：腺癌組織

(3)

リアルタイム PCR による検討では、腺癌と比べ扁平上皮癌において PEPT2 の mRNA レベルの発現が有意に強いことが確認された( $p=0.038$ )(図 3)

図 3



(4) 本研究の結論

PEPT2 は肺癌組織および正常気管支に発現しており、肺癌組織においては特に扁平上皮癌で発現および activity が高い可能性が示唆されるが、今後さらなる検討を要する。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

竹村 昌也 (TAKEMURA MASAYA)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：30378707

### (2)研究分担者

福井 基成 (FUKUI MOTONARI)  
財団法人田附興風会・医学研究所 第2研究部・部長  
研究者番号：50342697

弓場 吉哲 (YUBA YOSHIAKI)  
財団法人田附興風会・医学研究所 第4研究部・研究主幹  
研究者番号：90465948