

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592069

研究課題名(和文) 非小細胞肺癌の血管新生機序解明に対する新しいアプローチ法とその臨床応用

研究課題名(英文) The new approach method for the vascularization mechanism elucidation of the non-small-cell lung cancer and the clinical application

研究代表者

鈴木 実 (Suzuki, Makoto)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：80312940

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

研究成果の概要(和文)：われわれは、血管新生に関連する遺伝子を含めた、5つの遺伝子(LINE-1、SLIT2、MAL、IGFBP7、IRF8)について、非小細胞肺癌の発癌浸潤における役割を調べた。その結果、非小細胞肺癌においては、LINE-1が低メチル化しており、他のSLIT2、MAL、IGFBP7、IRF8については高メチル化による発現低下をしていた。いずれも非癌部肺組織と比較して癌特異的な変化であり、発癌機序解明、治療開発に貢献するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We examined a role of five genes (LINE-1, SLIT2, MAL, IGFBP7, IRF8) including the gene which relates to angiogenesis, in terms of the carcinogenesis and invasion of non-small cell lung cancer (NSCLC). As a result, in NSCLC, LINE-1 was hypomethylated and expressions of other SLIT2, MAL, IGFBP7, and IRF8 were lowered by hypermethylation of their genes. Because the changes were tumor-specific when compared with non-malignant lung tissues, further study will clarify the mechanism of carcinogenesis of NSCLC and will contribute to the new treatment of NSCLC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：非小細胞肺癌 血管新生 SLIT2

1. 研究開始当初の背景

VEGF シグナルを介した血管新生は、乳癌や、授乳期の乳腺組織で研究がおこなわれている (PNAS 107:10520-5, 2010. Cancer Res 68:7819-7827, 2008)。それらによれば、癌などの病的状態では、SLIT 発現低下、Robo 発現低下、また CXCR4 受容体発現亢進と CXCL12 分泌タンパク増加により、VEGF シグナルが異常亢進している。その結果として、腫瘍組織内血管新生が起こり、VEGF 誘導血管内皮細胞間の接合が解除され、腫瘍細胞漏出や転移などが引き起こされる。ただし、これらの異常状態は、各シグナルの一部を研究したものを組み合わせたもので、全体的なシグナルの関連、相互作用というものはわかっていない。

特に肺癌では、これら、SLIT-ROBO シグナル、CXCR4-CXCL12 シグナルが、どのように VEGF シグナルに影響を与えているか、どのような役割を果たしているかは、不明である。

2. 研究の目的

非小細胞肺癌における SLIT2、SLIT3、ROBO1-4 の発現と各因子間の関係を調べる。

3. 研究の方法

非小細胞肺癌細胞株 20 種を用いて、以下の解析を行う。

(1) RT-PCR 法による mRNA 発現レベルの確認

SLIT2 と SLIT3、ROBO1 ~ ROBO4、CXCL12、CXCR4、VEGF の mRNA 発現レベルを確認する。

いくつかの細胞株で、SLIT2 と SLIT3、ROBO1 ~ ROBO4 の何れかが発現低下、CXCR4 の高発現、そして VEGF 高発現が認められることが予想される。発現低下している遺伝子に関しては、脱メチル化試薬による発現回復の有無を確認、異常メチル化が発現低下の原因であるかを確認する。特に SLIT2 は異常メチル化の関与が報告されている (Cancer Res 62; 5874-80, 2002)。

(2) 一方、本研究が計画通りに進まない場合の対策として、癌に関連する可能性のある遺伝子 (LINE-1, MAL, IGFBP7, IRF8) について、非小細胞肺癌における役割について検討することとした。

4. 研究成果

SLIT2 の異常メチル化について検討した。従来通りの MSP 法 (methylation specific PCR) で検討した (図 1)。

しかし残念ながら、図に示すように、腫瘍と

非癌部肺組織と明確に区別することは出来

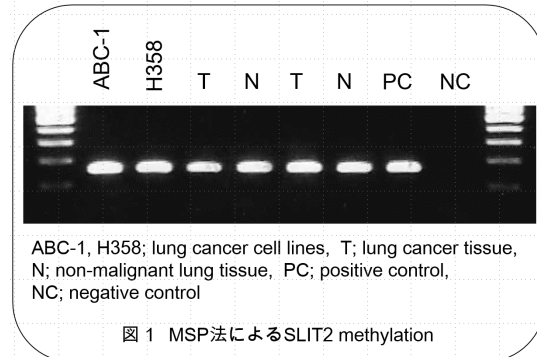


図 1 MSP法によるSLIT2 methylation

なかった。そのため、今後のメチル化の定量には、Pyrosequencing 法を用いることとした。その一例を図 2 に示す。

以降の実験で肺癌細胞株 9 個を用いた。また熊本大学呼吸器外科で 2010 年より 2011 年に手術を行った 80 例の肺切除検体を用いた。まず SLIT2 の異常メチル化について検討した。さらに、当初の実験がうまく行かない場合も想定し、ゲノム全体の低メチル化を反映すると言われる LINE-1 の低メチル化を測定した。また、他に MAL、IGFBP7 の異常メ

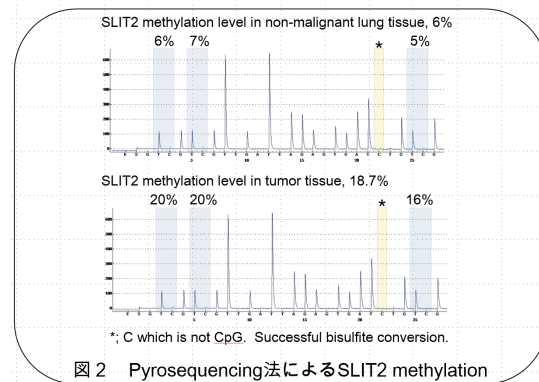


図 2 Pyrosequencing法によるSLIT2 methylation

チル化も測定した。すべて測定には Pyrosequencing 法を用いた。また EGFR 遺伝子変異検索を Direct sequence 法で行った。肺癌腫瘍株の検討では、発現と異常メチル化の逆相関が SLIT2 で 9 / 9、MAL で 8 / 9、IGFBP7 で 5 / 7 と良好な関係を示した。すなわち、これらの遺伝子は主に異常メチル化によって発現制御を受けていることが示唆された。

また原発巣の検討では、非癌部肺組織と比較して ROC curve を測定し、cut-off 値を求めた (図 3)。その結果、LINE-1 は 53% の症例で低メチル化を認めた。SLIT2、MAL、IGFBP7 はそれぞれ、67%、42%、55% の症例で異常メチル化を認めた。

以上から、SLIT-ROBO シグナルにおける、SLIT は非小細胞肺癌で、重要な役割を果たしていることが示唆された。

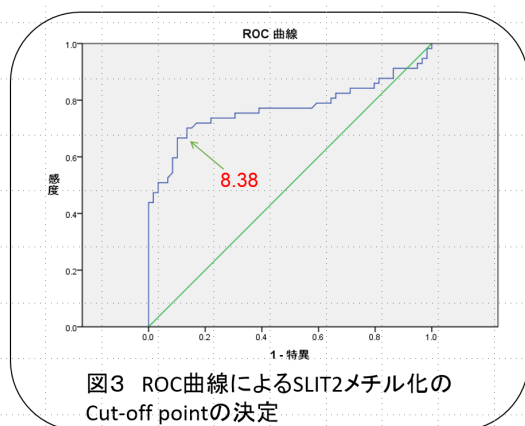


図3 ROC曲線によるSLIT2メチル化の Cut-off pointの決定

次に、われわれは、非小細胞肺癌の細胞株 13 株を用いて、interferon regulatory factor 8 (IRF8) 遺伝子の異常メチル化について Pyrosequence 法を用いて検討した。IRF8 はインターフェロン γ によって誘導されるインターフェロン調節因子ファミリーの一つである。IRF8 は免疫応答やその他さまざまな生理学的調節を司っている。腫瘍との関連では、Irf8 欠損マウスでは慢性骨髄性白血病を発生する、インターフェロン γ に誘導された IRF8 は大腸癌細胞でアポトーシスを誘導する、などの報告がある。

本年度の研究では肺癌細胞株 10 株に IRF8 遺伝子の異常メチル化を認めた。mRNA 発現レベルと逆相関しており、異常メチル化が IRF8 発現抑制の主原因と考えられた。切除症例 191 例の検討では、非癌部肺組織と比較して有意にメチル化の程度が高く、頻度も高かった。191 例中 94 例で IRF8 の免疫染色を行い、蛋白発現を調べた。腫瘍組織においても、IRF8 異常メチル化と蛋白発現は逆相関を示した。原発巣組織においても、異常メチル化が IRF8 発現抑制の主原因と考えられた。IRF8 異常メチル化は EGFR wild type 症例で高頻度に認められた。腺癌症例で IRF8 異常メチル化は再発予後予測因子になった。また、IRF8 免疫染色による蛋白発現の検討では、男性、喫煙者、非腺癌、EGFR wild type 症例、または進行症例で高頻度に発現低下を認めた。

本研究全体を通して、血管新生関連遺伝子と肺癌の関係を明らかにしていった。特に、重要課題であった SLIT2 に関しては、異常メチル化の報告があったものの、われわれの施設での通常の Methylation Specific PCR (MSP)法では再現できなかった。今回、異常メチル化測定に Pyrosequence 法を用いることで、MSP 法では検出出来ない異常メチル化を定量的に測定できた。実際、SLIT2 は非癌部肺組織と比較して有意に癌組織で異常メチル化を来しており、癌特異的变化であることがわかった。

最終報告

われわれは、血管新生に関連する遺伝子を含めた、5 つの遺伝子 (LINE-1、SLIT2、MAL、IGFBP7、IRF8) について、非小細胞肺癌の発癌・浸潤における役割を調べた。その結果、非小細胞肺癌においては、LINE-1 が低メチル化しており、他の SLIT2、MAL、IGFBP7、IRF8 については高メチル化による発現低下をしていた。いずれも非癌部肺組織と比較して癌特異的な変化であり、発癌機序解明、治療開発に貢献するものと考えられた。

略語説明

・LINE-1 (Long interspersed nucleotide element 1)

Indicator of global DNA methylation

・SLIT2 (Slit homolog 2 (Drosophila))

Suppressing tumor growth by coordinating regulation of the β -catenin and PI3K/AKT pathways

・MAL (Myelin and lymphocyte protein gene)

T-cell differentiation protein

・IGFBP7 (Insulin-like growth factor binding protein 7)

Apoptosis in malignant tumors

・IRF8 (Interferon regulatory factor 8)

Transcription factor that plays critical roles in the regulation of lineage commitment and in myeloid cell maturation.

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)

Aberrant methylation and silencing of IRF8 expression in non-small cell lung cancer.

Suzuki M, Ikeda K, Shiraiishi K, Eguchi A, Mori T, Yoshimoto K, Shibata H, Ito T, Baba Y, Baba H.

Oncology Letters. *in press* 査読有り

Aberrant methylation of LINE-1, SLIT2, MAL and IGFBP7 in non-small cell lung cancer.

Suzuki M, Shiraiishi K, Eguchi A, Ikeda K, Mori T, Yoshimoto K, Ohba Y, Yamada T, Ito T, Baba Y, Baba H.

Oncology Reports. 査読有り 2013 Apr;29(4):1308-14.

[学会発表](計1件)

熊本大学呼吸器外科

鈴木実(代表)、白石健治、江口礼好、池田公英、森毅、吉本健太郎、大場康臣、山田竜

也

熊本大学消化器外科

馬場秀夫、馬場祥史

「非小細胞肺癌に対する個別化医療確立の
試み」

第 112 回日本外科学会定期学術集会

2012 年 4 月 14 日 千葉

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 実 (SUZUKI, Makoto)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：80312940

(2)研究分担者

池田 公英 (IKEDA, Koei)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20448525