

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659637

研究課題名（和文） 食道癌における足場非依存性増殖と上皮間葉移行の機序解明

研究課題名（英文） Anchorage-independent growth and EMT relationship in esophageal cancer.

## 研究代表者

松原 久裕（MATSUBARA HISAHIRO）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20282486

研究成果の概要（和文）：正常上皮細胞では基底膜より離れることにより細胞は死滅するが、がん細胞は死滅せず浸潤転移と関係する足場非依存性増殖能を獲得している。この機序解明が新たな分子治療モデルの開発に有用である。食道癌における Fra-1 に着目し、同分子が予後不良因子であり、運動・浸潤能に関与することを明らかにした。さらに浸潤に関与する仮足に関連する Fascin についての検討を加え、この Fascin も癌の進行度、術後再発等と相関、培養細胞にて Fra-1 同様運動・浸潤に関与することも確認した。

研究成果の概要（英文）：Fra-1 is reported one of key molecule inducing anchorage-independent growth that is related to invasion and metastasis in cancer cells. I investigated the role of this molecule in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). I clarified Fra-1 is an important molecule in progression in ESCC. Furthermore, Fascin is also associated with poor prognosis. And Fascin is also related to invasion and metastasis in cancer cells.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道癌、足場非依存的増殖、Fra-1、浸潤能、invadopodia

## 1. 研究開始当初の背景

がんの浸潤転移に深く関与すると考えられる足場非依存性増殖能を食道癌がどのような分子機序で獲得しているのか、さらにこの機序解明が新たな分子治療モデルの開発に重要な貢献をする。

## 2. 研究の目的

ラットの細胞ではRasのシグナルがMEK/ERKの経路により浸潤能を獲得するが、ヒトの細胞ではRasを強制発現させただけでは

MEK/ERKの経路では浸潤能を獲得しないことも明らかにした。ヒトではこの経路による形質転換を防ぐメカニズムがあることが明らかになった。ヒトでのガン化はこのメカニズムの破綻が重要であることが示唆された。ヒトとラット間で差のあったFra-1が予後不良因子であり、浸潤能に関与することを食道癌で明らかにした。その浸潤能抑制の分子機構を上皮間葉移行(EMT)との関連とともに解明する。さらに食道癌における足場非依存性増殖に関与する分子の同定、お

よびその分子機構の解明、この足場非依存性増殖の制御による治療法の開発を目指した。これらの癌の悪性度を規定する浸潤能の機構解明は癌治療に極めて有用である。

### 3. 研究の方法

1) ヒト食道癌切除63例における足場依存性増殖に関与する Fra-1 分子の発現について切除標本での免疫染色を抗ヒト Fra-1 ウサギポリクローナル抗体を用いてペルオキシダーゼにより行った。

2) Fra-1 免疫染色の結果を染色細胞数の頻度により、5%未満、5-25%、25-50%、50%以上の4段階に分け、それぞれの病理組織学的所見との関連性について検討した。それぞれの因子と生存率について単変量解析、多変量解析を行った (Stat View -J 第5版)。

3) ヒト食道癌培養細胞株 (T. Tn, TE-2) における Fra-1 タンパク発現の差をウェスタンブロット法により検討した。

4) Fra-1 遺伝子を特異的 short hairpin RNA を作成し、その shRNA をヒト食道癌培養細胞に遺伝子導入し、Fra-1 分子の発現制御を検討した。

5) shRNA を導入し Fra-1 を制御した食道癌細胞における増殖能について解析した。

6) shRNA を導入し Fra-1 を制御した食道癌細胞における運動能および浸潤能について micro pore chamber assay ならびにまとりげろをコートしたフィルターを用いた in vitro の系により解析した。

7) ヒト食道癌切除例における Fra-1 が重要な役割を担う浸潤に関与する仮足の1つである invadopodia に着目し、actin と結合する Fascin 分子の発現について切除標本での免疫染色を行った。また、Fra-1 と同様に各病理組織学的因子との関連を検討した

8) Fra-1 と同様にヒト食道癌培養細胞

株 (T. Tn, TE-2) における Fascin に関し PCR 並びにタンパク発現の差を検討した。

9) Fascin 遺伝子を特異的 siRNA を作成、ヒト食道癌培養細胞に遺伝子導入し、Fascin 分子の発現制御を検討した。Fra-1 と同様にヒト食道癌培養細胞での増殖能、運動能、浸潤能について検討を加えた。

10) 食道癌培養細胞株における Fra-1 に関連した分子のパスウェイ解析を施行。

### 4. 研究成果

がんの浸潤転移に深く関与すると考えられる足場非依存性増殖能を食道癌がどのような分子機序で獲得しているのか、さらにこの機序解明が新たな分子治療モデルの開発に重要な貢献をする。

ラットの細胞では Ras のシグナルが MEK/ERK の経路により浸潤能を獲得するが、ヒトではこの経路による形質転換を防ぐメカニズムがあり、ヒトでのガン化はこのメカニズムの破綻が重要であることが示唆された。ヒトとラット間で差のあった Fra-1 がヒト食道癌切除例の検討から腫瘍の壁深達度、リンパ節転移の有無、進行度、浸潤形式と相関を認めた。

予後に関する検討では全進行度総計において Fra-1 発現の有無により予後の差を認めた。Stage 0, I では有意差を認めないものの発現していない群において予後良好の傾向を認めた。また Stage II, III および Stage IV において有意差を持って発現陰性群の予後が良好であった。さらに多変量解析による解析では病期とともに独立した予後不良因子であった。これらの臨床病理学的検討に基づき、食道癌培養細胞における shRNA および siRNA を用いて Fra-1 分子の制御を行い、Fra-1 発現抑制により細胞増殖能ならびに運動能、浸潤能が抑制されることを明らかにした。

さらに Fra-1 抑制により足場非依存性増殖能が喪失すること、浸潤能が低下することについてその分子機構を明らかにするために癌の浸潤に関与する仮足の1つである invadopodia に着目し、actin と結合する Fascin についての関与を検討

した。その結果、この Fascin が食道癌組織において発現増強していることを PCR および免疫染色にて確認した。この Fascin の発現に関し、臨床病理学的検討を加えた結果、癌の壁深達度、進行度、血管侵襲、術後再発と有意差を持って相関することを確認した。

さらにこの invadopodia に関し Matrix Metalloproteinase (MMP) の発現がその浸潤に関与している報告がなされており、MMP の食道癌での発現に関しても検討を加え、PCR にてその発現が増大していることを確認した。Fascin を siRNA にてノックダウンすると食道癌培養細胞において増殖並びに浸潤能が低下することを確認した。

siRNA を導入し Fra-1 を制御した食道癌細胞に関して Microarray 法により発現が調節される下流遺伝子について検討において、Fra-1 発現の強い食道癌培養細胞 TE-10, 11 の 2 種において共通する数種の発現増強あるいは発現低下する遺伝子を同定した。その中の両食道癌培養細胞において発現抑制される HMMR について着目し、検討を加えた。Fra-1 発現と HMMR の発現を食道癌切除標本において検討したところ、両者の発現は優位に相関していることが明らかになった。

また、食道切除標本の検討において癌部と非癌部において miR203 の発現に差のあることを見出し、この miR203 が直接 LIM and SH3 protein 1 (LASP1) を制御することを確認した。この LASP1 をノックダウンすることにより Fra-1, Fascin と同様に運動能、浸潤能が低下することを明らかにした。食道癌切除例においても miR203 と LASP1 の発現は逆相関していることを明らかにした。さらに miR203 の発現は有意に無再発生存率と相関していた。

今後、Fra-1 と Fascin との協働作用、関連性さらに HMMR や LASP1 との関わりについて詳細な検討を加えていく。また、パスウェイ解析により明らかになった各分子についての作用機序の解明、さらに治療への応用について検討を加えていく。

## 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 3 件)

(1) Takeshita N, Mori M, Kano M, Hoshino I, Akutsu Y, Hanari N, Yoneyama Y, Ikeda N, Isozaki Y, Maruyama T, Akanuma N, Miyazawa Y, Matsubara H.

miR-203 inhibits the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma by regulating LASP1. *Int J Oncol.* 2012 Nov;41(5):1653-61. doi: 10.3892/ijo.2012.1614. 査読有り

(2) Hoshino I, Matsubara H. MicroRNAs in cancer diagnosis and therapy: from bench to bedside. *Surg Today.* Epub 2012 Nov 6. doi: 10.1007/s00595-012-0392-5. 査読有り

(3) Usui A, Hoshino I, Akutsu Y, Sakata H, Nishimori T, Murakami K, Kano M, Shuto K, Matsubara H. The molecular role of Fra-1 and its prognostic significance in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2012 Jul 1;118(13):3387-96. doi: 10.1002/cncr.26652. 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

(1) Akanuma N., Matsubara H., et al. Fascin expression in esophageal squamous cell carcinoma. The 9th AACR-JCA Joint Conference 2013 年 2 月 21 日～2013 年 2 月 25 日 Maui, USA

(2) 松原 久裕 食道癌治療の break through をめざして 第 59 回北日本放射線腫瘍学研究会 (招待講演) 2012 年 11 月 15 日 仙台

(3) Matsubara H. Clinical innovation and translational research of cancer in Japan The Japan-Russia Far East Forum 2012 (招待講演) 2012 年 5 月 3 日～2012 年 5 月 4 日 Vladivostok, Russia

(4)松原 久裕 食道癌に対する新たな治療戦略 第16回消化器癌フォーラム（招待講演）2011年11月5日  
大阪

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松原 久裕 (MATSUBARA HISAHIRO)  
千葉大学・大学院医学研究院・  
教授  
研究者番号：20282486

### (2)研究協力者：

田村 裕 (TAMURA YUTAKA)  
千葉大学・大学院医学研究院・  
准教授  
研究者番号：50263174

赤沼 直毅 (AKANUMA NAOKI)  
千葉大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：70645598

丸山 哲郎 (MARUYAMA TETSURO)  
千葉大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：30645586