

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592106

研究課題名(和文)肺腺癌の転移機構：HIF-1 / ヒストン修飾調節によるAQP1の過剰発現

研究課題名(英文)Metastatic mechanism of the lung adenocarcinoma: AQP1 overexpression by the HIF-1/histone modification adjustment

研究代表者

町田 雄一郎 (MACHIDA, Yuichiro)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：50460366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺腺癌の浸潤先進部においてAQP1の発現亢進におけるエピゲネティックな遺伝子発現調節機序の関与を明らかにする。H3K4me2は、術後再発率と有意な関連性を認めるとともに、AQP1・HIF-1 とヒストン修飾には関連を示さなかった。肺腺癌におけるヒストン修飾は腫瘍マーカーとの関連を示さなかった。ヒストン修飾H3K4me2は、FDG-PETと関連を示し細胞増殖因子との関連を認めた。AQP1とJMJD2Bの関連性は認められなかったが、AQP1は低酸素下で発現が増強され、発現増強過程としてEZH2を経由する可能性が示唆された。LSD1とAQP1・EZH2・HIF-1 との関係は不明確であった。

研究成果の概要(英文)：About the expression mechanism of aquaporin (AQP)1 in lung adenocarcinoma invasion, we studied to the contribution of the gene expression adjustment mechanism of the epigenetics. H3K4me2 was associated with postoperative recurrence, but AQP1 / HIF-1 and histone modification, there was no association. Also, the histone ornamentation in the lung adenocarcinoma was not associated with the tumor marker. H3K4me2 was associated with the examination for FDG-PET and the cell growth factor. Although we were not found, as for the association of AQP1 and JMJD2B, AQP1 was enhanced under hypoxia, and it was suggested to go by way of EZH2 course as a enhancement process. The relations with LSD1 and AQP1 / EZH2 / HIF-1 were subobsolete.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 AQP1 HIF-1 ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

肺癌は高い浸潤・転移能を特徴とする。近年、分子標的薬の開発により治療に幅が生まれたが、その効果は満足できるものではない。アキュアポリン aquaporin (AQP)は、あらゆる生命現象の基盤をなす水分子に対する特異的チャネルとして発見された (Preston GM, et al. Science 1992)。近年、細胞増殖や浸潤・転移などががんの生物学的特性に重要な役割を果たしている可能性が提唱され (Verkman AS, et al. J Mol Med 2008)、我々は AQP1 の過剰発現が術後転移発生と生命予後に密接に関係していることをこれまでに明らかにした (Machida Y, et al, Hum pathol 2011)。

エピジェネティックは、同一 DNA 配列から異なった表現型を誘導する仕組みで、癌における遺伝子発現抑制での役割が現在注目されている。肺癌細胞を含め AQP1 の腫瘍細胞での発現調節機構の報告は数少なく、エピジェネティック制御機構に関しては全く知られていない。エピジェネティックな遺伝子の発現制御には、DNA のメチル化、ヒストン修飾とクロマチン再構築が互いに協調・拮抗し遺伝子発現の制御に関わっているが、種々の腫瘍におけるこれまでの情報から、申請者は「肺癌浸潤先進部での AQP 遺伝子の発現誘導においてヒストン修飾が重要な役割を演じているのでは」という仮説に至った。

2. 研究の目的

肺腺癌の浸潤先進部において lamellipodia 形成促進を介し浸潤・転移能の亢進に関わる AQP1 の発現亢進における HIF-1 系を介したヒストン修飾酵素の発現調節による エピゲネティックな遺伝子発現調節機構の関与を明らかにする

3. 研究の方法

(1) 肺癌における検討

2001年～2008年に金沢医科大学呼吸器外科で切除された92例肺癌症例を対象とし、H3K4me2(dimethylated histone 3 lysine 4), H3K9Ac(acetylated histone 3 lysine 9), H3K18Ac(acetylated histone 3 lysine 18), H3K27me3(trimethylated histone 3 lysine 27), H4R3me2(dimethylated histone 4 arginine 3)の5つヒストン修飾と肺癌の病期、細胞分化度、FDG-PETの集積、術後再発の関連及びAQP1・HIF-1との関連について検討した。ヒストン修飾に関しては免疫組織染色を行い、50%以上発現を高発現、50%以下発現を低発現と定義した。また、免疫染色にはSpiral array法による組織マイクロアレイを作製し、染色条件の均一化を図った。統計解析は χ^2 検定で行った。また、無症候性生存率はKaplan-Meier法を用いた。

(2) 肺腺癌における検討

2001年～2008年に金沢医科大学呼吸器外科で切除された81例肺腺癌症例を対象とし、で使用した5つヒストン修飾を用い、免疫染色を行った。免疫染色スコアはH-scoreを用いて行い、H-score<150のものを低発現、H-score 150のものを高発現と定義した。Cox比例ハザードモデルを用いて肺腺癌の術後再発とヒストン修飾の発現の関連を解析し、Kaplan-Meier法により作製した生存曲線をlog-rank testにより検定した。さらにはHIF-1及びAQP1・LSD1との関連やFDG-PET・血管新生因子と関連について検討した。

(3) 肺癌組織を用いた Western blot

使用したのは1)で使用した5つのヒストン修飾を用いた。タンパクはリーシス・バッファ(50mMのトリス-HCl, pH 7.6, 10%のグリセロール, 5mMの酢酸マグネシウム, 0.2mMのエチレンジアミン四酢酸, 1mMのフェニルメチルスルホニル弗化物と1%のナトリウム・ドデシル硫酸塩)を使用して抽出された。抽出されたタンパク(10 μ g)は、10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。ニトロセルロース膜は、2 μ g/mlの濃度で、抗ポリクローナル抗体を使用して、4で終夜反応した。プロットは、室温で1時間ヤギ抗ウサギIgG抗体を用いて行った。ニトロセルロース膜はChemiluminescence Luminol Reagentで反応し、そして、ATTO Light-captureを使用して撮影した。更に、Western blot法による蛋白発現を加え、フリーソフトImageJを使用してゲル電気泳動の定量解析を行った。

(4) *in vitro*での検討

3つの肺腺癌細胞株(ABC1, RERF-LC-Ad1, RERF-LC-MS)を使用した。21%酸素下で培養した細胞株とBIONIX-2(スギヤマゲン、日本)を用いて1%酸素下72時間で培養された細胞株を作製し、Western blot法を用いてタンパクの発現を評価した。

(5) 統計解析

臨床的エンドポイントは、治療開始から転移(転移のない生存)の時間であった。AQP発現と臨床病理因子の間の比較のために、 χ^2 検定を使用し、 $p<0.05$ で統計学的に有意であるとみなした。すべての統計解析は、StatViewソフトウェアを使用して行われた。

4. 研究成果

(1) 肺癌における検討

H3K4me2は、術後再発($p=0.039$)、肺癌の病期($p=0.005$)、細胞分化($p<0.001$)と有意差を認めた。H3K9AcとH3K18Acも肺癌の細胞分化と有意差を認めた。H4R3me2はFDG-PETの集積($p=0.029$)と有意差を認めた。ヒストン修飾の中でもH3K4me2は肺癌における重要な

因子であることが解明された。しかし、AQP1・HIF-1 とヒストン修飾には関連性を認めなかった。

(2) 肺腺癌における検討

肺腺癌細胞のヒストン修飾における陽性率 (H-score 150) は、H3K4me2 が 54.3%、H3K9Ac が 23.5%、H3K18Ac が 18.5%、H3K27me3 が 25.9%、H4R3me2 が 42.0%であった。H3K4me2 の高発現は、肺腺癌の術後再発率と有意な関連性を認めるとともに、術後の無症候性生存期間の有意な短縮が示唆された ($p=0.0029$)。単変量解析・多変量解析でも有意な関連性を認め、H3K4me2 は独立した予後因子であることが示唆された。肺腺癌におけるヒストン修飾と腫瘍マーカー (CEA, SLX, SCC, CYFRA, ProGRP) との関連を検討したが、有意差は認められなかった。ヒストン修飾と腫瘍マーカーとの関連は示唆されなかった。また、ヒストン修飾と FDG-PET 検査との関連では、H3K4me2 が FDG-PET の集積 ($p=0.0201$) と有意差を認めた。H3K4me2 は、topoisomerase との相関係数が 0.758 ($p=0.001$)、PCNA との相関係数が 0.790 ($p<0.001$) であり、強い相関を示し血管新生に強く関わるものと考えられた。H3K4me2 は、悪性腫瘍の進展に重要な役割をしていることが示唆された。

Stage の肺癌における再発率・生存率に関して LSD1 の高発現は有意差を認めた。術後再発及び生存に関して、肺癌の術後再発率と死亡率に有意な関連性を認めた。

(3) 肺癌組織を用いた Western blot

Western blot 法では、5 つヒストン修飾を用いて行った。術後再発を認めた肺腺癌で H3K4me2 の発現を認め、術後再発を認めなかった肺腺癌で H3K4me2 の発現を認めなかった。更に ImageJ を使用し H3K4me2 のゲル電気泳動の定量解析を行い、有意差を認めた ($p=0.012$)。

(4) *in vitro* での検討

AQP1 は、21% 下の 3 つ細胞株で発現を認め、1% 下の細胞株では 21% 下の細胞株に比べて発現が増強した。一方で、EZH2 は 21% 酸素下細胞株で ABC1 のみ発現していたが、1% 酸素下細胞株では 3 株共に発現の状況を認めた。EZH2 は低酸素下で発現亢進する可能性がある。AQP1 と JMJD2B の関連性は認められなかったものの、AQP1 は低酸素下で発現が増強され、それは発現増強過程として EZH2 経路を経由する可能性が示唆された。

LSD1 は、21% 下の 4 つ細胞株で発現を認め、1% 下の細胞株では 21% 下の細胞株に比べて発現は不変であった。LSD1 と AQP1・EZH2 との関係は不明確であった。

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)

Malignant fibrous histiocytoma accompanying hemorrhage in the pleural cavity. Machida Y, Tanaka M, Motono N, Maeda S, Usuda K, Sagawa M. J Case Rep Stud. 2015; 2(4):406 査読有

Successful Treatment of Bronchial Fistula after Pulmonary Lobectomy by Endobronchial Embolization Using an Endobronchial Watanabe Spigot. Machida Y, Tanaka M, Motono N, Maeda S, Usuda K, Sagawa M. Case Reports in Pulmonology. 2015. Case Reports in Pulmonology. 査読有

Video-assisted thoracic surgery for spontaneous pneumothorax using a SILS port, a case report. Machida Y, Tanaka M, Ueno M, Motono N, Usuda K, Sagawa M, Sakuma T. J Kanazawa Med Univ 2013; 38: 150-152. 査読有

[学会発表](計 5 件)

町田雄一郎、上田善道、田中良、上野正克、相川広一、薄田勝男、佐川元保、佐久間勉 肺癌におけるヒストン修飾 第 31 回日本呼吸器外科学会 ヒルトン東京(東京都港区) 2014.5.29

Global histone H3 K4 dimethylation is an important prognostic factor in lung adenocarcinoma, Yuichiro Machida, Makoto Tanaka, Nozomu Motono, Sumiko Maeda, Katsuo Usuda, Yoshimichi Ueda, Motoyasu sagawa, Tsutomu Sakuma. American Thoracic Society 2014 International Conference, San Diego, USA. 2014.5.19

町田雄一郎、上田善道、田中良、上野正克、相川広一、薄田勝男、佐川元保、佐久間勉 肺癌におけるヒストン修飾と FDG-PET の集積の検討 第 30 回日本呼吸器外科学会 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市) 2013.5.9

Global histone H3 K4 dimethylation is an important prognostic factor in lung cancer. Yuichiro Machida, Makoto Tanaka, Nozomu Motono, Sumiko

Maeda, Katsuo Usuda, Yoshimichi Ueda,
Motoyasu sagawa, Tsutomu Sakuma.
European Respiratory Society (ERS)
congress, Vienna, Austria. 2012.9.2

町田雄一郎、上田善道、田中良、上野正
克、相川広一、薄田勝男、佐川元保、佐
久間勉 肺癌におけるヒストン修飾 第
29 回日本呼吸器外科学会 秋田県民会
館(秋田県秋田市) 2012.5.18

6 . 研究組織

(1)研究代表者

町田 雄一郎 (MACHIDA, Yuichiro)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：50460366

(2)研究分担者

上田 善道 (UEDA, Yoshimichi)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：50271375