

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460456

研究課題名(和文) 癌におけるaPKC / -IL6経路の役割(乳癌、前立腺癌を中心に)

研究課題名(英文) Role of aPKC-IL6 pathway, especially in prostatic and breast cancers

研究代表者

長嶋 洋治 (NAGASHIMA, Yoji)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：10217995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞極性因子aPKC / は癌で高発現する。本研究では以下の3点を示した。1) aPKC / が子宮頸癌および前癌病変CINにおいて発現が亢進しており、進行にしたがって核内集積を示すこと、2) aPKC / 遺伝子を移入した正常前立腺癌細胞は増殖能、運動能、浸潤性の亢進を示す。aPKC / が前立腺癌発生に寄与している可能性が示唆された。3) aPKC / -p62-GLO1の共発現乳癌が予後不良で、in vitroではaPKC / ; p62, GLO1との阻害剤併用は、共発現乳癌細胞株に強い増殖・生存抑制効果があった。乳癌におけるaPKC / シグナリングと糖代謝機構との関連性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although aPKCλ/iota (aPKC) is a cell polarity-regulating factor, it has been known to be highly expressed in various cancer cells. We aimed to elucidate the roles of aPKC in development and progression of cancers. In this research, we demonstrated the facts as follows; 1) aPKC is highly expressed in uterine cervical cancer and its precursor, cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Additionally, aPKC shows nuclear accumulation along with progression. 2) Cultured normal prostatic cells showed increased proliferation and motility, when aPKC gene is transfected, demonstrating that aPKC has a role in early stage of prostatic carcinogenesis. 3) Breast cancers coexpressing aPKC, its binding protein p62 and glyoxalase I (GLO1) shows more unfavorable. Combined treatment of inhibitors of aPKC and GLO1 effectively suppressed growth of co-expressing breast cancer cells in vitro. These indicated relationship between aPKC signaling and glucose metabolism in breast cancer.

研究分野：人体病理学

キーワード：aPKC / 子宮頸癌 CIN 前立腺癌 腫瘍化 乳癌 GLO1

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は、形態および機能的に極性の分化を示す。すなわち、上皮細胞においては隣接する細胞との junctional complex を境に細胞膜が apical 面と basolateral 面に分けられ、細胞質内小器官も不均一な分布を示す。このように正常上皮細胞では、生理的機能を果たすための極性(非対称性)が生じており、隣接する細胞とともに秩序だった組織を形成している。これに対して癌組織では、秩序だった極性が失われ、不規則な組織構築が見られる。病理学では癌の組織診断に際し、構造異型、細胞異型を示標としてきたが、極性の異常は前者を反映している。

aPKC/PAR 系は、多細胞生物間で広く保存されている分子機構で、上皮細胞の極性化に重要な機能を有している。われわれは aPKC / が PAR3, PAR6 と複合体を形成して、細胞極性形成に重要な役割を果たしていることを見出し、報告してきた(Izumi, Nagashima et al., J Cell Biol 143 (1): 95-106, 1998; Hirose, Nagashima et al., J Cell Sci 115(Pt12):2485-95, 2001)。

このため、細胞極性の乱れや消失を特徴とする癌細胞においては aPKC / の低下や消失が予想された。これを仮説に乳癌、胃癌、前立腺癌で免疫組織化学的に検討を行ったところ、逆に極性や細胞間結合の喪失に伴って、aPKC / が高発現し、細胞質にびまん性に分布することがわかった (Kojima, Akimoto, Nagashima et al., Hum Pathol 2008; Ishiguro, Akimoto, Nagashima et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2009; Takagawa, Akimoto, Nagashima et al., Ann Surg Oncol, 2010)。

同時に前立腺癌では aPKC / の作用で IL6 が誘導され、アンドロゲン非依存性の発現に関わっていることを示した。以上から、癌細胞における aPKC / 高発現と細胞極性異常が生じる機構の関係を解明することは、これまで認識されていなかった癌の発生、進展にかかわる分子機構を明らかにし、新たな組織診断マーカーや分子治療標的の発見につながる。我々はこの研究成果を胃癌、膵癌、子宮頸癌、頭頸部癌、悪性黒色腫に敷衍してきており、各種癌で aPKC / 高発現と局在の異常が癌の進行に関与していることを示している(胃癌 Ann Surg Oncol, 2010; 膵癌 Pancreatolgy, 2013; その他の癌については投稿準備中)。本研究では細胞株、移植腫瘍、そして臨床検体を用いて aPKC / -IL6 経路構成分子を同定し、病理組織診断マーカー、バイオマーカー、治療標的としての可能性を検討する。

2. 研究の目的

(1) 各種癌組織での aPKC / と IL6 の発現、局在を検討する。
癌臨床検体での aPKC / 遺伝子および aPKC / 蛋白、下流分子の IL6 の発現、局在異常

を検討、病理診断への有用性を知る。

(2) aPKC / の正常前立腺細胞に与える影響の検討。
aPKC / 遺伝子を正常前立腺培養細胞に移入し強制発現させ、その影響を検討し、同遺伝子が腫瘍化に与える影響を検証する。

(3) aPKC / の乳癌における糖代謝に与える影響の検討。
aPKC と癌で亢進している糖代謝機構との関係を調べる目的でヒト乳癌における aPKC の発現と glyoxalase I (GLO I) の発現との関連を調べた。並行して、aPKC の結合タンパクである p62 の発現との関連を調べた。

3. 研究の方法

(1) 子宮頸癌および前癌病変 cervical intraepithelial neoplasia (CIN)における aPKC / の局在、臨床病理学的諸因子との相関検討。

横浜市立大学医学部附属病院で手術的に切除され、研究目的への使用に対しインフォームドコンセントを得た子宮頸癌および前癌病変 cervical intraepithelial neoplasia (CIN) のホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックから作製した組織切片で aPKC / の局在を免疫組織化学的に検討した。淡変量多変量解析を用い、各種臨床病理学的因子との相関を検討した。特にCINの程度、進行の有無との相関、細胞内局在に着目した。

(2) aPKC / の正常前立腺細胞に与える影響の検討。

aPKC / 遺伝子を正常前立腺培養細胞に移入し強制発現させ、その影響を検討した。指標は増殖速度、スクラッチアッセイによる運動能、Boydenチャンバーアッセイによる浸潤能を検討した。また、3次元培養により、spheroidの形成について検討した。細胞内分子の活性化については、ウエスタンブロット法によって確認した。

(3) aPKC / の乳癌における糖代謝に与える影響の検討。

神奈川県立がんセンター組織バンクから入手したヒト乳癌 99 検体に対して aPKC / , p62, GLO I 抗体を用いて免疫組織染色を行った。得られた抗体シグナル強度を 0, 1+, 2+, 3+に分類し、aPKC , GLO I, p62 の発現の相関の有無を統計学的に解析した。また、公共のマイクロアレイデータ (Breast Invasive Carcinoma (TCGA, Nature 2012)) を用いて予後や病理学的因子との関連を解析した。さらに、癌細胞の増殖・生存への影響を調べるために aPKC-p62 阻害剤と GLOI 阻害剤の併用実験を in vitro の系で行った。

4. 研究成果

(1) 子宮頸癌および前癌病変 cervical intraepithelial neoplasia (CIN) における aPKC / の局在、臨床病理学的諸因子との相関検討。

子宮頸癌前駆病変である Cervical Intraepithelial neoplasm (CIN) の aPKC / 発現を免疫組織化学的に評価し、1) CIN においても aPKC の過剰発現を認めること、2) 病変が CIN1、CIN2、CIN3 と進行するにつれ、aPKC / の核内集積が生じること、3) aPKC の過剰発現は Human papillomavirus (HPV) 感染とは独立な病変増悪の予測因子であることを明らかにした (Mizushima, Akimoto, Nagashima et al.). 以上から aPKC の過剰発現が CIN 病変の進行や予後を予測するマーカーとして有益であることが示唆される。今後は、aPKC / の過剰発現が発がん・がんの進展とどのように関連するか、その機序を明らかにすることを目的とし、将来的に CIN および子宮頸癌に対する分子標的治療の標的となる分子を探索する。

(2) aPKC / および IL6 の腫瘍増殖に与える影響の検討。

aPKC / は前立腺癌で高発現し、IL6 の誘導を行うことが、われわれの先行研究で明らかになっている。aPKC / の高発現は前立腺癌のバイオマーカーとなりうる。その反面、aPKC / の正常前立腺細胞に与える影響は解明されていない。本研究では野生型 aPKC / とキナーゼドメインを欠く aPKC / を正常前立腺培養細胞株に強制発現させ、その効果を検討した。野生型 aPKC / を発現した培養前立腺細胞は増殖能、浸潤能、遊走能の亢進を示した。キナーゼドメインを欠く aPKC / を発現した培養前立腺細胞は逆に増殖能の低下を示した。また、3 次元培養系では、いずれの遺伝子を強制発現した細胞も異常な spheroid を形成した。また、野生型 aPKC / を発現した培養前立腺細胞では癌の発生や進展に重要な分子の活性化や発現の増加を確認した。これらの所見は aPKC / が正常前立腺細胞の増殖を促進し、ひいては癌化に寄与していることを示唆した。

(3) aPKC / の乳癌における糖代謝に与える影響の検討。

ヒト乳癌検体の免疫組織染色より、aPKC / -p62, aPKC / -GL01, GL01-p62 の発現に正の相関が得られた (2 検定 $P < 0.001$)。また、マイクロアレイデータ解析から、aPKC -p62-GL01 の共発現乳癌が予後不良であることが示唆された (Gehan-Breslow-Wilcoxon 検定 $P = 0.041$)。さらに aPKC-p62 阻害剤と GL01 阻害剤の併用は、それぞれの単独投与に比べて強い増殖・生存抑制効果を示した。以上から、aPKC / シグナリングと糖代謝機構との関連性が示唆された。

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 19 件)

Sawazumi T, Kato I, Tanaka M, Tanaka Y, Yamanaka S, Kuroda N, Yao M, Nagashima Y, Ohashi K. Xp11.2/TFE3 translocation associated renal cell carcinoma with multilocular cystic structures in an elderly patient. A case report. Int J Exp Clin Pathol 査読あり (in press).

Fukuda H, Kondo T, Takagi T, Iizuka J, Nagashima Y, Tanabe K. Limited benefit of targeted molecular therapy for inferior vena cava thrombus associated with renal cell carcinoma. Int J Clin Oncol、査読あり、2017 Apr 1.

doi:10.1007/s10147-017-1119-9.

Itagaki H, Yamamoto T, Hiroi A, Kawanishi K, Noguchi E, Ohchi T, Kamio T, Kameoka S, Oda H, Nagashima Y. Synchronous and bilateral oncocytic carcinoma of the breast: A case report and review of the literature. Oncol Lett、査読あり、Vol.13、No.3、2017、pp.1714-1718.

doi: 10.3892/ol.2017.5610.

Kuroda N, Yorita K, Ssaki N, Ishihara A, Matsuura K, Daa T, Mori S, Sasaki A, Mikami S, Shigematsu K, Nagashima Y. Clinicopathological study of 5 cases of renal cell carcinoma with t(6;11)(p21;q12). Pol J Pathol、査読あり、Vol.68、No. 1、2017、pp. 97-101. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27543862>

Lopez-Beltran A, Paner G, Blanca A, Montironi R, Tsuzuki T, Nagashima Y, Chuang SS, Win KT, Madrugá L,

Raspolini MR, Cheng L. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the upper urinary tract. *Virchows Arch*. 査読あり.

doi: 10.1007/s00428-017-2117-z.
[Epub ahead of print] PubMed PMID: 28455741.

Nishimura K, Takagi T, Toda N, Yamamoto T, Kondo T, Ishida H, Nagashima Y, Tanabe K. A case of metastatic Xp11.2 translocation renal cell carcinoma successfully managed by cytoreductive nephrectomy followed by axitinib therapy. *Mol Clin Oncol*. 査読あり、Vol. 6、No. 3、2017、pp.362-364.

doi: 10.3892/mco.2017.1142.

Furuya M, Yao M, Tanaka R, Nagashima Y, Kuroda N, Hasumi H, Baba M, Matsushima J, Nomura F, Nakatani Y. Genetic, epidemiologic and clinicopathologic Studies of Japanese Asian patients with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Clin Genet*. 査読あり、Vol. 90、No.5、2016、pp.403-412.

doi: 10.1111/cge.12807.

Furuya M, Hasumi H, Baba M, Tanaka R, Iribe Y, Onishi T, Nagashima Y, Nakatani, Isono Y, Yao M. Establishment and characterization of BHD-F59RSVT, an immortalized cell line derived from a renal cell carcinoma in a patient with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Lab Invest*. 査読あり、2016 Dec 19.

doi:10.1038/labinvest.2016.137.

Hashimoto K, Honda K, Matsui H, Nagashima Y, Oda H. Flow cytometric analysis of ovarian cancer ascites: Response of mesothelial cells and

macrophages to cancer. *Anticancer Res*. 査読あり、Vol. 36、No. 7、2016、pp.3579-3584.

URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27354626

Ishihara H, Omae K, Iizuka J, Kobayashi H, Fukuda I, Kondo T, Hizuka N, Nagashima Y, Tanabe K.

Late recurrence of a malignant hypoglycemia - inducing pelvic solitary fibrous tumor secreting high - molecular - weight insulin - like growth factor-II: A case report with protein analysis. *Oncol Lett*. 査読あり、Vol. 12、No. 1、2016、pp.479-484.

doi: 10.3892/ol.2016.4665

Iribe Y, Yao M, Tanaka R, Kuroda N, Nagashima Y, Nakatani Y, Furuya M. Genome-wide uniparental disomy and copy number variations in renal cell carcinomas associated with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Am J Pathol*. 査読あり、Vol.186、No.2、2016、pp.337-346.

doi: 10.1016/j.ajpath.2015.10.013.

Kato I, Iribe Y, Nagashima Y, Kuroda N, Tanaka R, Nakatani Y, Hasumi H, Yao M, Furuya M. Fluorescence and chromogenic in situ hybridization of CEN17q may be useful for pathological diagnosis of chromophobe renal cell carcinomas associated with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Hum Pathol*. 査読あり、Vol.52、No.1、2016、pp.74-82.

doi: 10.1016/j.humpath.2016.01.004.

Kawanishi K, Honda K, Koike J, Hattori M, Fuchinoue S, Tanabe K, Oda H, Nagashima Y. A preliminary study

into the significance of intrarenal reflux in BK virus nephropathy after kidney transplantation. *Transplantation Direct*, 査読あり、Vol. 2、No.2、2016、ep64.

doi: 10.1097/TXD.0000000000000575

Mizushima T, Asai-Sato M, Akimoto K, Nagashima Y, Taguri M, Sasaki K, Nakaya MA, Asano R, Tokinaga A, Kiyono T, Hirahara F, Ohno S, Miyagi E. Aberrant expression of the cell polarity regulator aPKC / is associated with disease progression in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): A possible marker for predicting CIN prognosis. *Int J Gynecol Pathol* 査読あり、Vol.35、No.2、2016、pp.106-117.

doi: 10.1097/PGP.0000000000000228.

Asano R, Asai-Sato M, Miyagi Y, Mizushima T, Koyama-Sato M, Nagashima Y, Taguri M, Sakakibara H, Hirahara F, Miyagi E. Aberrant expression of erythropoietin in uterine leiomyomas and its implication in tumor growth. *Am J Obstet Gynecol*, 査読あり、Vol.213、No. 2、2015、199.e1-8.

doi: 10.1016/j.ajog.2015.02.016.

Furuya M, Beom Hong S, Tanaka R, Kuroda N, Nagashima Y, Nagahama K, Suyama T, Yao M, Nakatani Y. Distinctive expression patterns of GPNMB and folliculin in renal tumors in patients with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Cancer Sci*, 査読あり、Vol. 106、No.3、2015、pp. 315-323.

doi: 10.1111/cas.12601.

Iribe Y, Kuroda N, Nagashima Y, Yao M, Tanaka R, Gotoda H, Kawakami F, Imamura Y, Nakamura Y, Ando M, Araki

A, Matsushima J, Nakatani Y, Furuya M. Immunohistochemical characterization of renal tumors in patients with Birt-Hogg-Dube syndrome. *Pathol Int*, 査読あり、Vol.65、No.3、2015、pp.126-132.

doi:10.1111/pin.12254.

Ruan Y, Kovalchuck A, Jayanthan A, Nagashima Y, Kovalchuk O, Pinto A, Kirton A, Anderson R, Narendran A. Druggable targets in pediatric neurocutaneous melanocytosis (NCM): Molecular and drug sensitivity studies in xenograft and ex-vivo tumor cell culture to identify agents for therapy. *Neuro-Oncology*、査読あり、Vol.17、No.6、2015、pp.822-831.

doi: 10.1093/neuonc/nou310.

Yao M, Murakami T, Shioi K, Mizuno N, Ito H, Kondo K, Hasumi H, Sano F, Makiyama K, Nakaigawa N, Kishida T, Nagashima Y, Yamanaka S, Kubota Y. Tumor signatures of PTHLH overexpression, high serum calcium, and poor prognosis were observed exclusively in clear cell but not non clear cell renal carcinomas. *Cancer Medicine*, 査読あり、Vol. 3、No.4、2015、pp.845-854.

doi: 10.1002/cam4.270.

[学会発表](計4件)

石黒齊、秋本和憲、長嶋洋治 他、aPKCの発現異常は前立腺癌の発がんに関与する 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月7日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)。

長嶋洋治、他、腎腫瘍針生検の病理診断：ガイドラインの作成、第105回日本病理学会総会、2016年5月14日、仙台国際センター(宮城県仙台市)。

本村瞳、長嶋洋治、秋本和憲 他、ヒト乳癌におけるAtypical protein kinase C (aPKC) / と糖代謝機構との関連 第136回日本薬学会年会、2016年3月

27 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）。

Motomura H, Nagashima Y, Akimoto K
他、Correlation between the expression
levels of aPKC / and GLO1 in breast
cancer. 4th International
Postgraduate Conference on
Pharmaceutical Science. 2016 年 2 月
27 日、東京理科大学野田キャンパス（千
葉県野田市）。

〔図書〕（計 1 件）

下正宗、長嶋洋治（編集）羊土社、正
常画像と比べてわかる病理アトラス（改
訂版）2015、341。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.twmu.ac.jp/univ/medical/subject/detail.php?id=02030>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長嶋洋治 (NAGASHIMA, Yoji)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：10217995

(2) 研究分担者

秋本和憲 (AKIMOTO, Kazunori)
東京理科大学・薬学部・准教授
研究者番号：70235104

(3) 連携研究者

上村博司 (UEMURA, Hiroji)
横浜市立大学・附属病院・教授
研究者番号：70254208

石黒斉 (ISHIGURO, Hitoshi)
横浜市立大学・医学部・客員准教授
研究者番号：00381666

中井川昇 (NAKAIGAWA, Noboru)
横浜市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：00237207

市川靖史 (ICHIKAWA, Yasushi)
横浜市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70254208

青木一郎 (AOKI, Ichiro)
横浜市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00184028

大橋健一 (OHASHI, Ken-ichi)
横浜市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：40231203

(4) 研究協力者

泉澤祐介 (IZUMISAWA, Yuhsuke)
横浜市立大学・大学院生

水島太一 (MIZUSHIMA, Taichi)
横浜市立大学・大学院生

川島真人 (KAWASHIMA, Masato)
横浜市立大学・技術吏員