

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460660

研究課題名(和文) 悪性中皮腫におけるATBF1リン酸化状態と細胞内局在-悪性度との関連性の究明-

研究課題名(英文) Phosphorylation of ATBF1 and its intracellular localization in malignant mesothelioma - investigation of the association with malignant behavior

研究代表者

湊 宏 (MINATO, Hiroshi)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：10293367

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)：悪性中皮腫におけるATBF1の役割を探索する目的で、ヒト悪性中皮腫細胞株(NCI-H2452、MSTO-211H、NCI-H28)と良性中皮細胞株(Met-5A)の培養を行った。Met-5A株からATBF1ノックアウト株を作製した。それらのMet-5A亜株とMSTO-211H、NCI-H28株にLuc遺伝子の導入を行い、ヌードマウスの腹腔内に移植した。発光量の変化を観察したところ、MSTO-211Hでは順調に腹腔内に腫瘍の増殖が確認できたが、Met-5A、NCI-H28株では2週間程度で腫瘍の増殖が確認できなかった。現在のところ、ATBF1のノックアウトのみでは、腫瘍化されない可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We cultured human malignant mesothelioma cell lines (NCI-H 2452, MSTO-211 H, NCI-H 28) and benign mesothelial cell line (Met-5 A) to explore the role of ATBF 1 in malignant mesothelioma. ATBF1 knockout strain was prepared from Met-5A strain using a CRISPR method. Luc gene was inserted into these Met-5A sub-strains and MSTO-211 H, NCI-H 28 strain and transplanted into the abdominal cavity of nude mice. By observing the change in the amount of luminescence, tumor growth was successfully confirmed intraabdominal cavity in MSTO-211H, whereas tumor growth could not be confirmed in Met-5A, NCI-H28 strain after about 2 weeks. Currently, knockout of ATBF1 alone may not cause tumorigenesis.

研究分野：病理学

キーワード：悪性中皮腫 ATBF1 癌抑制遺伝子 培養細胞 細胞内局在 核細胞質移行 遺伝子ノックアウト リン酸化

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫(以下中皮腫)は、漿膜発生の悪性腫瘍で、その予後は平均1-2年と非常に悪性度の高い腫瘍である。現在有効な治療法は確立されておらず、腫瘍の発生機序や主たる増殖因子に関してはほとんど解明されていない。我が国では今後少なくとも30年間は患者が増加するといわれており、その死亡数は10万人を超えると予想されている。さらに阪神・淡路大震災や東日本大震災によるアスベスト飛散の影響もあり、その発生は今後さらに増加する可能性がある。

AT motif binding factor-1(以下 ATBF1)は最大級の DNA 結合蛋白で、当初は -fetoprotein の転写調節蛋白として発見されたが(Morinaga, Miura, Mol Cell Biol 1991)、その後、神経の発達に深く関与することや、また胃癌、乳癌、前立腺癌などでは癌抑制遺伝子としての働きがあり、感度の高い予後因子であることが判明した。

我々は現在まで、中皮腫34例と反応性中皮37例の外科材料を用いて、ATBF1抗体の免疫組織化学を行い、反応性中皮では有意に細胞質よりも核に発現が見られ、中皮腫では有意に細胞質に発現がみられることを見出した。また中皮腫では細胞質に強く発現がみられるものほど、組織型に関係なく予後不良であることを学会報告した。同様の傾向は頭頸部の扁平上皮癌や皮膚癌でも最近報告がある。おそらく核に存在することでATBF1は癌抑制遺伝子としての機能を保つものと思われるが、癌での細胞質移行の機序やその細胞生物学的意義に関しては未明である。最近、我々のグループは、マウス胎仔脳では質量分析でATBF1の多くの部分にリン酸化を伴っており、酵素抗体法では核に強く発現するのに対して、成体脳ではリン酸化が消失し、核内の発現が消失することを見出した。同時に、全長を有するATBF1はリン酸化を伴っているが、脱リン酸化したATBF1は断片化している可能

性を示した。これらの結果より、中皮腫においてもATBF1の脱リン酸化によってATBF1が細胞質へ移行し、癌抑制遺伝子としての機能の消失や、種々の蛋白との相互作用により腫瘍細胞の悪性度を増加させている可能性がある。

2. 研究の目的

ヒト悪性中皮腫における癌抑制遺伝子ATBF1の役割を、リン酸化と細胞内局在との関連性を中心に解析する。複数の培養細胞株とヒト悪性中皮腫例の病理組織を対象とし、ATBF1のリン酸化の有無と細胞内局在、mRNA量を、蛍光・酵素抗体法及びブロッティング法、定量PCR法等を用い解析する。さらに細胞増殖能や他の癌抑制遺伝子発現との関連性、癌幹細胞因子の発現との関連性を解析する。

3. 研究の方法

(1) ATBF1 mRNA 発現量とリン酸化、増殖能との関連性の解析

培養細胞を用い、ATBF1 mRNAの発現量との関連性、細胞増殖能、リン酸化との関連性を解析する。悪性、良性の中皮細胞株に対して、ホスファターゼを含むリン酸化に影響を与える種々の薬剤やATBF1のsiRNAを投与し、リン酸化ATBF1量の変化や細胞形態の変化、増殖能の変化を調査する。

(2) 悪性中皮腫におけるATBF1の細胞内局在とリン酸化の有無との関連性の解析

複数のヒト中皮腫細胞株と良性中皮細胞株を用い、Phos-tagあるいはリン酸化蛋白濃縮キットを用いたウエスタンブロットにより、リン酸化ATBF1量の相違を調べ、酵素・蛍光抗体法での細胞内局在との関連性を分析する。

(3) ATBF1の細胞内局在と癌抑制遺伝子、癌幹細胞マーカー発現との関連性の解析

胃癌では、TGF β の刺激によりATBF1が細胞質から核内に移行し、p53と協調してp21な

どの他の癌抑制遺伝子のプロモーターを活性化すると考えられている(Mabuchi, Miura 2010)。中皮腫細胞株においても TGF の刺激による ATBF1 の細胞内局在の変化と p21、p53 の発現との関連性や、中皮腫で欠失の多い p16、p14 などの癌抑制遺伝子との関連性を探る。中皮腫の組織切片でも同様に ATBF1 の細胞内局在と各種ホスファターゼの発現、他の癌抑制遺伝子との関係を探る。また未だ明らかとなっていない中皮腫における癌幹細胞マーカー候補をさらに調査し、これらと ATBF1 の発現との関連性を調べる。

4. 研究成果

当初は、ATBF1 のリン酸化の有無を中心に解析しようと試みたが、ウエスタンブロットやリン酸化の有無に関する検索に関して、明瞭な結果が得ず、悪性中皮腫における ATBF1 の癌抑制遺伝子としての役割を直接探索する方法に切り替えた。具体的には、ヒト悪性中皮腫細胞株 3 種(NCI-H2452、MSTO-211H、NCI-H28)と良性中皮細胞株 1 種(Met-5A)の培養を継続し、ATBF1 遺伝子変化との関連性を探索した。Met-5A のそれぞれの亜株に、ATBF1 の shRNA 発現レトロウイルスを加え、ATBF1 のノックダウンモデルを作成した。また、同様に Met-5A に CRISPR 処理を行い、ATBF1 のノックアウトモデルを作製した。ATBF1 遺伝子のノックアウト、ノックダウンに関してはそれぞれ定量 PCR を用いて ATBF1 mRNA の減少を確認した。またセルブロットを作製し、抗 ATBF1 抗体(D1-120)を用いて ATBF1 量の発現が低下していることを確認した。Met-5A を用い CRISPR による ATBF1 ノックダウン 3 株を作製することができた。これらの Met-5A 亜株 3 種と MSTO-211H、NCI-H28 細胞にそれぞれ Luc 遺伝子の導入を行い、EGFP を挿入したもの、全く遺伝子操作を行わない対照を含めこれらの細胞をヌードマウスの腹腔内に移植した。発光イメージ

ングシステム(IVIS)を用いて経時的に発光量の変化を観察したところ、MSTO-211H では一か月後も順調に腹腔内に腫瘍細胞の増殖が確認できたが、Met-5A、NCI-H28 株では 2 週間程度で細胞量が急激に低下し、その後の腫瘍の増殖が確認できなかった。現在のところ、ATBF1 のノックダウンのみでは、腫瘍化が確認できておらず、ATBF1 のノックダウンのみでは、腫瘍化されない可能性がある。ただし、悪性中皮腫株である NCI-H28 でも移植に成功しておらず、まだ確定的ではない。

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 23 件)

(1) Kawaguchi M, Minato H (25 番目), Miura Y(28 番目)、他 25 名. A diagnostic marker for superficial urothelial bladder carcinoma: lack of nuclear ATBF1 (ZFH3) by immunohistochemistry suggests malignant progression. BMC Cancer. 査読有 16, 2016, 805. doi: 10.1016/j.cis.2017.05.004.

(2) Nakano Y, Noguchi M, Minato H (他 5 名, 8 番目). The roles of 18F-FDG-PET/CT and US-guided FNAC in assessment of axillary nodal metastases in breast cancer patients. Breast Cancer. 査読有 24, 2017, 121-127. doi: 10.1007/s12282-016-0684-5.

(3) Mizuguchi K, Minato H (他 3 名). Cytopathological findings of primary pulmonary Ewing family of tumors with EWSR1 translocation: A case report. Thorac Cancer 査読有 7, 2016, 602-606. doi: 0.1111/1759-7714. 12347.

(4) Nakada S, Minato H, Nojima T.

Clinicopathological differences between variants of the NAB2-STAT6 fusion gene in solitary fibrous tumors of the meninges and extra-central nervous system. *Brain Tumor Pathol.* 査読有 33, 2016, 169-174 doi: 10.1007/s10014-016-0264-6.

(5) Noguchi M, Noguchi M, Minato H(8 番目), 他 5 名. Feasibility study of axillary reverse mapping for patients with clinically node-negative breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 査読有 42, 2016, 650-6. doi: 0.1016/j.ejso.2016.02.244.

(6) Murakami M, Minato H(4 番目), Takegami I(7 番目), 他 4 名. Japanese encephalitis virus replication and inhibitory effect of shRNA in mice. *Adv Microbiol.* 査読有 6, 2016, 462-470. doi: 10.4236/aim.2016.66045.

(7) 水口聖哉, 中野万里子, 湊 宏(6 番目), 他 5 名. 対側乳腺に微小浸潤癌を伴った乳腺発生 Rosai-Dorfman 病の 1 例 日本臨床細胞学会雑誌. 査読有 55, 2016, 329-333.

(8) 塩谷晃広, 中田聡子(3 番目), 湊 宏(4 番目), 他 2 名. CT で偶然発見された diffuse pulmonary meningotheliomatosis の 1 例. 診断病理. 査読有 33, 2016, 350-354.

(9) Yoshizaki H, Kuwajima Y, Minato H, Kiyokawa E. Regulation of Ripply1 expression in MDCK organoids. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有 468, 2015, 337-42. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.099.

(10) Minato H(1 番目), Kinoshita E, Nakada S(3 番目), 他 9 名. Thymic lymphoid hyperplasia with multilocular thymic cysts diagnosed before the Sjögren syndrome

diagnosis. *Diagn Pathol.* 査読有 10, 2015, 103. doi: 10.1186/s13000-015-0332-y.

(11) Nakada S(1 番目), Minato H(2 番目), Takegami T(3 番目), 他 8 名. NAB2-STAT6 fusion gene analysis in two cases of meningeal solitary fibrous tumor/hemangiopericytoma with late distant metastases. *Brain Tumor Pathol.* 査読有 32, 2015, 268-74. doi: 10.1007/s10014-015-0220-x.

(12) 中田 聡子(1 番目), 湊 宏(2 番目), 他 5 名. 北陸地方における液状化細胞診の普及状況と諸問題 アンケート調査から. *日本臨床細胞学会雑誌* 査読有 54, 2015, 128-134.

(13) 加藤 諒, 及川 卓, 湊 宏(6 番目), 他 3 名. 肺原発 NUT midline carcinoma の 1 例. 肺癌. 査読有 55, 2015, 1080-1085.

(14) Kiyokawa E, Minato H. Activated K-RAS and its effect on morphological appearance. *J Biochem.* 査読有 2014 156, 2014, 137-145. doi: 10.1093/jb/mvu041.

(15) Sasagawa Y, Nakada S(3 番目), Minato H(4 番目), 他 4 名. Narrow band imaging-guided endoscopic biopsy for intraventricular and paraventricular brain tumors: clinical experience with 14 cases. *Acta Neurochir (Wien).* 査読有 156, 2014, 681-687. doi: 10.1007/s00701-014-

(16) Shimizu J, Kamesui T, Minato H(7 番目), 他 4 名. Four Cases of Invasive Anterior Mediastinal Tumors Definitively Diagnosed by the Chamberlain Procedure. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 査読有 20, 2014, 434-440. doi: 10.5761/atcs.cr.12.02185.

(17) Kato K, Segami N, Minato H(4 番目), 他 1 名. Rheumatoid nodule in the lower lip of a patient with rheumatoid arthritis: a novel case report and review of literature. J Oral Maxillofac Surg 査読有 72, 2014, 1532.e1-5. doi: 10.1016/j.joms.2014.03.034.

(18) Suzuki S, Kurabe N, Minato H(3 番目), 他 4 名. A rare Japanese case with a NUT midline carcinoma in the nasal cavity: A case report with immunohistochemical and genetic analyses. Pathol Res Pract 査読有 210, 2014, 383-8. doi: 10.1016/j.prp.2014.01.013.

(19) Suzuki S, Tanioka F, Minato H(3 番目), 他 3 名. Breakages at YWHAE, FAM22A, and FAM22B loci in uterine angiosarcoma: A case report with immunohistochemical and genetic analysis. Pathol Res Pract. 査読有 210, 2014, 130-4. doi: 10.1016/j.prp.2013.09.009.

(20) Mizuno T, Ishigami K, Minato H(8 番目), 他 19 名. Endocardial invasion of lung cancer undiagnosable before autopsy. Case Rep Oncol 査読有 7, 2014, 144-148. doi: 10.1159/000360394.

(21) 中田聡子(1 番目), 齋藤勝彦, 湊 宏(7 番目), 他 5 名. 上皮様の皮膚血管肉腫の 1 例. 診断病理. 査読有 31, 2014, 340-343.

(22) 三輪有香子, 中田聡子(2 番目), 湊 宏(7 番目), 他 5 名. 散発型と考えられる甲状腺篩(・モルラ)型乳頭癌の 1 例 診断病理. 査読有 31, 2014, 234-238.

(23) 黒瀬 望, 中田聡子(5 番目), 湊 宏(8 番目), 他 6 名. 化学療法後の再発で未分化転化し、軟骨分化を示した悪性黒色腫の 1 例

診断病理. 査読有 31, 2014, 88-92.

[学会発表](計 9 件)

(1) 湊 宏, 薄田勝男, 浦本秀隆. 肺腺癌における HER ファミリータンパク発現と臨床病理学的解析 第 57 回日本肺癌学会学術集会 2016 年 12 月 19-21 日, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

(2) 山下 学, 中野万里子, 朝倉善史, 寺内利恵, 竹中美千穂, 嶋口智恵, 中田聡子, 黒瀬 望, 湊 宏, 野島 孝之. 乳癌患者の胸水に異型細胞が出現し、癌の転移との鑑別が問題となった悪性中皮腫の 1 例. 第 57 回日本臨床細胞学会総会春期大会 2016 年 5 月 28-29 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

(3) 湊 宏, 熊谷泉那, 塩谷晃広, 中田聡子, 黒瀬 望, 野島孝之. 悪性中皮腫とアデノマトイド腫瘍における EZH2 及び p16 蛋白発現. 第 105 回日本病理学会総会 2016 年 5 月 12-14 日, 仙台国際センター (宮城県仙台市).

(4) 湊 宏, 薄田勝男, 佐川元保. 悪性中皮腫とアデノマトイド腫瘍における EZH2 及び p16 蛋白発現の相違と、鑑別診断における有用性. 第 56 回日本肺癌学会学術集会 2015 年 11 月 27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

(5) 中田 聡子, 湊 宏, 野島 孝之. 病理検査におけるコンタミネーションは防ぐことができるか グループ学習の試み. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会 2015 年 11 月 19-22 日, 長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市)

(6) 湊 宏, 木下英理子, 中田聡子, 黒瀬 望, 野島孝之, 田中祐吉, 鈴木潮人, 谷岡

書彦. 鼻副鼻腔 Nut midline carcinoma (NMC)の臨床病理学的解析とFISHの応用. 第104回日本病理学会総会 2015年4月30-5月2日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).

(7) 中田聡子, 湊 宏, 竹上 勉, 黒瀬 望, 木下英理子, 三輪有香子, 塩谷晃広, 池田博子, 小林雅子, 野島孝之. 転移を来した髄膜原発 cellular solitary fibrous tumor 2例におけるNAB2-STAT6融合遺伝子解析. 第104回日本病理学会総会 2015年4月30-5月2日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).

(8) 湊 宏, 田中良, 薄田勝男, 佐川元保. 多房性胸腺嚢胞を伴った胸腺リンパ組織過形成の1例. 第55回日本肺癌学会学術集会 2014年11月14-16日, 国立京都国際会館 (京都府京都市)

(9) 中田聡子, 湊 宏, 寺内利恵, 福田華子, 三輪有香子, 木下英理子, 黒瀬 望, 福島万奈, 中野万里子, 野島孝之. 北陸地方における液状化細胞診の普及状況と諸問題-アンケート調査から- 第55回日本臨床細胞学会総会 2014年6月6-7日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

[図書](計 8 件)

(1) 湊 宏. 医学書院. Congenital mesoblastic nephroma: 先天性中胚葉性腎腫. 泌尿器病理診断トレーニング 2017, 11-14.

(2) 湊 宏. 医学書院. Clear cell sarcoma of the kidney: 腎明細胞肉腫 泌尿器病理診断トレーニング 2017, 23-26.

(3) 湊 宏. 金原出版. 腫瘍様病変. 徹底レクチャー唾液・唾液腺 2016, 184-193.

(4) 湊 宏. 文光堂. 腫瘍類似病変. 腫瘍病理鑑別診断アトラス 頭頸部腫瘍 唾液腺腫瘍 2015, 161-168.

(5) 湊 宏. 文光堂. 術中迅速診断の意義. 腫瘍病理鑑別診断アトラス 頭頸部腫瘍 唾液腺腫瘍 2015, 231-236.

(6) 湊 宏. 文光堂. 術中迅速診断(唾液腺腫瘍を除く)の意義. 腫瘍病理鑑別診断アトラス 頭頸部腫瘍 上気道・咽頭・口腔腫瘍と歯源性腫瘍 2015, 282-286.

(7) 湊 宏. 診断と治療社. 呼吸器 Q16-21. 読む・解く・学ぶ 細胞診 Quiz 50 ベーシック篇 2014, 43-54.

(8) 湊 宏. 診断と治療社. 呼吸器 Q17-22. 読む・解く・学ぶ 細胞診 Quiz 50 アドバンス篇 2014, 43-54.

[その他]

ホームページ等

http://www.kanazawa-med.ac.jp/clinpath/g1_study/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

湊 宏 (MINATO, Hiroshi)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号:10293367

(2)研究分担者

三浦 裕 (MIURA, Yutaka)
名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授
研究者番号:90285198

中田 聡子 (NAKADA, Satoko)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号:30569091

竹上 勉 (TAKEGAMI, Tsutomu)
金沢医科大学・総合医学研究所・教授
研究者番号:10113490