

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293086

研究課題名(和文) SFN, IGBP1に着目した肺腺癌発生の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of lung adenocarcinogenesis based on SFN and IGBP1

研究代表者

野口 雅之 (NOGUCHI, MASAYUKI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：00198582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺腺癌の初期悪性化に関与するSFNやIGBP1の役割を解析した。IGBP1の発現をコントロールするmiR群を同定した。A549を用いた遺伝子導入実験でmiR-34b, miR-138, miR-3941がA549の増殖を抑制することがわかった。

SFNshRNA遺伝子移入A549をSCIDマウスに移植すると、shSFNA549を移植したマウスは腫瘍形成や転移が抑制された。次にSFN遺伝子を組み込んだベクターを作製しTGマウスを作製した。このTGマウスを用いて化学発がん実験を行うとTGマウスでは有意に腫瘍形成能が上昇した。以上より、SFNは肺腺癌の初期の「がん遺伝子」と言えることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Functional role of SFN and IGBP1 at early stage of malignant progression of lung adenocarcinoma has been analyzed.

We identified miRs those control the expression of IGBP1. A549 transferred with miR-34-b, miR-138, and miR-3841 was suppressed its proliferation in vitro. In vivo, tumor development or metastasis to the lung was reduced in shSFN-transfected A549 cells. We generated SFN-transgenic mice (Tg-SPC-SFN+/-) showing lung-specific expression of human SFN under the control of a tissue-specific enhancer, the SPC promoter. We found that Tg-SPC-SFN+/- mice developed lung tumors at a significantly higher rate than control mice after administration of chemical carcinogen, NNK. SFN appears to be a novel oncogene with potential as a therapeutic target.

研究分野：診断病理学

キーワード：Stratifin IGBP1 Lung adenocarcinoma Carcinogenesis

1. 研究開始当初の背景

(1) A/J マウスを用いた肺腺癌の化学発癌実験で腫瘍発生前の肺組織でコントロール肺に比べて発現が亢進する遺伝子として Lactoferrin を同定した。この lactoferrin に特異的に結合するタンパクとして同定されたのが IGBP1 である。IGBP1 は PP2Ac に結合して細胞のアポトーシスを阻害する。IGBP1 は肺腺癌の初期から発現が亢進しており、肺腺癌のアポトーシス機能不全に関与している可能性が高い。

(2) SFN (stratifin, 14-3-3) は上皮内腺癌と初期浸潤癌の間での発現遺伝子の網羅的解析 (mRNA array analysis) で初期浸潤癌に有意に発現が亢進している遺伝子の一つとして同定した遺伝子である。SFN は上皮内腺癌ではその約 1 割にしか発現を認めないが初期浸潤癌以降の浸潤癌ではほぼ 100% の症例に発現の亢進が認められる。SFN の発現は正常肺では SFN のプロモーター領域のメチル化で制御されているが、腫瘍化すると脱メチル化が起こり、その発現は亢進する。SFN の発現を抑制すると肺腺癌細胞株の増殖は抑制され、逆にその発現を亢進すると増殖能は亢進する。したがって SFN は初期肺腺癌の増殖能力に関与している可能性が高い。

2. 研究の目的

肺腺癌の発がんとその初期悪性化の分子基盤に関与する IGBP1 および SFN の役割を解析する。

3. 研究の方法

(1) IGBP1

MiRNA array を用いて初期肺腺癌で発現の変化している miRNA を網羅的に解析する。一方で IGBP1 のプロモーター領域の核酸配列からこれに結合しうる miRNA をコンピュータ上で同定する。以上 2 つの方法で得られた IGBP1 の発現のコントロールに関与すると考えられる miRNA を同定し、その機能を解析する。

(2) SFN

SFN の shRNA を肺腺癌細胞株 A549 に遺伝子移入して SFN の発現低下した肺腺癌細胞株を作製し、SCID マウスに同所移植、あるいは尾静脈から移植してその生着状況を観察した。ヒト SFN の mRNA を発現するカセットを肺末梢上皮細胞で特異的に発現される SPC のプロモーター領域の下流に組み込み、ICR マウスで TG マウスを作製する。作製されたマウスを用いて化学発がん実験を行い、SFN が肺腺癌における「がん遺伝子」であることを証明する。

4. 研究成果

(1) IGBP1 の発現をコントロールする miR 群を同定した。その結果、miR-374a, miR-34b, miR-138, miR-1909, miR-3941 が肺腺癌で正常肺組織に比べて有意に発現が低下していることがわかった。また肺腺癌細胞株 A549

を用いて miR-34b, miR-138, miR-3941 を遺伝子移入するとその増殖が抑制されることがわかった。

これらの miR が IGBP1 のプロモーター領域に特異的に結合してその発現を抑制しているのかを証明するためにルシフェラーゼ解析を行うこととした。現在ルシフェラーゼ遺伝子の下流に IGBP1 遺伝子のプロモーター領域を挿入した発現ベクターの構築が終了し、実際の miR を用いたルシフェラーゼ解析をおこなう予定である。

(2) SFN の発現は前述したように、そのプロモーター領域のメチル化によって制御されており、正常肺では SFN プロモーター領域の CpG サイトはほぼ完全にメチル化されているのに対し、腺癌細胞では少なくとも部分的には脱メチル化されている。

SFN の shRNA を肺腺癌細胞株 A549 に遺伝子移入した。この細胞株を SCID マウスに同所移植、あるいは尾静脈から移入した。その結果、shSFN を同所移植した 4 匹には 8 匹中 2 匹にしか腫瘍が形成されなかったが、コントロールの細胞を同所移植した 4 匹には全例腫瘍が形成された。

尾静脈移入例では shSFN 移入例 8 匹全例に腫瘍の形成は認められなかったがコントロールの 4 匹には全例腫瘍の形成が認められた。

SFN が肺腺癌発生の初期に関わるドライバー遺伝子 (癌遺伝子) である可能性が高いと考え、肺末梢上皮細胞に特異的なプロモーターである SPC 遺伝子のプロモーターの下流に SFN 遺伝子を組み込んだベクターを作製し、これを用いて ICR マウスで TG マウスを作製した。この TG マウスを用いて NNK を投与した化学発がん実験を行うとコントロールマウスでは 3/27 (11.1%) しか腫瘍形成が見られないのに対し、TG マウスでは 10/23 (47.8%) に腫瘍形成が認められた。

SFN は肺腺癌の初期に発現が亢進し、肺腺癌の発生、初期の悪性化に関与することが明らかになり肺腺癌の初期の「がん遺伝子」と言えることがわかった。

(3) 以上の成果をまとめて Molecular Cancer (2015) 14:142-147 に報告した。

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 11 件)

Shiozawa T, Iyama S, Toshima S, Sakata A, Usui S, Minami Y, Sato Y, Hizawa N, Noguchi M. Dimethylarginine imethylaminohydrolase 2 promotes tumor angiogenesis in lung adenocarcinoma. *Virchows Archiv*. 査読有. 468(2), 2016. pp.179-190
doi: 10.1007/s00428-015-1863-z.

Itoguchi N, Nakagawa T, Murata Y, Li Dongping, Shiba-Ishii A, Minami Y, Noguchi

M. Immunocytochemical staining for stratifin and OCIAD2 in bronchial washing specimens increases sensitivity for diagnosis of lung cancer. *Cytopathology*. 査読有.6(6),2015.pp.354-61
doi: 10.1111/cyt.12220.

Shiba-Ishii A, YunJung Kim, Toshihiro Shiozawa, Shinji Iyama, Kaishi Satomi, Junko Kano, Shingo Sakashita, Yukio Morishita, Noguchi M. Stratifin accelerates progression of lung adenocarcinoma at an early stage. *Molecular Cancer*. 査読有 14(1),2015.pp.142-142
doi: 10.1186/s12943-015-0414-1.

Iwakawa R, Kohno T, Totoki Y, Shibata T, Tsuchihara K, Mimaki S, Tsuta K, Narita Y, Nishikawa R, Noguchi M, Harris CC, Robles AI, Yamaguchi R, Imoto S, Miyano S, Totsuka H, Yoshida T, Yokota J. Expression and clinical significance of genes frequently mutated in small cell lung cancers defined by whole exome/RNA sequencing. *Carcinogenesis*. 査読有 36(6),2015.pp.616-21.
doi: 10.1093/carcin/bgv026.

Murata Y, Minami Y, Iwakawa R, Yokota J, Usui S, Tsuta K, Shiraishi K, Sakashita S, Satomi K, Iijima T, Noguchi M. ECT2 amplification and overexpression as a new prognostic biomarker for early-stage lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*. 査読有 105(4),2014.pp.490-7
doi: 10.1111/cas.12363.

Usui S, Minami Y, Shiosawa T, Iyama S, Sato Y, and Noguchi M. Differences in the prognostic implications of vascular invasion between lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Lung Cancer* 査読有 82(3),2013.pp.407-12.
doi: 10.1016/j.lungcan.2013.09.001.

Thunnissen E, Beliën JA, Kerr KM, Chung JH, Flieder DB, Noguchi M, Yatabe Y, Hwang DM, Lely RJ, Hartemink KJ, Meijer-Jorna LB, Ysaó MS. In compressed lung tissue microscopic sections of adenocarcinoma in situ may mimic papillary adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 査読有 137(12),2013.pp.1792-7.
doi: 10.5858/arpa.2012-0613-SA.

Iwakawa R, Takenaka M, Kohno T, Shimada Y, Totoki Y, Shibata T, Tsuka K, Nishikawa R, Noguchi M, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Yokota J. Genome-wide identification of genes with amplification and/or fusion in small cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 査読有.52(9),2013.pp.802-16.
doi: 10.1002/gcc.22076.

Nakazato Y, Maeshima MA, Ishikawa Y,

Yatabe Y, Fukuoka J, Yokose T, Tomita Y, Minami Y, Asamura Y, Tachibana K, Goya T, Noguchi M. Inter observer agreement in the nuclear grading of primary pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 査読有 8(6),2013.pp.736-743.
doi: 10.1097/JTO

Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson A, Geisinger K, Yatabe Y, Ishikawa Y, Wistuba I, Flieder DB, Franklin W, Gazdar A, Hasleton PS, Henderson DW, Kerr KM, Nakatani Y, Petersen I, Roggli V, Thunnissen E, Tsao M. Diagnosis of Lung Adenocarcinoma in Resected Specimens: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. *Arch Pathol Lab Med*. 査読有 137(5), 2013.pp.685-705.
doi: 10.5858/arpa.2012-0264-RA.

Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson A, Geisinger K, Yatabe Y, Ishikawa Y, Wistuba I, Flieder DB, Franklin W, Gazdar A, Hasleton PS, Henderson DW, Kerr KM, Petersen I, Roggli V, Thunnissen E, Tsao M. Diagnosis of Lung Cancer in Small Biopsies and Cytology: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. *Arch Pathol Lab Med*. 査読有 137(5),2013. pp. 668-84.
doi: 10.5858/arpa.2012-0263-RA.

〔学会発表〕(計 10 件)

野口雅之. 新 WHO 分類における肺癌分類の要点と問題点. 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)」

Noguchi M. Lung Carcinogenesis : Molecular Pathology of Alveolar Premalignancy, IASLC2015 (the 16th IASLC World Conference on Lung Cancer) 2015 年 9 月 9 日、「Colorado Convention Center, Colorado(USA)」

Noguchi M. The New WHO Classification of Lung Adenocarcinoma, points for diagnosis and biological significance, APIAP 2015 : The 9th Asia Pacific IAP Congress, 2015 年 6 月 6 日、「Brisbane Convention & Exhibition Centre, Brisbane Queensland(Australia)」

Noguchi M Adenocarcinoma of the lung, Pathology Expert Forum: The WHO Classification of Lung Tumors2015、2015 年 5 月 17 日、「GIS NTU Convention Center, Taipei(Taiwan)」

野口雅之. 「宿題報告 2」肺腺癌の組織発生

と悪性化の病理学、第 104 回日本病理学会総会、2015 年 4 月 30 日～5 月 2 日、「名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)」

野口雅之・特別講演「Early genetic and phenotypic alterations of lung adenocarcinoma」、Training of the Education Program for Pathology and Genetic Tests、2014 年 11 月 10 日、「つくば臨床検査教育・研究センター(茨城県・つくば市)」

Noguchi M. Scientific

program :Pulmonary pathology sessions
「Lung Cancer:Preinvasive and Minimally Invasive Adenocarcinoma」、The 30th Congress of the International Academy of Pathology(IAP2014)、2014 年 10 月 6 日(月)、「Bangkok Convention Centre at Central World Bangkok, Bangkok (Thailand)」

村田佳彦、南優子、岩川麗香、横田淳、野口雅之・ECT2 の遺伝子異常は早期肺腺癌における新規予後マーカーである、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

糸口直江、佐藤泰樹、永田千草、南優子、野口雅之・肺腺癌の悪性度因子としての OCIAD2 の臨床病理学的意義、第 102 回日本病理学会総会、2013 年、6 月 8 日、ロイトン札幌(北海道・札幌市)

佐藤泰樹、坂下信悟、南優子、野口雅之・進行肺腺癌における IGBP1 の異常発現の解析、第 102 回日本病理学会総会、2013 年、6 月 7 日、ロイトン札幌(北海道・札幌市)

〔図書〕(計 2 件)

W.D.Travis,E.Brambilla,
A.P.Burke,A.Marx,A.G.Nicholson,Noguchi M.
WORLD HEALTH ORGANIZATION (Lyon,France)
WHO Classification of Tumours of Lung,
Pleura, Thymus &Heart, 4th ed.(WHO
Classification of Tumours, Vol.7).2015:
412 (pp.17-21.26-37.44-55.80-85.)

Ignacio I ,Wistuba ,Elisabeth
Brambilla ,M Noguchi .The IASLC
Multidisciplinary Approach to Thoracic
Oncology .CLASSIC ANATOMIC PATHOLOGY
AND LUNG CANCER. 2014 CHAPTER 17.952
(pp . 217-240)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

野口 雅之 (NOGUCHI , Masayuki)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号 : 0 0 1 9 8 5 8 2

(2)研究分担者

()

研究者番号 :