

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790542

研究課題名（和文） 発癌に関わる TGF- $\beta$ 1 結合蛋白質の亜型に着目した発現・機能解析と癌診断への応用研究課題名（英文） The expression and role of TGF- $\beta$ 1 binding protein subtype on carcinogenesis

研究代表者

東 朋美（HIGASHI TOMOMI）

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：20293342

研究成果の概要（和文）：多種の臓器癌（胃癌、卵巣癌、子宮癌、大腸癌）の細胞株を用いて、LTBP-1 の発現抑制と、LTBP-1L、LTBP-1S の強制発現による機能変化を解析した結果、全ての細胞株において顕著な変化は認められなかった。一方、臨床組織検体における、LTBP-1L、LTBP-1S 共通抗体による発現解析の結果では、胃癌の悪性度との関連が認められた ( $p < 0.01$ )。従って、同蛋白は癌診断や治療の標的候補となりうることが示唆された。しかし、LTBP-1L、LTBP-1S それぞれの機能解明にはさらなる解析が必要である。

研究成果の概要（英文）：Knockdown of LTBP-1L or LTBP-1S in cancer cell lines including stomach cancer, ovarian cancer, uterine cancer, colorectal cancer, had no remarkable change in cell shape, cell growth and cell invasion activity. Forced expression of LTBP-1L or LTBP-1S also showed no remarkable effect on cancer cell lines. On the other hand, there was correlation between LTBP-1 expression and cancer-stroma relationship of stomach cancer by immunohistochemical analysis in clinical samples ( $p < 0.01$ ). Thus, it was suggested that LTBP-1 can be a candidate of the diagnostic marker and the target of medical treatment. However, further studies were required to determine the LTBP-1L and LTBP-1S function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：衛生学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：TGF- $\beta$ 1, LTBP-1L, 発癌,

## 1. 研究開始当初の背景

TGF- $\beta$ 1 (Transforming growth factor- $\beta$ 1) は、細胞増殖やアポトーシス、組織の炎症や免疫反応など様々な生理活性

を持ち、発癌や癌の進行において重要な役割をしていることがよく知られている。しかし、発癌や初期癌の進行を抑制する一方で、進行した癌ではさらに転移など悪化を促進することが多数報告さ

れ、発現量や活性の調節が重要であると推測された。

申請者らは、TGF- $\beta$ 1 結合蛋白質 LTBP-1(latent TGF- $\beta$ 1 binding protein-1) が、TGF- $\beta$ 1 の細胞外分泌や活性化を制御することに注目し、継続的に解析を進めてきた。LTBP-1Lには亜型の LTBP-1L(long) と LTBP-1S(short)があり、癌で LTBP-1L だけが高発現していることや、その LTBP-1L のプロモーター配列に転写発現活性に影響する新規の一塩基多型が存在することを報告した。しかし、発癌や癌の悪化における LTBP-1L の役割や、作用機序は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、癌細胞における LTBP-1L の働きを明らかにするために、LTBP-1L と LTBP-1S を蛋白質発現レベルで区別して、癌との関係を明らかにすることを目的とした。さらに、詳細な臨床データとの関連を明らかにして、LTBP-1L 一塩基多型に基づく遺伝子診断への応用のための基礎的解析を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

LTBP-1S と比較解析し、両者に共通の機能と LTBP-1L に特異的な機能について情報を得るために、種々の癌培養細胞において LTBP-1 発現抑制細胞株を siRNA (Stealth RNAi) を用いた RNA 干渉により作成し、機能解析を行った。細胞の形態変化、生存(WST-1 試験)、細胞増殖(BrdU 取込試験)、運動能・浸潤能の変化(スクラッチ試験・マトリゲル試験)、により解析した。一方で、LTBP-1S と LTBP-1L それぞれの強制発現株を作成した。pIRES(internal ribosomal entry site)neo3 プラスミドに LTBP-1S と LTBP-1L の全長遺伝子をそれぞれ組み込んだ発現ベクターを構築し、リポフェクション法により細胞に導入し、機能解析を行った。培養液中の不活性型および活性型 TGF- $\beta$ 1 を ELISA 法で定量した。

また、LTBP-1L を特異的に認識する抗体は市販されていないため、作製を行った。LTBP-1L にのみ存在するアミノ酸配列と、LTBP-1S と LTBP-1L に共通のアミノ酸配列をそれぞれ GST 融合蛋白質として大腸菌で発現・精製し抗原とし、ラットを用いてそれぞれの特異抗体を作製した。ELISA 法により抗体価を測定した。

同時に、金沢大学附属病院の胃癌、大

腸癌症例を用いた解析も行った。手術摘出組織より抽出した RNA を用いて、リアルタイム PCR 法により、癌部、非癌部それぞれの LTBP-1S と LTBP-1L mRNA 発現量をそれぞれ定量した。また、上記の LTBP-1S と LTBP-1L 特異的抗体を用いた免疫組織化学染色法によりそれぞれの癌部、非癌部における発現を調べ、上記一塩基多型や臨床データ(年齢、臨床病期、癌の組織型、再発の有無、転移の有無、術後生存期間)との関連を解析した。

## 4. 研究成果

RNA 干渉を用いた LTBP-1 の発現抑制による機能変化を解析した結果、胃癌培養細胞株 TMK1 では発現抑制による細胞増殖能や遊走活性に顕著な変化は観察されなかった。この結果は、これまでの卵巣癌 JHOM1、大腸癌 HT29 と異なるものであった。LTBP-1 蛋白質は一般に発現量が低いために、RNA 干渉で発現抑制を行っても変化が見られなかったと考えられた。そこで、LTBP-1L、LTBP-1S それぞれの安定発現株を、胃癌 MKN1、TMK1、NUGC3、卵巣癌 JHOM1、子宮癌 HeLa、の細胞株で3クローンずつ樹立した。胃癌 KATOIII、卵巣癌 MCAS、RMUG-S、TYK-nu、大腸癌 HT29 の細胞株では、発現クローンが得られなかった。通常は微量で局在している LTBP-1L、LTBP-1S 蛋白質を高発現させたことで、後者の細胞株群では、細胞毒性が出たことも推測された。前者の細胞株群の発現株を用いて機能解析を行った結果、発現株によって細胞増殖能、細胞遊走、浸潤能にわずかな違いが見られたものの、全ての細胞株において、顕著な変化は認められなかった。高発現させた蛋白質の培養液中への分泌量も増加していなかった。従って、LTBP-1L、LTBP-1S がこれらの機能へ影響していない可能性と、両者ともに、細胞内での局在に加えて、細胞外マトリックスの構成成分であることから、培養系では顕著な変化が現れなかった可能性が考えられた。

LTBP-1S および LTBP-1L を特異的に認識する抗体を作製し、比較対照として市販の非特異的 LTBP-1 抗体を用いて大腸癌、胃癌の臨床症例組織で同蛋白質の発現を試みた結果、Western blotting 法では、LTBP-1S 蛋白質が特異的に検出され、LTBP-1L 蛋白質は検出されなかった。LTBP-1S のシグナルは、市販の抗 LTBP-1 抗体と比較すると弱かった。これは、ELISA 法で確認した抗体価が低かったた

めと考えられた。臨床検体組織における免疫組織染色法では、市販の抗 LTBP-1 抗体のみで同蛋白が検出された。従って、LTBP-1L と LTBP-1S を蛋白質発現レベルで区別して、癌との関係を明らかにするという当初の目的を変更し、市販の抗 LTBP-1 抗体により、臨床検体解析を進めた。

胃癌臨床組織 65 例で同蛋白の発現を解析したところ、癌部において組織型、肉眼型、間質のタイプと蛋白発現量との関連が見られた。病期、再発の有無、などとは関連がなかった。組織型では por2 で、肉眼型では 3, 4 で、高発現の傾向があり、間質 sci では有意に発現が高かった ( $p < 0.01$ )。非癌部では組織型、肉眼型、間質のタイプと蛋白発現量に関連は見られなかった。また、LTBP-1L プロモーターの一塩基多型と発現量に関連を調べたところ、非癌部で、ヘテロ型症例で発現が低かった ( $p < 0.05$ )。大腸癌組織 58 例でも同蛋白の発現を解析したところ、癌部、非癌部ともに臨床データや遺伝子型と蛋白発現量に関連は見られなかった。

一方、胃癌 (癌部 43 例、非癌部 38 例) の手術摘出組織から抽出した mRNA を使用してリアルタイム PCR による正常部と癌部での発現解析を行った。その結果、胃癌、大腸癌正常部では LTBP-1L、LTBP-1S とともに mRNA 発現レベルが低く、癌部では高発現している検体と発現が低い検体が混在していたが、組織型や病期などの臨床データ、遺伝子型との関連は見られなかった。

これらより、LTBP-1 の発現量や LTBP-1L 遺伝子型を癌化の早期発見マーカーとして活用することは不可であるが、LTBP-1 が癌の悪性化に関与している可能性が依然高く、癌の病理診断や治療の標的候補となりうることが示唆された。しかし、LTBP-1L および LTBP-1S それぞれの機能解明にはさらなる解析が必要である。

#### 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 4 件)

1. Kitano A, Shimasaki T, Chikano Y, Nakada M, Hirose M, Higashi T,

Ishigaki Y, Endo Y, Takino T, Sato H, Sai Y, Miyamoto K, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T. Aberrant glycogen synthase kinase 3 $\beta$  is involved in pancreatic cancer cell invasion and resistance to therapy. *PLoS One*. 8: e55289, 2013. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0055289.

2. Tanii H, Higashi T, Demura M, Saijoh K. Repeated Exposure to Cruciferous Allyl Nitrile Protects against Chemically Induced Skin Inflammation in the Mouse. *Food and Nutrition Sciences*. 3: 1037-1042, 2012. 査読有 doi: 10.4236/fns.2012.38137.

3. Tanii H, Higashi T and Saijoh K. Preconditioning with subneurotoxic allyl nitrile: Protection against allyl nitrile neurotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 750-754, 2010. 査読有 doi:10.1016/j.fct.2009.12.010.

4. T. Maki, S. Susuki, F. Kobayashi, M. Kakikawa, Y. Tobo, M. Yamada, T Higashi, A. Matsuki, C. Hong, H. Hasegawa, Y. Iwasaka. Phylogenetic analysis of atmospheric halotolerant bacterial communities at high altitude in an Asian dust (KOSA) arrival region, Suzu City. *Science of the Total Environment*. 408: 4556-4562, 2010. 査読有 doi:10.1016/j.scitotenv.2010.04.002.

[学会発表] (計 15 件)

1. Higashi T, Kambayashi Y, Fujimura M,

Ohkura N, Yoshizaki T, Nakanishi S, Saijoh K, Hayakawa K, Kobayashi F, Michigami Y, Hitomi Y, Asakura H, Yamazaki M, Mitoma J, Horii M and Nakamura H. Health Effect of Kosa Aerosol. International Symposium on Aerosols in East Asia and their Impacts on Plants and Human Health. November 24, 2012. Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan.

2. Kobayashi F, Maki T, Kakikawa M, Yamada M, Matsuki A, Naganuma T, Higashi T, Iwasaka Y. The research of atmosphere bioaerosol over Antarctica. 5th International Symposium on the Environment of the Rim-Japan Sea Regions, February 3, 2012. Kanazawa University, Kanazawa, Japan.
3. A Kitano, T Shimasaki, Y Chikano, M Nakada, T Higashi, Y Ishigaki, Y Endo, Y Sai , K Miyamoto, Y Motoo, K Kawakami, T Minamoto. "Pathological role for deregulated glycogen synthase kinase (GSK) 3b in pancreatic cancer proliferation and invasion" 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, September 24, 2010. Osaka International Convention Center, Osaka, Japan.

[図書] (計 2 件)

1. Higashi T, Saijoh K. Health Effects of Asian Dust (Kosa). In: Environmental Health and Education for Sustainable Development (Nakamura H, Suzuki K,

Hayakawa K, eds). Kanazawa e-Publishing Co. Ltd., Kanazawa, Japan, 45-50, 2012.

2. Saijoh K, Higashi T. Several tips to stay healthy abroad. In: Environmental Health and Education for Sustainable Development (Nakamura H, Suzuki K, Hayakawa K, eds). Kanazawa e-Publishing Co. Ltd., Kanazawa, Japan, 13-16, 2012.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 1 件)

名称：遺伝子多型およびその用途  
発明者：東朋美、西條清史、京哲、井上正樹  
権利者：金沢大学  
種類：特許  
番号：特許第 5167539 号  
取得年月日：2013 年 1 月 11 日  
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 朋美 (HIGASHI TOMOMI)  
金沢大学・医学系・助教  
研究者番号： 20293342

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし