

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790421
 研究課題名（和文） 癌細胞における LTBP-1L 蛋白の機能解明と癌分子マーカーとしての応用
 研究課題名（英文） Analysis of LTBP-1L protein role in carcinoma cell and application as cancer molecular marker
 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）：

癌の分子レベルでの予防をめざして、癌で高発現している TGF- β 1 結合蛋白質 LTBP-1L (Latent TGF- β 1 binding protein-1L) の働きと分子マーカーとしての有用性を検討した。培養細胞株での機能解析と、臨床症例での蛋白発現と臨床データの関連解析の結果、LTBP-1L 蛋白は細胞増殖能の活性化を通じて、癌の発生や進行に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Latent transforming growth factor (TGF)- β binding protein-1 (LTBP-1) play important roles in the secretion and activation of TGF- β . In this study, to clarify the role of LTBP-1L protein in carcinoma cell, we performed in vitro functional analysis and clinical data analysis. Our results indicate that the LTBP-1L protein can contribute to tumor initiation and progression through the induction of cell growth activity. And we indicated the possibility of the LTBP-1L protein as cancer molecular marker.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：環境衛生学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：癌、LTBP-1、TGF- β 1、一塩基多型、分子マーカー

1. 研究開始当初の背景

Transforming growth factor - β 1 (TGF- β 1)

は、細胞増殖、組織の再生、血管新生、免疫制御など多彩な生理活性をもつサイトカイ

ンであり、癌の発生や進行・悪性化においても中心的な役割を担うことが知られている。多くの癌組織では、TGF-β1 蛋白が過剰に発現しており、同蛋白の低分子阻害剤も開発されているが、細胞活動には適度な同蛋白の活性が必要であり、TGF-β1 蛋白活性の適正な調節が最も重要だと考えられている。

代表者らは、TGF-β1 結合蛋白質である LTBP-1 (Latent TGF-β1 binding protein-1) が癌で高発現していることに着目して研究を進めてきた。これまでの研究で、LTBP-1 サブタイプのうち、特に LTBP-1L が癌周囲の TGF-β1 活性調節に重要であると予測し、LTBP-1L 遺伝子プロモーター上に新規の SNP (一塩基多型) を発見した。そして、SNP による塩基配列の違いが、転写活性の変化をもたらし、同蛋白の高発現を誘導する原因の一つであることを明らかにした。さらに、早期発見が難しい卵巣癌症例の生命予後と相関するという知見を報告した (Higashi T. et al J Mol Diagn 8 (3): 342-350, 2006, Higashi T. et al Jap J Cancer Res. 2001)。したがって、同蛋白の発現と新規の SNP が癌の発生や進行に寄与していると予測されたが、これまでに同蛋白と癌の関係について他の研究チームからの報告は全く無いため、本研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、癌における LTBP-1L 蛋白の働きを分子レベルで解析して、TGF-β1 を介した癌の発生や進行にどのように関わるか、あるいは、LTBP-1L 蛋白単独で癌の発生や進行に影響しうるのかを明らかにすることを第一の目的とした。そして機能を明らかにするだけでなく、TGF-β1 を標的とした癌の治療や予防の研究の新しいアプローチとして、臨床的に LTBP-1L 蛋白が癌予防に向けた分子マーカーや、癌治療の標的分子として、有用であるかを検討することも目的とした。種々の癌培養細胞株で同蛋白の発現実験により機能を解析し、生命予後をはじめとした臨床データとの関連を詳細に検索し、新規 SNP との関連解析に取り組んだ。

3. 研究の方法

卵巣癌細胞株 JHOM-1 において、stealth RNAi (invitrogen) を用いた RNA 干渉により LTBP-1 の発現を抑制した。また、LTBP-1L と、亜型の LTBP-1S cDNA を IRES vector (Takara) に組み込み JHOM-1 に導入し、安定発現株を得た。これらの株の性質について形態観察および WST-1 assay (Roche) による細胞の増殖能測定を行った。同時に金沢大学病院の大腸癌、胃癌、卵巣癌、子宮体癌、肺癌、

それぞれの症例について、LTBP-1L 蛋白の発現を免疫組織化学染色により調べ、臨床病期や肉眼型、転移・再発の有無との関連を検討した。臓器による違いも比較した。また、同症例のゲノム DNA を抽出して、direct sequencing 法を用いて LTBP-1L 遺伝子の新規 SNP の遺伝子型解析を行った。そして、遺伝子型と生命予後をはじめとした他の臨床データとの関連についての解析に取り組んだ

4. 研究成果

その結果、癌細胞株を用いた実験では、LTBP-1 発現抑制によって細胞増殖と生存数が減少することがわかった。したがって同蛋白は、細胞増殖能の活性化を通じて、癌の発生や進行に寄与することが示唆された。

多種の臓器癌症例の解析では、癌種によって、発現状態の違いが見られ、以前に報告した卵巣癌のようにほとんどの症例で LTBP-1 蛋白が高発現している癌種と、反対にほとんどの症例で発現が低い癌種に分けられることがわかった。また、高発現している癌種の中には、発現の程度と組織型あるいは遠隔転移に相関傾向が見られるものがあり、LTBP-1 蛋白が癌進行において重要な役割をしていることが示唆された。

遺伝子型解析でも、癌種によって遺伝子型頻度の違いが見られることがわかり、癌種によっては LTBP-1 蛋白が発癌過程に影響している可能性も示唆された。これまでのところ、SNP 遺伝子型と同蛋白の発現には相関する傾向が見られた。一方、以前に卵巣癌で報告した SNP と生命予後の相関については、どの癌種でも有意な相関は見られなかった。これは、以前の解析では症例数が少なかったために出た違いと考えられた。

以上これらの結果は、癌組織で発現している LTBP-1L が、癌の発生や進行を予防するための標的分子として有用である可能性と、その指標として SNP が利用できる可能性とを示唆しており、今後の研究へとつながる意義あるものであった。

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 8 件)

- 1) 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 (in press) 査読有り

2) Tanii H, Higashi T, Saijoh K: Preconditioning with subneurotoxic allyl nitrile: protection against allyl nitrile neurotoxicity. Food and Chemical Toxicology. 48(2):750-4, 2010. 査読有り

3) Nagashima M, Mawatari K, Tanaka M, Higashi T, Saito H, Muramoto K, Matsukawa T, Koriyama Y, Sugitani K, Kato S: Purpurin is a key molecule for cell differentiation during the early development of zebrafish retina. Brain Research. 1302:54-63. 2009 査読有り

4) Kakikawa M, Kobayashi F, Maki T, Yamada M, Higashi T, Chen B, Shi G, Hong C, Tobo Y, Iwasaka Y: Dustborne Microorganisms in the atmosphere over Asian dust source region, Dunhuang. Air Quality Atmosphere and Health 1: 195-202. 2008 査読有り

5) Maki T, Susuki S, Kobayashi F, Kakikawa M, Yamada M, Higashi T, Chen B, Tobo Y, Hasegawa H, Ueda K, Iwasaka Y: Ecophysiological analysis of halobacteria in bioaerosol. Journal of Ecotechnology Research 13 (4): 309-313, 2008. 査読有り

6) Maki T, Takashi Suzuki T, Kido K, Nakahara A, Higashi T, Hasegawa H, Ueda K, Saijoh K: Effect of iron stress on gene expression in harmful microalga *Prymnesium parvum*. Journal of Ecotechnology Research 14 (1):

13-16, 2008. 査読有り

7) Tanii H, Higashi H, Nishimura F, Higuchi Y, Saijoh K: Effects of cruciferous allyl nitrile on phase 2 antioxidant and detoxification enzymes. Medical Science Monitor 14 (10): BR189-192, 2008. 査読有り

8) Maki T, Susuki S, Kobayashi F, Kakikawa M, Yamada M, Higashi T, Chen B, Shi G, Hong C, Tobo Y, Hasegawa H, Ueda K, Iwasaka Y: Phylogenetic diversity and vertical distribution of a halobacterial community in the atmosphere of an Asian dust (KOSA) source region, Dunhuang City. Air Quality Atmosphere and Health 1: 81-89, 2008. 査読有り

[学会発表] (計5件)

1) 北野綾子, 島崎猛夫, 東 朋美, 近野祐里, 石垣靖人, 元雄良治, 宮本謙一, 川上和之, 源 利成

GSK3 β による膵がん細胞の増殖と浸潤の制御 第20回 日本消化器癌発生学会総会 2009年11月27日(金) 広島オリエンタルホテル (広島県)

2) Tanii H., Higashi T. and Saijoh K. Preconditioning with cruciferous allyl nitrile protects against neurotoxicity of its own. 22nd Biennial Joint Meeting of the Int. Soc. for Neurochemistry and the Asian Pacific Soc. for Neurochemistry; Busan, BEXCO Convention Hall, Korea, August 23-28, 2009

3) Shi G, Kobayashi F, Toda S, Yamada M, Kakikawa M, Maki T, Higashi T, Hong C, Tobo Y, Chen B, Naganuma T, Iwasaka Y: Direct sampling and identification of bioaerosols in the convective mixed layer over KOSA region, Dunhuang, using the separate culture. Proc of 5th International Workshop on Sand/ Duststorms and Associate Dustfall; Urumqi, Xinjiang, China, May 21-24, 2008

4) Maki T, Susuki S, Kobayashi F, Kakikawa M, Yamada M, Higashi T, Hong C, Tobo Y, Hasegawa H, Ueda K, Iwasaka Y: Halotolerant bacterial community survived in atmosphere of Asian dust (KOSA) source region, Dunhuang City. Proc of 5th International Workshop on Sand/ Duststorms and Associate Dustfall; Urumqi, Xinjiang, China, May 21-24, 2008

5) Kakikawa M, Kobayashi F, Maki T, Yamada M, Higashi T, Chen B, Shi G, Hong C, Tobo Y, Iwasaka Y: Dustborne microorganisms in KOSA source region, Dunhuang. Proc of 5th International Workshop on Sand/ Duststorms and Associate Dustfall; Urumqi, Xinjiang, China, May 21-24, 2008

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