

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：34535

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08376

研究課題名(和文) 全身諸臓器の正常・腫瘍組織における細胞周期・細胞死関連蛋白の網羅的発現解析

研究課題名(英文) Histochemical study of the expression of cell cycle and cell death related-proteins in human neoplastic and non-neoplastic tissue

研究代表者

新谷 路子(田中路子)(Shintani, Michiko)

神戸常盤大学・保健科学部・准教授

研究者番号：40207147

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)：ヒト肺癌および胃癌組織を用いて、組織型の違いによる細胞死(アポトーシス、オートファジー、ネクロトーシス)の誘導に関して免疫組織化学的解析を行った。

肺癌では、組織型(腺癌・扁平上皮癌・小細胞癌)の違いにより細胞死誘導に差が生じている可能性が示唆された。胃癌ではアポトーシスによる細胞死が主に誘導されており、分化型胃癌ではアポトーシスとオートファジーが協調的に制御されている可能性が認められた。

研究成果の概要(英文)：We performed immunohistochemical staining mainly with antibodies against cleaved caspase-3 (CC3), mixed lineage kinase domain-like (MLKL), and microtubule-associated protein light chain 3B (LC3B), which are specific markers of apoptosis, necroptosis, and autophagy, respectively. Our results suggested that there were differences in the induction of apoptosis, autophagy and necroptosis due to the difference in tissue type (adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, small cell carcinoma) in lung cancer. In differentiated type gastric cancer, CC3 expression was correlated with LC3B expression ($r = 0.496$, $P < 0.05$). Apoptosis and autophagy could be cooperatively controlled in differentiated gastric cancer. Further studies on different cases will be necessary to clarify the cell death pathway and the interactions between cell death factors.

研究分野：免疫組織化学

キーワード：アポトーシス オートファジー ネクロトーシス 肺癌 胃癌 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

細胞周期は、細胞周期エンジンとチェックポイントにより制御されている。細胞周期エンジンは、アクセルとして働く cyclin / cyclin-dependent kinase (CDK) 複合体、ブレーキとしてはたらく CDK inhibitor (CKI) で構成され、DNA 損傷・複製チェックポイント、紡錘体形成チェックポイントが細胞周期制御機構として働いている。細胞が障害されると細胞周期は停止し、細胞修復へ(その障害が高度な場合は、細胞死へ)と誘導される。すなわち、生体は細胞周期の正確な制御により恒常性が保たれており、細胞周期の異常は生体を病的な状態へと導く。

細胞癌化の一因として、細胞周期や細胞死の異常による細胞増殖の制御不能が考えられている。細胞周期・細胞死研究として、胃癌、大腸癌や悪性リンパ腫等における細胞周期関連蛋白発現と腫瘍の悪性度や予後との関連を比較検討した報告がなされている。また、抗癌剤や放射線といった癌治療は細胞死を誘導するが、治療の種類によって誘導される細胞死の経路が異なることが報告されている。

我々の研究室では、胃癌および大腸癌を対象として、アポトーシス実行酵素である活性型 caspase-3、-8 および -9、caspase 阻害蛋白 survivin、オートファジー関連蛋白 LC3 の発現に関する免疫組織化学的解析結果を報告している。すなわち、活性型 caspase-9 の発現は胃癌で有意に高い反面、大腸癌では LC3 と survivin の発現が亢進していた。大腸癌では、オートファジーが caspase 依存性アポトーシスを代償するために機能している可能性や survivin によるアポトーシス抑制がより強く働いている点が推測された。一方、殺細胞性抗癌剤には、細胞周期の S 期に作用する代謝拮抗剤(5-FU、ゲムシタピンなど)やトポイソメラーゼ阻害剤(イリノテカン、エトポシドなど)、M 期に作用する微小管重合阻害剤(パクリタキセル、ビンクリスチンなど)等があり、癌化学療法と細胞周期は密接な関係を有している。また、抗癌剤とオートファジー調節剤の併用療法が検討されている。さらに、放射線は G2/M 期の細胞に作用することがよく知られている。以上を総合すると、本研究から得られる結果が、細胞周期・細胞死のパターンに基づく癌治療の個別化や予後予測に向けた臨床研究に対して有用な基礎データを提供すると期待される。

2. 研究の目的

細胞周期や細胞死に関する研究は、細胞増殖や癌化だけではなく、癌治療の分野にまで展開している。しかしながら、これまでの細胞周期・細胞死研究は個々の臓器を対象としたものばかりであり、正常および腫瘍組織における細胞周期・細胞死のパターンに関して、全身の諸臓器を網羅的に同時解析した研究

は見当たらない。

申請時における当初の研究目的は、全身諸臓器の正常および腫瘍組織における細胞周期・細胞死関連蛋白の発現を網羅的に解析し、各組織における発現パターンの違いを明らかにすることにより、細胞周期・細胞死のパターンに基づく癌治療の個別化や予後予測に向けた基礎データを得ることであった。

本研究では、肺癌および胃癌を対象とし、組織型の差異による細胞増殖および細胞死経路の活性化に関して解析を行った。

肺癌は組織型や遺伝子変異の有無が治療方針に大きく関わり、近年分子標的治療を含めた個別化治療が発展している。肺癌の診断においては、小細胞癌と非小細胞癌、扁平上皮癌と非扁平上皮癌の鑑別等が重要となっている。肺癌における細胞周期および細胞死関連タンパクの発現を明らかにし、組織型(腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌)による差異を解析することを目的とした。

また、胃癌は我国において死亡率の高い癌であり、進行・再発胃癌の効果的な治療法の開発が求められている。本研究では、胃癌における細胞死関連タンパクの発現および各蛋白の相関を明らかにし、組織型(分化型、未分化型)による細胞死(アポトーシス、ネクロプトーシス、オートファジー)活性の差異の解析を目的とした。各マーカーの発現率と臨床病理学的因子との相関性も検討した。

3. 研究の方法

(1) 肺癌における細胞周期および細胞死関連蛋白の発現に関する検討

肺癌 50 例 腺癌 20 例、扁平上皮癌 19 例、小細胞癌 11 例； 男性 31 例、女性 19 例、平均年齢 70.9 才) のホルマリン固定パラフィン切片を対象とした。

各一次抗体(表 1)の至適染色条件を選定し、免疫組織化学染色を行った。

表 1. 使用抗体

cyclin D	G1 期通過
p16、p21、p53	G1 期停止
cyclin E	S 期開始
cyclin A	S 期通過
cyclin B	M 期
Ki67	全細胞周期
活性型 caspase-8 (CC8)	レセプター経路アポトーシス
活性型 caspase-9 (CC9) p53	ミトコンドリア経路アポトーシス
活性型 caspase-3 (CC3)	アポトーシス(共通)
LC3B	オートファジー
MLKL	ネクロプトーシス

腫瘍組織における陽性細胞を計測し、陽性率で表した。

得られたデータを統計学的に解析した。

(2) 胃癌における種々の細胞死関連蛋白の発現に関する検討

胃癌 40 例 (分化型 20 例、未分化型 20 例 ; 男性 29 例、女性 11 例、平均年齢 74.4 才) のホルマリン固定パラフィン切片を対象とした。

CC3、MLKL、LC3B 抗体による免疫組織化学染色を行った。

腫瘍組織における陽性細胞を計測し、陽性率で表した。

得られたデータを統計学的に解析した。

4. 研究成果

(1) 肺癌における細胞周期および細胞死関連タンパクの発現

使用抗体の至適染色条件

表 2. 各抗体の染色条件

抗体名	製造元	希釈倍率	賦活液
Ki-67	DAKO	1:100	CB, pH6.0
p53	DAKO	1:400	CB, pH7.0
p21	DAKO	1:50	CB, pH7.0
CC3	CST	1:200	EDTA, pH8.0
cyclin A	Abcam	1:2000	CB, pH7.0
cyclin B	Abcam	1:200	CB, pH6.0
cyclin D	Abcam	1:100	T-E, pH9.0
PLK1	Leica	1:100	CB, pH7.0
MLKL	Abcam	1:250	EDTA, pH8.0
LC3B	CST	1:10000	CB, pH6.0

CST, cell signaling technology ;

CB, クエン酸緩衝液 ; T-E, トリス EDTA 緩衝液

各マーカーの陽性率

Ki-67、cyclin A、cyclin B、cyclin D、CC3、PLK-1 の陽性率は、腺癌 (15.9%、4.3%、10.0%、50.5%、0.6%、5.5%)、扁平上皮癌 (44.5%、23.2%、22.7%、41.1%、5.6%、25.5%)、小細胞癌 (46.4%、25.9%、28.6%、0.1%、6.4%、19.1%) で、組織型間で陽性率に有意差が認められた。すなわち、Ki-67、cyclin A、cyclin B、CC3、PLK-1 の陽性率は腺癌において、cyclin D の陽性率は小細胞癌において有意に低値であった。肺癌では組織型ごとに細胞周期の状態が異なるため、細胞増殖および細胞死への誘導に差が生じている可能性が示唆された。

細胞死マーカーの陽性率の比較

LC3B の陽性率は、腺癌 2.3%、扁平上皮癌 21.6%、小細胞癌 44.5% で、組織型間で有意差が認められた $P < 0.001$ 。すなわち、LC3B の陽性率は腺癌において低く、小細胞癌で高値を示した。MLKL 陽性細胞はきわめて少なく、腺癌および小細胞癌ではほとんど見られなかった。しかし、扁平上皮癌では、19 症例中 12 例において陽性細胞の小集塊が認められた。

肺癌を対象に、アポトーシス、オートファジー、ネクロプトーシス細胞死の誘導に関して免疫組織化学的に解析したところ、組織型 (腺癌・扁平上皮癌・小細胞癌) の違いによ

り細胞死誘導に差が生じている可能性が示唆された。

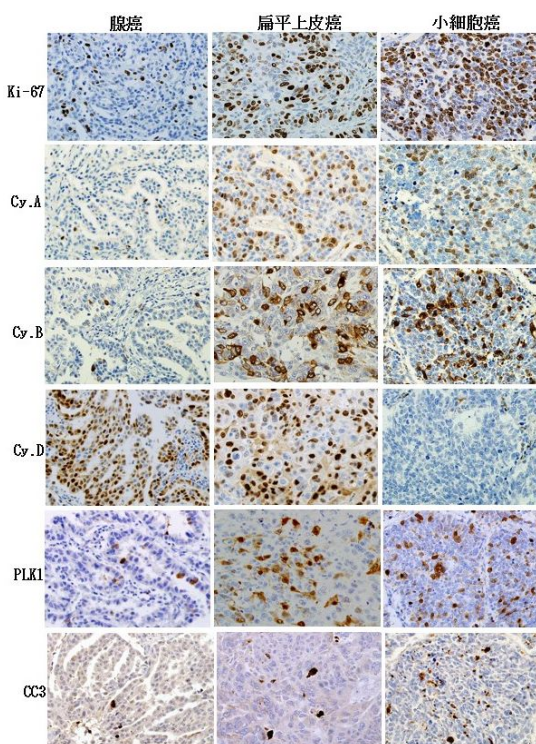


図 1. 肺癌の各組織型における代表的染色像

(2) 胃癌における細胞死関連蛋白の発現

MLKL および LC3B 陽性細胞は少数であった。CC3 陽性細胞は、全腫瘍細胞中 0 ~ 20% に認められた。各マーカーの相関を分化度別に調べたところ、分化型において CC3 と LC3B に正の相関がみられた ($r = 0.496$, $P = 0.03$)、それ以外に相関は見出されなかった。

表 3. 各マーカーの相関関係

	CC3/LC3B	CC3/MLKL	LC3B/MLKL
well differentiated type	0.496 P=0.031	0.057 P=0.805	0.036 P=0.876
undifferentiated type	0.201 P=0.380	0.060 P=0.794	0.124 P=0.589

各マーカーの発現と、臨床病理学的因子 (年齢、性別、壁深達度、リンパ節転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲、pStage) との間には、有意な関連性は認められなかった。

胃癌を対象に、アポトーシス、ネクロプトーシス、オートファジーの誘導に関して免疫組織化学的に解析したところ、分化度の違いにより細胞死誘導に差が生じている可能性が示唆された。すなわち、胃癌ではアポトーシスによる細胞死が主に誘導されており、分化型胃癌ではアポトーシスとオートファジーが協調的に制御されている可能性が認められた。

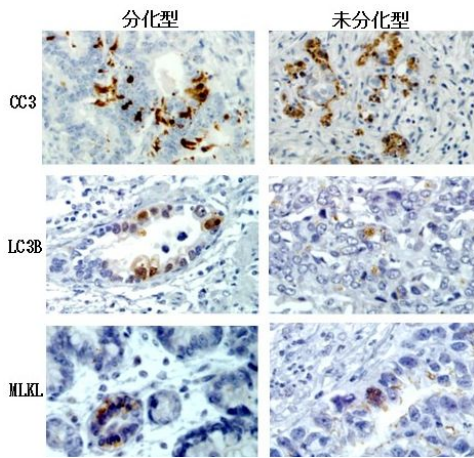


図 2. 胃癌の各組織型における代表的染色像

アポトーシスおよびオートファジー経路には共通因子 (p53, Beclin 1, 等) が存在し、複雑なクロストークが徐々に明らかになっている。両細胞死の間には、協調的または拮抗的という相反する関係が報告されている。分化型胃癌において、CC3 と LC3B の発現に相関が認められたことは、アポトーシスとオートファジーが同調して活性化されていると考えられるが、これによりアポトーシスとオートファジー細胞死がともに誘導されているかどうかは不明である (図 2 に、考えられているアポトーシスとオートファジーの相互作用を示す)。しかし、今回の結果から胃

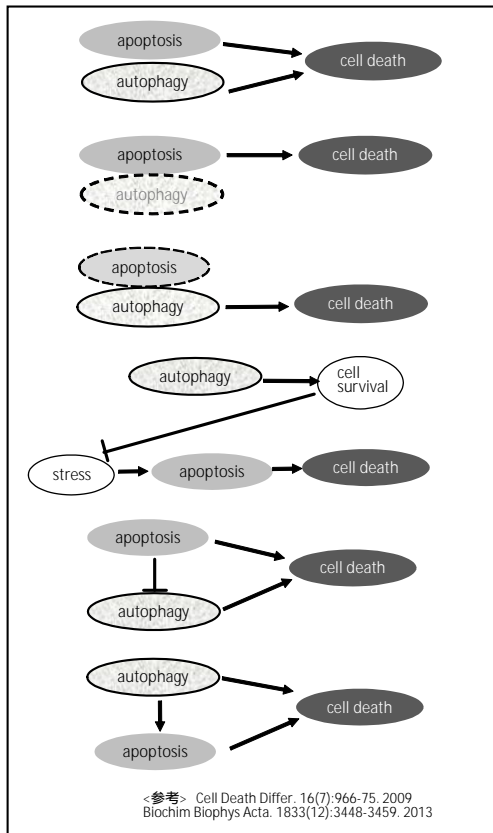


図 3. アポトーシスとオートファジーにおける相互作用

癌では分化度の違いによりアポトーシスとオートファジーの相互作用に差異がある可能性が示唆された。

細胞死を効率よく起こすことは、癌治療の戦略上重要であり、腫瘍の組織型・分化度による細胞死経路の解明は、発癌の解明および放射線・抗癌剤治療の選択において有用な指針となると考えられる。今後さらに細胞死関連蛋白の発現を解析し、相互作用を明らかにしていく必要がある。

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6件)

Osman AK, Shintani M. Autophagy in normal tissues of camel (*Camelus dromedaries*) with focus on immunoexpression of LC3 and LC3B. *Biotechnic & Histochemistry* (査読有) in press

Osman AK, Caceci T, Shintani M. Immunohistochemical expression of apoptosis-related biomarkers in normal tissues of camel (*Camelus dromedarius*): A survey in a desert-dwelling mammalian model. *Acta Histochem.* (査読有) 2018;120(4):385-394. DOI: 10.1016/j.acthis.2018.04.002

Anti-hyperglycemic Effect of Long-Term Bis(hinokitiolato)zinc Complex ([Zn(hkt)₂]) Ingestion on Insulin Resistance and Pancreatic Islet Cells Protection in Type 2 Diabetic KK-Ay Mice. Naito Y, Yoshikawa Y, Shintani M, Kamoshida S, Kajiwara N, Yasui H. *Biol Pharm Bull.* (査読有) 2017;40(3):318-326. DOI: 10.1248/bpb.b16-00797

Expression of chromosomal regional maintenance protein-1 may be associated with subcellular survivin expression in human gastric and colorectal carcinoma. Shintani M, Tashiro A, Sangawa A, Yamao N, Kamoshida S. *Oncol Lett.* (査読有) 2016;12(6):4630-4634. DOI: 10.3892/ol.2016.5220

Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Klionsky DJ, Shintani M, *et al.* *Autophagy.* 2016;12(1):1-222. DOI: 10.1080/15548627.2015.1100356

Organic cation transporter 2 for predicting cisplatin-based neoadjuvant

chemotherapy response in gastric cancer. Naka A, Takeda R, Shintani M, Ogane N, Kameda Y, Aoyama T, Yoshikawa T, Kamoshida S. *Am J Cancer Res.* (査読有) 2015;5(7):2285-93. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4548340/>

〔学会発表〕(計8件)

胃癌におけるアポトーシスおよび非アポトーシス細胞死に関する免疫組織化学的検討

新谷 路子, 林 友理恵, 島方 崇明, 河村 淳平, 桑尾 定仁, 鴨志田 伸吾
第107回日本病理学会総会 2018年6月

大腸癌におけるアポトーシスとオートファジー: KRAS 変異 p53 発現との相関性
坂梨 史典, 新谷 路子, 恒吉 正澄, 鴨志田 伸吾
第107回日本病理学会総会 2018年6月

マグネシウム, 銅, 亜鉛摂取による骨粗鬆症モデルマウスの骨代謝や骨強度への影響.
新垣 あやね, 新谷 路子, 鴨志田 伸吾, 安井 裕之, 吉川 豊.
日本薬学会第138年会、2018年3月

肺癌における細胞増殖・細胞死関連タンパクの発現に関する免疫組織化学的検討(第2報). 新谷 路子, 伊藤 智雄, 鴨志田 伸吾. 第58回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2017年9月

The impact of zinc-hinokitiol complex ([Zn(hkt)₂]) on the expression and secretion of insulin -Approach from the expression of pancreatic transcription factor, Pdx-1-.
Naito Y, Yoshikawa Y, Shintani M, Kamoshida S, Kajiwara N, Yasui H
第26回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 2016年6月

OCT2 / TS 二重免疫染色による大腸癌 FOLFOX 療法の効果予測
吉村 麻衣子, 矢野川 恵, 新谷 路子, 松岡 宏, 前田 耕太郎, 鴨志田 伸吾
第105回日本病理学会総会 2016年5月

大腸癌における ENT1、OCT2 及び細胞周期関連マーカーの発現: 免疫組織化学的解析
矢野川 恵, 吉村 麻衣子, 新谷 路子, 坂梨 史典, 恒吉 正澄, 鴨志田 伸吾
第105回日本病理学会総会 2016年5月

肺癌における細胞周期および細胞死関連タンパクの発現に関する免疫組織化学的検討
新谷 路子, 矢野川 恵, 吉村 麻衣子,

柳田 絵美衣, 坂梨 史典, 伊藤 智雄, 鴨志田 伸吾 第105回日本病理学会総会 2016年5月

〔図書〕(計1件)

Shintani M. et al. Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis.(Chapter 9. Autophagy as a Therapeutic Target in Gastrointestinal Cancer pp.167-178) INTECH 2015年12月

6. 研究組織

(1)研究代表者

新谷路子(田中路子 X SHINTANI Michiko) (TANAKA Michiko)
神戸常盤大学・保健科学部医療検査学科・准教授
研究者番号: 40207147

(2)研究分担者

鴨志田伸吾 (KAMOSHIDA, Shingo)
神戸大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号: 70351020

(3)連携研究者

伊藤智雄 (ITOH, Tomoo)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 20301880