

東海大学大学院平成 25 年度博士論文

細胞極性制御分子と
肺腺癌進展に関する検討

指導 岩崎 正之 教授

東海大学大学院医学研究科
先端医科学専攻

今村 奈緒子

＜研究の背景＞

肺癌は悪性腫瘍による死亡者数第一位であり、半数以上が診断時すでに stageⅢ以上の進行癌である。また、早期例で手術や術後補助化学放射線療法を施行した症例であっても、多くは再発・転移を来す予後不良の疾患である。本疾患の発生病序および進展の分子機構の解明は、分子診断マーカーの開発、治療標的分子の同定に寄与するとともに、推定される予後に基づく適切な治療の選択や抗癌剤感受性の評価においても重要な役割を果たし、個別化医療に向けてその臨床的意義は大きい。

Atypical Protein Kinase C (aPKC) は、Protein Kinase C (PKC) 分子種に属し、カルシウムや強力な PKC 活性化剤である PMA により活性化されない特殊な PKC 分子種である。細胞の増殖、生存、アポトーシス、細胞極性の制御など様々な生命現象に関与することが報告されている[1, 14]。上皮細胞は、蛋白質やリン脂質を秩序だって配置させ極性化している。aPKC、Par3、Par6 からなる三者複合体は、上皮細胞の tight junction に局在し、上皮細胞の細胞間接着構造の形成に働くと共に、上皮細胞の極性形成に必須の役割を果たしている[1]。aPKC λ/ι や Lgl2 の過剰発現は、その局在の異常を誘導し細胞間接着構造や上皮組織の形態形成の異常を引き起こす[7, 8, 15]。aPKC λ/ι の過剰な発現は、ヒトの癌においても確認されており、aPKC λ/ι の機能異常（局在・活性の異常）を介した細胞極性の破綻が癌化や癌の進展を惹起する可能性が指摘されている[2, 16-18]。また、Lgl は、正常卵巣上皮細胞においては basolateral に局在しているが、卵巣癌では、cytoplasm へとその局在が変化する。この局在変化は、aPKC 陽性の癌細胞で顕著であることから、aPKC の過剰な発現

が Lgl の局在を basolateral から cytoplasm へと変化させたと考えられている[17, 19]。肝細胞癌においても aPKC λ/ι の過剰発現が確認され、細胞間接着構造の構成分子である E-cadherin の局在が異常となり細胞間接着構造が失われ、浸潤・転移に関わる可能性が示唆されている[20]。以上のことから、aPKC と Lgl の発現量と局在性が種々の固形腫瘍の浸潤・転移に関わっていることが判ってきているが、肺腺癌の進展に関する両分子の役割の詳細は不明である。そこで本研究では、ヒト肺腺癌と診断された 107 症例の病理組織を対象に aPKC 分子種の一つである aPKC λ/ι と Lgl2 の発現・局在と臨床病理学的特徴との関連性について検討を行った。

<総括>

上皮細胞は、隣接する細胞間の接着部位を境として頂端部 (apical domain) と基底部 (basal domain) に分かれ極性化している[1, 2]。Atypical protein kinase C (aPKC)、Partitioning defective-3 (Par3)、Partitioning defective-6 (Par6) は、三者複合体を構成し、上皮細胞間の接着構造を形成・維持することで、細胞の極性化を制御している[1]。近年の研究から aPKC が種々の癌で過剰に発現していることが確認されており、本分子が癌の進展に関与することが示唆されている[2, 3]。また、Par6 も、同様に乳癌や一部の肺癌において過剰発現が確認されている[4, 5]。Par3 は発現が低下すると、DMBA/TPA によって誘導される皮膚乳頭腫の形成が抑制されることが報告された[6]。一方、aPKC に結合能を有する Lgl2 が、頂端膜 (apical membrane) の形成制御に働くことが判ってきている[7, 8]。また、膵癌の前癌病変である膵上皮内腫瘍性病変(PanIN)と膵腺癌においては、Lgl2 の局

在変化が報告されている。異型が軽度な PanIN-1 と PanIN-2 では basolateral に発現していたのに対し、より異型が高度な PanIN-3 と 膵腺癌では発現が消失するかまたは細胞質(cytoplasm)に局在が変化することが示された[9]。さらに、胃異型上皮や胃癌においても、同様の局在変化が報告されている[10]。これら一連の報告は、極性制御因子である aPKC、Par3、Par6 および Lgl の機能変化が細胞極性の異常を引き起こし、癌の進展を促進している可能性を示唆している。

本研究では、ヒト肺腺癌と診断された 107 症例の病理組織を対象に aPKC 分子種の一つである aPKC λ/ι と Lgl2 の発現・局在と臨床病理学的特徴との関連性について検討を行った。その結果、aPKC λ/ι の発現が高い患者群では、発現が低い患者群と比較して、術後全生存率が有意に低く、再発が有意に多いことが明らかとなった。さらに、aPKC λ/ι の細胞内局在を詳細に検討したところ、apical membrane や細胞間・細胞基質間に面した細胞膜 (cell-cell contact) に発現が確認された患者群では、リンパ管浸潤、リンパ節転移、遠隔転移を有意に多く認めた。また、Lgl2 が apical membrane に発現している患者群においては、リンパ管浸潤、リンパ節転移、遠隔転移、再発が有意に多いことが確認された。次に、肺腺癌における両者の発現を免疫二重染色により検討した。その結果、aPKC λ/ι 陽性細胞では、Lgl2 も共発現していることが判明した。さらに、抗ヒト Par6 β 抗体を用いて免疫沈降実験を行い検討した結果、aPKC λ/ι は、Lgl2 および Par6 β と複合体を形成していることが明らかとなった。また、細胞間接着構造の構成分子である E-cadherin[11-13]と aPKC λ/ι との二重染色を行い検討したところ、一部の aPKC λ/ι 陽性細胞では、E-cadherin の発現低下が確認された。特に E-cadherin の発現低下は、

肺腺癌の浸潤部で顕著であった。

以上の結果から、aPKC λ/ι の過剰な発現は、肺腺癌の進展に関わることが判明した。また、aPKC λ/ι の過剰発現に伴った apical membrane や cell-cell contact への局在化は、肺腺癌のリンパ管浸潤、リンパ節転移、遠隔転移のリスクを上昇させる可能性が強く示唆された。今後 aPKC λ/ι と Lgl2 の発現・局在の変化から肺腺癌の浸潤・転移のリスクを推測することが可能となると期待される。

<考察>

我々はヒト肺腺癌と診断された 107 症例を対象に極性制御分子である aPKC λ/ι の発現や細胞内局在と癌細胞の浸潤・転移との関係について検討を行った。その結果、aPKC λ/ι の発現が高い患者群は、発現の低い患者群と比較し生存率が低く、aPKC λ/ι の発現が肺腺癌の予後予測因子となる可能性が示唆された。aPKC λ/ι は、極性化した上皮細胞においては、apical membrane や tight junction に局在する [8, 15, 23]。aPKC λ/ι を上皮細胞に過剰発現させると、apical membrane や cell-cell contact へ局在を示し、上皮細胞の極性の異常が生じることが報告されている [7, 8]。本研究では、apical membrane に局在が確認された症例において、リンパ管浸潤、リンパ節転移、遠隔転移が有意に多いことが明らかとなった (表.2、表.3)。また、cell-cell contact が陽性の症例では、リンパ節転移が有意に多かった。さらに我々は、肺腺癌の腫瘍組織において、Par6 β と aPKC λ/ι の結合に関して生化学的に検討を行い、aPKC λ/ι -Par6 β 複合体を形成していることが明らかとした (図.4)。また、肺腺癌において Par6 β が apical membrane や cell-cell contact に陽性の症例では、浸潤・転移が確認されている (表.7,

表.8)。低分子量 G タンパク質である Cdc42 や Rac は、Par6 と結合することにより aPKC の活性化や細胞膜へのリクルートに働くと考えられている[24-27]。また、活性型 aPKC 変異体を細胞に発現させると形質膜に局在することが報告されている[28]。興味深い事に、卵巣癌では aPKC の形質膜への局在が確認されている[17, 18]。さらに、aPKC の活性化に関わる aPKC ζ/λ Thr410/403 のリン酸化がヒト肝細胞癌で上昇していることが報告されている。これらを総合的に考えあわせると、aPKC の形質膜への局在化が、aPKC の過剰な活性化を引き起こし癌細胞の増殖や浸潤・転移に関与している可能性が考えられる。

Lgl2 は、aPKC 結合タンパク質として同定された。Lgl2 の発現低下や形質膜から cytoplasm への局在変化は、胃異型上皮や胃癌において報告されている[10]。また、膵上皮内腫瘍性病変や膵腺癌においても同様に確認されている[9]。本研究では、正常肺組織で Lgl2 の染色を確認出来なかったが、腫瘍組織において染色が確認された(図.1)。apical membrane や cell-cell contact に Lgl2 の局在が確認された症例では、リンパ管浸潤、リンパ節転移、遠隔転移が有意に多いことが明らかとなった。上皮細胞に Lgl2 を過剰発現させると aPKC の apical membrane の局在が cell-cell contact および cytoplasm へと変化し、細胞極性の異常が誘導される[7, 8, 15]。さらに、本研究では肺腺癌において Lgl2-aPKC-Par6 β 複合体を形成していることが判った(図.4)。また、Lgl2 が発現している腫瘍細胞では、aPKC λ/ι が cytoplasm に局在している像が観察された(図.3、矢印)。これらを考え合わせると Lgl2 の過剰発現により aPKC λ/ι の局在が変化し肺腺癌の浸潤・転移を促進した可能性が考えられる。

E-cadherin は細胞間接着構造の形成に働き、その発現の減少が癌の進展に関与し、予後不良因子となる可能性が報告されている[11-13]。我々は、aPKC λ/ι と E-cadherin の免疫二重染色を行い、肺腺癌浸潤部において aPKC λ/ι が過剰に発現している細胞では、E-cadherin の細胞間膜への局在が消失していることを確認した(図.3、白矢頭)。これは、aPKC λ/ι の発現が高い肝細胞癌で E-cadherin の発現が低下しているという既存の報告と矛盾しない[20]。aPKC、Par3、Par6、Lgl の形質膜への局在化は、細胞移動の制御に働くことが報告されている[29-32]。本研究では、aPKC λ/ι が apical membrane または cell-cell contact などの形質膜に局在し、その局在性が癌細胞の浸潤・転移に関与することが示唆された。aPKC λ/ι や Lgl2 の発現の増加に伴う形質膜への局在化によって、癌の浸潤・転移が惹起された可能性が考えられた。

本研究により、極性制御分子である aPKC λ/ι と Lgl2 の異常な発現が肺腺癌の浸潤・転移に関与することが新たに明らかとなった。今後、癌の転移モデル動物を用いて aPKC 阻害剤（臨床研究にて使用されている[33, 34]）の効果や、aPKC λ/ι ノックアウトマウスを用いて、浸潤・転移が抑制されるかを検討する必要がある。喫煙は、癌の発生や進展を促進されている。aPKC は、喫煙あるいはニコチン処理によって活性化されることが報告されており[35, 36]、今後、喫煙がどのように aPKC や Lgl2 に影響し、癌の進展を起こすか検討する予定である。

<結語>

本研究から、aPKC λ/ι の過剰な発現は、肺腺癌の進展と相関する

ことが明らかとなった[37]。また、aPKC λ/ι の過剰発現に伴った apical membrane や cell-cell contact への局在化は、肺腺癌のリンパ管浸潤、リンパ節転移、遠隔転移のリスクを上昇させる可能性が示唆された[37]。今後 aPKC λ/ι と Lgl2 の発現・局在の変化から浸潤・転移のリスクを推測することが可能となると期待される。