

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10259

研究課題名(和文) 肺切除後の代償性肺成長が癌進展に及ぼす影響とその機序の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of enhanced tumor growth during compensatory lung growth after major lung resection

研究代表者

上田 和弘 (UEDA, Kazuhiro)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90420520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにおいて肺切除後の残存肺への物理的伸展刺激が、肺成長と腫瘍進展へどのような効果をもたらすか検討を行った。伸展刺激を抑制することで、代償性の肺成長は抑制された。肺切除後の成長が惹起された残存肺ではMCP-1の放出が上昇した。伸展刺激を抑制することでMCP-1の放出は減少した。Lewis肺癌細胞を用いた肺転移モデルでは、肺成長が惹起された残存肺において有意に多数の転移巣が形成された。しかし、残存肺への伸展刺激を抑制することで転移巣の形成も抑制された。伸展刺激を受けた肺でマクロファージの集簇を認め、MCP-1の放出との関連を認めた。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of mechanical strain on the activation of lung growth and tumor progression in mice. The neutralization of the strain prevented active lung growth. According to an angiogenesis array, stronger monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression was found in the strain-induced growing lung. The neutralization of the strain attenuated the release of MCP-1 from the lung cells. The intravenous injection of Lewis lung cancer cells resulted in the enhanced development of metastatic foci in the strain-induced growing lung, but the enhanced development was canceled by the neutralization of the strain. An immunohistochemical analysis revealed the prominent accumulation of tumor-associated macrophages in tumors arising in the strain-induced growing lung, and that there was a relationship between the accumulation and the MCP-1 expression status.

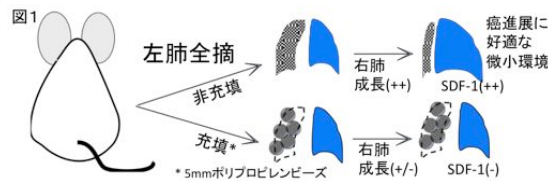
研究分野：胸部外科学

キーワード：肺切除 代償性肺成長 癌進展

### 1. 研究開始当初の背景

肺原発の悪性腫瘍は癌死の主因である。加えて、固形癌による転移性腫瘍は主として肺に発生し肺腫瘍が生命予後の規定因子となることがしばしばある。肺に発生した悪性腫瘍を制御することは悪性腫瘍全体の生命予後の改善において重要な役割を果たす。現段階では原発性肺癌、転移性肺腫瘍に対して外科的切除が最も根治の可能性を秘めた治療法である。しかし臨床的に完全切除が行われた症例でも肺切除術後1年以内に残存肺に新規悪性腫瘍が出現することがある。Martini等はI期肺癌の完全切除後の残存肺における高い局所再発率と第2肺癌の出現率を報告した[1]。さらに我々の臨床研究によると、増大傾向のないAdenocarcinoma in situを有する症例に対して他部位の肺癌を切除した場合、肺切除術を契機にAdenocarcinoma in situが増大を開始することが分かった[2]。本現象には肺癌患者の素因も関与するが、臨床的に肺切除そのものが残存肺の微小環境に変化をもたらし、そこに潜在している微小癌病巣や前癌病変に何らかの影響を及ぼして癌の再発や第2癌の発生を惹起していると思われる。我々は過去に外科手術と癌の進展に関する基礎的研究を行ってきた。癌を外科的に切除すると癌から放出される腫瘍増殖抑制因子であるangiostatinが枯渇することにより残存腫瘍の進展が促進されることが分かった[3]。また、担癌動物に対して臓器切除を伴う手術侵襲を負荷することにより末梢血中に動員された骨髄由来細胞が癌に沈着し、血管新生の促進などを介して癌の進展が促進されることが分かった[4]。我々の研究の他には、手術侵襲による炎症性サイトカインの働きや免疫能の修飾により癌の進展が促進されたとした報告もある。今回我々はこれらの既存研究の概念とは別に、肺切除を行うと残存肺は腫瘍進展に好適な微小環境を形成し、残存肺に存在する癌の進展が促進されるという新たな仮説を考案した。肺切除を行うと切除後の空洞を埋め合わせるように残存肺が成長または増大し、失った肺機能を部分的に代償することが知られており、この現象は代償性肺成長（増大）と呼ばれている。近年、代償性肺成長は齧歯類のみならず霊長類、特に成人でも認め得る現象であることが報告された。我々は代償性肺成長に関する先行研究でマウス代償性肺成長モデルにおいて術後7日目の残存肺でSDF-1αの高発現を確認し、そのSDF-1αにより骨髄由来細胞が残存肺に沈着し、パラクライン効果により代償性肺成長に寄与することを報告した[5]。SDF-1αは骨髄由来細胞のケモカインとしての働き以外に、SDF-1α/CXCR4 axisを介して腫瘍進展にも寄与することが知られている。すなわち、肺切除後の残存肺で高発現したSDF-1αは残存肺に潜在する癌の進展を促進する可能性がある（図1）。しかし、肺切除後の残存肺でSDF-1αが高発現する

機序、SDF-1α高発現の細胞源、残存肺に発現したSDF-1αの癌進展への具体的な関与、同概念を利用した新たな癌治療の可能性については不明である。



### <参考文献>

- [1] Martini N, et al. J Thorac Cardiovasc Surg. 1995;109: 120-9.
- [2] Ueda K, et al. Anticancer Res. 2014;34: 7401-6
- [3] Li TS, Kaneda Y, Ueda K, et al. Eur J Cancer. 2001; 37: 2283-8.
- [4] Takemoto Y, Li TS, Kubo M, Ohshima M, Ueda K, et al. Surgery. 2011; 149: 792-800.
- [5] Suga A, Ueda K, et al. J Surg Res. 2013; 183: 84-90

### 2. 研究の目的

- (1) マウス片肺全摘モデルを用いて下記を明らかにする。
  - ① 肺全摘後の残存肺で SDF-1α が高発現する機序として、残存肺に負荷される物理的(伸展)張力の重要な役割について。
  - ② 具体的に残存肺での SDF-1α 高発現に寄与する細胞を同定すること。
- (2) 肺切除後の残存肺に負荷される張力を想定した細胞培養モデルを用いて下記を明らかにする。
  - ① 反復伸展刺激を加えた際の SDF-1α の発現量と、肺胞上皮細胞の細胞増殖について。
  - ② 反復伸展を負荷した初代培養の上清中での肺癌細胞の増殖の程度。
- (3) 担癌マウス片肺全摘モデルを用いて下記を明らかにする。
  - ① 片肺全摘後の残存肺での癌進展の程度。
  - ② 片肺全摘後の残存肺にかかる張力を人為的に制限することで癌の進展が抑制されること。
- (4) 臨床症例（肺癌で肺葉切除が行われた症例）を対象に下記を明らかにする。
  - ① 術後残存肺の代償性変化が術後肺機能に及ぼす影響について。
  - ② 術後残存肺の代償性変化の程度と術後遠隔期における残存肺での第2癌発生、肺癌再発の有無との相関について。

### 3. 研究の方法

#### (1) 基礎研究

##### 実験1：(in vivo)

マウス片肺全摘モデルを用いて残存肺に負

荷される物理的（伸展）張力が残存肺での SDF-1 $\alpha$  発現と代償性肺成長に寄与していることを証明する。

- ① 8 週齢マウス (C57BL/6) に Pentobarbital と sevoflurane を併用した全身麻酔下に、1cm の皮膚切開にて第 5 肋間の後側方開胸を行う。絹糸にて左肺門を一括に結紮し、左肺全摘を行う。
- ② 左肺全摘を施行後の残存胸腔内に何も充填しない群と左肺のサイズに相当する人工物を充填する群に分ける。胸腔内充填は残存右肺に負荷される物理的伸展力を制限する目的で行う。
- ③ 胸腔内充填群では、 $\phi$ 5mm 大ポリプロピレン球 5 個を左胸腔内に充填する。予備試験でこの条件により残存右肺の乾燥重量が左肺全摘前のそれと同等であることを確認している。
- ④ 術後 1、3、5、7、10、14 日目に犠牲死させ、残存肺(右肺)の乾燥肺重量、肺の SDF-1 $\alpha$ 、HGF、EGF の濃度を測定 (ELISA) する。HGF、EGF は過去の報告で代償性肺成長に関与するとされている因子である。
- ⑤ 胸腔内充填により残存肺の代償性成長が抑制されることを乾燥肺重量のみならず病理学的に肺胞間距離、肺胞密度を測定することにより検証する。

#### 実験 2: (in vitro)

代償性肺成長は片肺全摘による残存肺の肺胞壁の過伸展が誘因となって起こる。肺胞壁の過伸展は肺実質細胞または間質細胞のいずれかの細胞が感知しシグナル伝達を介して同一または別の細胞で SDF-1 $\alpha$ 、HGF、EGF 等の因子を発現すると考えられる。そこで、代償性肺成長を in vitro で再現する目的で、伸縮可能なシリコン培養皿を用い、肺組織の初代培養を用いて反復性の伸展収縮刺激を加える。この伸展培養の手技は我々の教室で既に使用している方法である。

- ① 8 週齢マウス (C57BL/6) から採取した肺組織より初代培養を行う。
- ② 培養細胞に対して機械的伸展刺激 (STB-140-10:STREX, Osaka, Japan) を与えながら培養する群 (伸展群) と、通常環境で培養する群 (非伸展群) に分ける。
- ③ 両群の培養上清を用いて SDF-1 $\alpha$ 、HGF、EGF の濃度を ELISA にて測定する。
- ④ 両群の培養上清を用いて、マウス肺癌細胞 (RBC0558:LLC) の培養を行い、両群で増殖速度の比較 (細胞数、Ki-67 陽性率) を行う。

#### 実験 3: (in vivo)

担癌マウス片肺全摘モデルを用いて肺全摘後の残存肺では癌進展が促進されることを明らかにする。併せて抑制実験を行う。

- ① 8 週齢マウス (C57BL/6) に、全身麻酔下に尾静脈からルイス肺癌細胞

(RBC0558:LLC) を  $1 \times 10^6$  個投与し微小肺転移モデルを作成する。

- ② 2 日後に左肺全摘後の非充填群、充填群、左肺全摘を行わない開胸のみ (SHAM 群) の 3 群に群分けし、術後 7、14 日目に犠牲死させ、右肺の転移個数を測定する。非充填群では充填群、SHAM 群と比較して腫瘍の形成が顕著であるが、充填群のそれは SHAM 群と変わらないことを確認する。
- ③ 上記と同様に微小肺転移を誘導したマウスに対して左肺全摘 (非充填) を行い、SDF-1 $\alpha$  のシグナルを遮断する目的で、CXCR4 拮抗薬である AMD3100 (Sigma) を osmotic pump (ALZET) に充填して実験動物の皮下に埋め込む。これにより手術直後から術後 7 日目まで CXCR4 拮抗薬を持続投与 (10mg/kg) する。コントロール群としては、PBS を同様に osmotic pump を用いて皮下に持続投与する。両者の間で腫瘍の形成を比較する。

#### (2) 臨床研究

臨床症例 (過去に肺癌で肺葉切除が行われた症例) を対象に残存肺の代償性変化、肺機能変化、術後残肺再発または第 2 癌発生の関係について検証する。

山口大学医学部附属病院・呼吸器外科では、臨床病期 IA 期の非小細胞肺癌の切除症例の前向き臨床データベースが保管されている。その中で、2011 年から 2012 年の 2 年間に上記で肺葉切除術が行われた症例のうち術前、術後半年から 1 年の間に胸部 CT 検査と肺機能検査が施行された 120 例を対象とする。肺葉切除後の解剖学的代償性変化の程度と術前後の肺機能変化との比較検討を行う。解剖学的代償性変化は CT 画像のデジタル解析により行う。肺機能検査値と比較することで、解剖学的代償性変化の程度が残存肺の換気能力に及ぼす影響を検証する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 左肺全摘後の代償性肺成長

SHAM 群と比べて、左肺全摘のみでは術後 7 日目の残存肺の湿重量 ( $0.20 \pm 0.04$  g vs.  $0.41 \pm 0.06$  g,  $P < 0.001$ , Fig. 1A)、乾燥重量 ( $94.3 \pm 2.1$  mg vs.  $183.0 \pm 2.0$  mg,  $P < 0.001$ , Fig. 1B)、肺容積 ( $0.25 \pm 0.06$  mL vs.  $0.44 \pm 0.04$  mL,  $P < 0.001$ , Fig. 1C) が有意に増加した。一方で、肺胞数 ( $63.9 \pm 12.8$ /field vs.  $59.1 \pm 10.7$ /field,  $P > 0.1$ , Fig. 2A)、総肺胞面積 ( $2436 \pm 213$   $\mu\text{m}^2$ /field vs.  $2341 \pm 182$   $\mu\text{m}^2$ /field,  $P > 0.1$ , Fig. 2B)、平均肺胞面積  $40.0 \pm 10.4$   $\mu\text{m}^2$ /alveolus vs.  $41.3 \pm 10.2$   $\mu\text{m}^2$ /alveolus,  $P > 0.1$ , Fig. 2C) は群間で差がなかった。充填術を行った左肺全摘群では、術後 7 日目の残存肺の湿重量 ( $0.23 \pm 0.04$  g, Fig. 1A)、乾燥重量 ( $103.5 \pm 18.4$  mg, Fig. 1B)、肺容積 ( $0.28 \pm 0.03$  mL, Fig. 1C) の増

加は抑制された(いずれも *SHAM* 群との間で有意差なし)。また、肺胞数 ( $59.7 \pm 13.5/\text{field}$ , Fig. 2A)、総肺胞面積 ( $2479 \pm 224 \mu\text{m}^2/\text{field}$ , Fig. 2B)、平均肺胞面積 ( $43.7 \pm 11.3 \mu\text{m}^2/\text{alveolus}$ , Fig. 2C) はいずれの群間とも差がなかった。

Fig 1

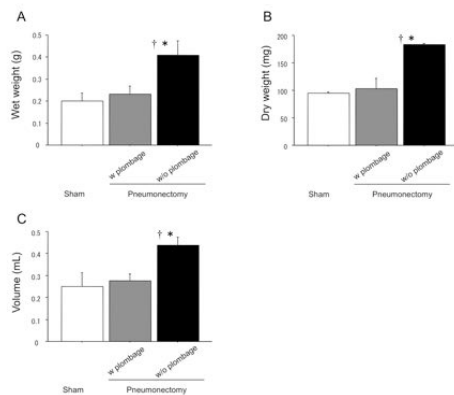


Fig 1. 術後 7 日目の残存肺の湿重量(A)、乾燥重量(B)、肺容積(C) *SHAM* 群と比べて左肺全摘のみ (w/o plombage) では有意な湿重量( $p=0.001$ )、乾燥重量( $p<0.001$ )、肺容積( $p<0.001$ )の増加を認めた。充填術を行った左肺全摘群(w plombage)では *SHAM* 群と比べて湿重量、乾燥重量、肺容積いずれも増加を認めなかった(いずれも  $p>0.1$ )。

Fig 2

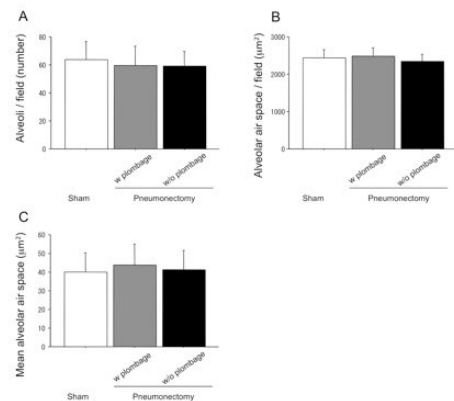


Fig 2. 術後 7 日目の残存肺の肺胞数(A)、総肺胞面積(B)、平均肺胞面積(C) *SHAM* 群と比べて左肺全摘のみ (w/o plombage) と充填術を行った左肺全摘群(w plombage)ともに、肺胞数、総肺胞面積、平均肺胞面積に有意な変化はなかった(いずれも  $p>0.1$ )

#### (2) 左肺全摘後の残存右肺での腫瘍進展

手術の3日前に尾静脈より 3LL 細胞を静注すると、術後 21 日目に *SHAM* 群と比べて左肺全摘群では、残存肺において有意に多数の転移巣が形成された ( $14.2 \pm 7.8$  vs.  $47.7 \pm 10.7$ ,  $P<0.001$ , Fig 3)。充填術を行った左肺全摘群では、充填術を行わない群と比べて転移巣の数は少なかった( $22.0 \pm 14.3$  vs.  $47.7 \pm$

$10.7$ ,  $P=0.006$ , Fig 3)。

Fig 3

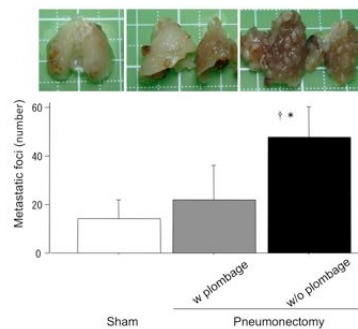


Fig 3. 術前に経静脈的に 3LL 細胞( $3 \times 10^5$  個)を投与された術後の残存肺。手術 3 日前に 3LL 細胞が投与され、術後 21 日目に *SHAM* 群と比べて左肺全摘群(w/o plombage)では有意に多数の転移巣を認めた ( $14.2 \pm 7.8$  vs.  $47.7 \pm 10.7$ ,  $P<0.001$ )。充填術を行った左肺全摘群(w plombage)は左肺全摘群と比べて転移巣の数は少なかった ( $22.0 \pm 14.3$  vs.  $47.7 \pm 10.7$ ,  $p=0.006$ )。

#### (3) 肺細胞から放出される MCP-1

術後 7 日目の右肺から放出される MCP-1 値を Figure 4 に示す。術後 7 日目の MCP-1 値は、左肺全摘のみの群において *SHAM* 群と比べて有意に高値であった ( $73.2 \pm 17.7$  ng/g tissue vs.  $12.2 \pm 4.3$  ng/g tissue,  $P<0.001$ , Fig. 4)。充填術を行った左肺全摘群では左肺全摘のみの群と比べて MCP-1 値は低値であった ( $45.0 \pm 10.4$  ng/g tissue vs.  $73.2 \pm 17.7$  ng/g tissue,  $P=0.015$ , Fig. 4)。

Fig 4

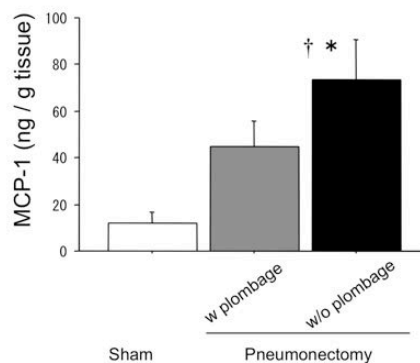


Fig 4. 術後 7 日目の残存肺から放出される MCP-1 左肺全摘群(w/o plombage)では *SHAM* 群と比べて有意に多かった ( $73.2 \pm 17.7$  ng/g tissue vs.  $12.2 \pm 4.3$  ng/g tissue  $p<0.001$ )。充填術を行った左肺全摘群(w plombage)では左肺全摘のみと比べて有意に少なかった ( $45.0 \pm 10.4$  ng/g tissue vs.  $73.2 \pm 17.7$  ng/g tissue,  $P=0.015$ )。

#### (4) 腫瘍辺縁部に集積する CD68+細胞

免疫組織学的分析では、腫瘍関連マクロファージが示唆される CD68 陽性細胞が腫瘍辺縁部において観察された。SHAM 群と比較すると、左肺全摘のみの群では CD68 陽性細胞の集積が顕著であった ( $55.4 \pm 28.1/\text{field}$  vs.  $9.4 \pm 8.2/\text{field}$ ,  $P < 0.001$ , Fig. 5)。充填術を行った左肺全摘群では、左肺全摘群と比べて CD68 陽性細胞の集積が軽減した ( $20.3 \pm 8.7/\text{field}$  vs.  $55.4 \pm 28.1/\text{field}$ ,  $P = 0.010$ , Fig. 5)。

Fig 5

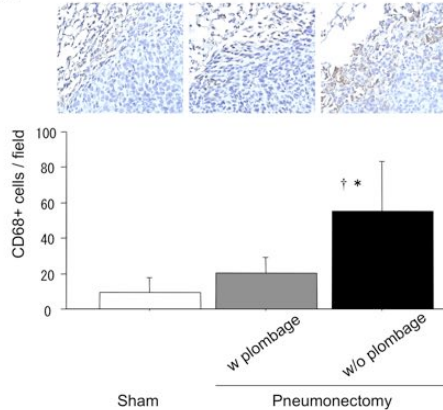


Fig 5. 残存肺の腫瘍周辺に集積する CD68 陽性細胞

SHAM 群と比較して左肺全摘群 (w/o plombage) では有意に集積が多かった (\*,  $55.4 \pm 28.1/\text{field}$  vs.  $9.4 \pm 8.2/\text{field}$ ,  $P < 0.001$ )。充填術を行った左全摘群 (w plombage) では左肺全摘群と比べて有意に集積が軽減した (†,  $20.3 \pm 8.7/\text{field}$  vs.  $55.4 \pm 28.1/\text{field}$ ,  $P = 0.010$ )。

#### 《臨床研究》

術前と術後 6 ヶ月において画像解析ソフト (AZE Virtual Place Raijin) を用いた胸部 CT 画像解析を行い、肺野の低吸収域容積 (<-910 HU), 機能的肺容積 (-910 から -600HU), 両容積の和である全肺容積を測定した。これらは切除肺葉と非切除肺葉に分けて測定した。術後の肺機能の予測値は機能的肺容積の切除量に基づいて算出した。その結果、切除肺と非切除肺の間で低吸収域の分布の不均一性はなかった ( $r = 0.997$ )。術後一秒量の実測値が予測値の 1.4 倍以上であった 8 例を代償効果陽性と判断した。うち 7 例で術前に気流閉塞を呈していたが、気流閉塞は術後に軽減していた。代償効果陽性の 8 例ではその他の症例と比較して低吸収域容積が大きく、全肺容積から肺活量を差し引いた容積 (呼気時全肺容積) が大きく、一秒率が低値であった。多変量解析で一秒率と呼気時全肺容積は代償効果の独立予測因子であった。

#### 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 1 件)

1. Murakami J, Ueda K, Hayashi M, Kobayashi T, Kunihiro Y, Hamano K. Size-capacity mismatch in the lung: a novel predictor for complications after lung cancer surgery. *Journal of Surgical Research* 2017; 209: 131-138. doi: 10.1016/j.jss.2016.08.051 (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

1. 村上 順一, 吉田 久美子, 佐野 史歩, 林 雅太郎, 田中 俊樹, 上田 和弘, 濱野 公一. 両側肺、2 期にわたる解剖学的肺切除後に代償性肺成長は生じるか? 第 33 回日本呼吸器外科学会総会 2016 年

[図書] (計 0 件)

[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 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

上田 和弘 (UEDA, Kazuhiro)  
山口大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 9 0 4 2 0 5 2 0

##### (2) 研究分担者

西本 新 (NISHIMOTO, Arata)  
山口大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 9 0 3 9 6 3 2 5