

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10266

研究課題名(和文) TLRsとその下流因子の肺癌進行における役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of TLRs and its downstream factors in lung cancer progression

研究代表者

青木 雅也 (Aoki, Masaya)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：50624996

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)：非小細胞肺癌の切除検体においてTLR4とMyD88の免疫組織学的な発現について検討し、臨床病理学的因子や予後との相関について評価を行った。結果は未公開であるがTLR4とMyD88の肺癌細胞における発現が臨床病理学的因子や予後などと相関することが明らかとなっている。現時点ではin vitroやin vivoの研究の準備段階であり、さらにより基礎的な研究において実証していく予定である。in vitroやin vivoの研究で使用する肺癌細胞株はすでに購入しており、細胞を増殖・継代しいつでも研究に移ることができる状況である。

研究成果の概要(英文)：We examined immunohistological expression of TLR4 and MyD88 in resected specimens of nonsmall cell lung cancer and evaluated correlation with clinicopathological factors and prognosis. Although the results are unpublished, it is clear that the expression of TLR4 and MyD88 in lung cancer correlates with clinicopathological factors and prognosis. At the present, it is preparatory stage for research in vitro and in vivo, and we plan to demonstrate it in more fundamental research. Lung cancer cell lines used for in vitro and in vivo studies have already been purchased, it is a situation where cells can be proliferated and passaged and can be transferred to research at any time.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：TLR4 MyD88 非小細胞肺癌 免疫染色 細胞実験

1. 研究開始当初の背景

近年肺癌に対しては手術と化学放射線療法との組み合わせによる集学的治療が行われており、分子標的薬剤も治療に導入されてきている。しかし、肺癌による死亡率は年々増加傾向にあり、その診断や治療に有用な新たな癌関連因子の発見が望まれている。

Toll-like receptors (TLRs) signaling pathwayは下流のNF- κ Bの活性化を通して細胞のSurvival, Proliferation, Inflammation, Immune regulation等を調整している。現在では少なくとも13のTLR familyが同定されている。この中でも特にTLR4に関しては肺の正常組織より肺癌組織において高発現しており、分化度の低い肺癌においてより高発現していたとの報告がある。しかし、これらの文献では予後や再発に関する報告がなされていない。TLR4に関しては肺癌以外にも胃癌や大腸癌、多発性骨髄腫等でもその発現が報告されている。大腸癌においてはTLR4の腫瘍細胞における発現は癌の病期や術後肝転移、Overall Survivalと関連しており、下流のMyeloid differentiated factor 88 (MyD88)の発現とあわせるとDisease Free Survivalとの関連性も認めたとの報告がある。一方で、マウスを用いたin vivoの実験においてTLR4はEGFRや炎症反応に関する遺伝子、細胞の遊走や増殖に参与する遺伝子を制御することで肺の慢性炎症のあるマウスの発癌を抑制しているという報告もある。以上よりTLR4は発癌に対しては抑制的な働きをするが癌の進展に対しては腫瘍免疫の回避やアポトーシスの抑制といった機能により促進的に働いていることが予測される。ただし、TLRs signaling pathwayの下流の因子はさまざまな因子により調整されており、TLRsの発現のみで発癌や癌の進展に関する全てを説明することは難しく、TLRs signaling pathwayを制御している因子がTLRsの癌に対する多機能性として表現されているものと思われる。

現在RapamycinやTAK-242といったTLR4 signaling pathwayの阻害因子が確認されており、癌に対する治療効果が期待されている。また、このsignaling pathwayには様々な癌の進展と関連していると考えられているNF- κ Bが存在し、さらにはCox2などといった因子との関連性もあるため癌の治療を目指す上でその機構を解明することが急務と考える。また、TLR4以外のTLR familyに関しては癌に関連する研究が十分になされておらず、肺癌に対するそれらの役割についても今後の研究で明らかとしていく必要がある。

2. 研究の目的

TLRsやTLRs signaling pathwayを制御している因子の肺癌に対する役割を研究することで、腫瘍進展の新たなバイオマーカーを発見できる可能性があると考えている。また、TLRs signaling pathwayと癌の分化との関連性や癌細胞の免疫回避の機構を解明することで肺癌に対する新たな化学療法や免疫療法の戦略を確立できると考え本研究の考案にいたった。

3. 研究の方法

今回申請者らは研究期間内に以下の項目を明らかにすることを目標とした。

1. 肺癌の臨床検体を用いてTLRsの発現を観察し、臨床病理学的因子との関連性を明らかにする。

2. 肺癌細胞株にTLRsを加えることによる細胞の特性の変化を明らかとする。

TLRsをtransfectionすることや、TLRs signaling pathwayの阻害剤を使用したり、TLRsのsiRNAにより干渉することによるproliferation assay, migration assay, invasion assayの変化をみることで肺癌進展に対するTLRsの機能を明らかとする。

3. 肺癌細胞株を移植したヌードマウスに対するTLRsの影響を明らかとする。

2.と同じ手法を用いてTLRsをtransfectionや

knock outした肺癌細胞株を用いて移植癌細胞の増殖や実際のリンパ節・遠隔転移の変化を明らかとする。さらには癌細胞の免疫機構を観察するため腫瘍間質細胞の特徴も把握する。

4. 研究成果

非小細胞肺癌の切除検体においてTLR4とMyD88の免疫組織学的な発現について検討し、臨床病理学的因子や予後との相関について評価を行った。結果は未公開であるがTLR4とMyD88の肺癌細胞における発現が臨床病理学的因子や予後などと相関することが明らかとなっている。現時点ではin vitroやin vivoの研究の準備段階であり、さらにより基礎的な研究において実証していく予定である。in vitroやin vivoの研究で使用する肺癌細胞株はすでに購入しており、細胞を増殖・継代しいつでも研究に移ることができる状況である。研究に使用した一次抗体や免疫染色を行うための試薬、肺癌の細胞株や細胞株の保存・増殖に用いる試薬、今後in vivoの研究に用いる試薬などを揃えるために費用を要した。また、実際に免疫染色や細胞の培養・増殖などを行う実験助手の人件費にも費用が必要であった。この研究期間には、2017年に横浜で行われたIASLCをはじめとして日本呼吸器外科学会・日本肺癌学会・日本胸部外科学会・日本呼吸器内視鏡学会などに参加し、他の研究者と本研究に関する議論を行った。これらの旅費にも費用を要した。今後はin vitroの研究においてTLR4やMyD88の発現した細胞株と発現しない細胞株の細胞の増殖能や浸潤能、遊走能などについて検討し、それらをまとめた上でin vivoの研究で実験動物を用いて実際の生体内におけるこれらの役割を解明していくことを予定している。これらの研究において有意義な結果が得られれば現在得られている結果を合わせて国際学会や国内学会、論文での報告をしたいと考えている。

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 9 件)

1. Nakajo M, Jinguji M, Shinaji T, Nakajo M, Aoki M, Tani A, Sato M, Yoshiura T. Texture analysis of ^{18}F -FDG PET/CT for grading thymic epithelial tumours: usefulness of combining SUV and texture parameters. Br J Radiol. 2018 Feb;91(1083):20170546.
2. Takeda AH, Watanabe Y, Nagata T, Aoki M, Umehara T, Suzuki S, Kamimura G, Wakida K, Otsuka T, Yokomakura N, Kariatsumari K, Sakasegawa K, Nakamura Y, Sato M. Detection of alternative subpleural lymph flow pathways using indocyanine green fluorescence. Surg Today. 2018 Jan 30.
3. Umehara T, Aoki M, Kamimura G, Wakida K, Nagata T, Otsuka T, Sato M. Coil Intrabronchial Migration in an Arteriovenous Malformation Patient Treated 10 Years Ago. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 2017 Aug 20;23(4):200-202.
4. Nagata T, Nakamura Y, Kariatsumari K, Otsuka T, Aoki M, Sato M. Potentially overlooked branches of the left pulmonary artery. Asian Cardiovasc Thorac Ann. 2016 Sep;24(7):676-80.
5. 上村 豪, 青木 雅也, 中村 好宏, 末永豊邦, 佐藤 雅美. カバー付きステントが奏効した食道損傷. 胸部外科 (0021-5252)69 巻 7 号 Page525-527(2016.07)
6. Watanabe Y, Ogura C, Hatanaka K, Okada Y, Watanabe T, Oishi H,

Matsuda Y, Notsuda H, Harada A, Aoki M, Nagata T, Kariatsumari K, Nakamura Y, Sato M, Kondo T.

MicroRNA Analysis in a Mouse Heterotopic Tracheal Transplant Model. J Heart Lung Transplant. 2016 April; 35(4): S177-8

7. Watanabe Y, Umehara T, Harada A, Aoki M, Tokunaga T, Suzuki S, Kamimura G, Wakida K, Nagata T, Otsuka T, Yokomakura N, Kariatsumari K, Nakamura Y, Watanabe Y, Sato M. Successful closure of a tracheocutaneous fistula after tracheostomy using two skin flaps: a case report. Surg Case Rep. 2015 Dec; 1(1): 43.
8. Umehara T, Aoki M, Harada A, Watanabe Y, Sato M. A Case of Nontuberculous Mycobacteria Highly Suspected as Lung Cancer Invading the Aortic Arch. J Thorac Oncol. 2015 Jul;10(7):1118-9.
9. Watanabe Y, Harada A, Aoki M, Kamimura G, Wakida K, Nagata T, Yokomakura N, Kariatsumari K, Nakamura Y, Sato M. Pulmonary Metastasectomy 31 Years After Surgery for Renal Cell Carcinoma. Ann Thorac Surg. 2015 Jun;99(6):2195-7.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

青木 雅也 (Aoki Masaya)
鹿児島大学 医歯学域医学系 助教
研究者番号：50624996

(2)研究分担者

佐藤 雅美 (Sato Masami)
鹿児島大学 医歯学域医学系 教授
研究者番号：30250830

中村 好宏 (Nakamura Yoshihiro)
鹿児島大学 医歯学域附属病院 講師
研究者番号：60381159

狩集 弘太 (Kariatsumari Kota)
鹿児島大学 医歯学域附属病院 助教
研究者番号：20648050

大塚 綱志 (Otuka tunayuki)
鹿児島大学 医歯学域附属病院 助教
研究者番号：40464466

永田 俊行 (Nagata Toshiyuki)
鹿児島大学 医歯学域附属病院 医員
研究者番号：70611763

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()