

令和元年6月4日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10689

研究課題名(和文)新規肺腺がん細胞株を用いたがん浸潤・転移機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of cancer metastasis and invasion mechanism using a new lung adenocarcinoma cell line.

研究代表者

佐藤 之俊 (Sato, Yukitoshi)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90321637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：微乳頭構造を示す原発性肺腺癌は(micropapillary pattern：以下MPP)、通常の腺癌より浸潤・転移あるいは再発を起こしやすく予後不良である。申請者らが樹立したMPPの原発巣組織に由来する新規細胞株(KU-Lu-MPPt3)を用いて、肺腺癌における転移・浸潤機構の解析を行った。その結果、転移能、血管新生、増殖に係る候補遺伝子をいくつか挙げる事が出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規細胞株を利用して、これまで成し得なかった解析(転移モデル動物の作成、浸潤・転移に関する因子の網羅解析等)が可能となり、肺癌の早期診断や治療計画を立てる際の判断材料として有用なものとなるのみならず、新たな分子標的治療薬や免疫療法といった新規治療開発にも寄与できる可能性が非常に高く、社会的貢献度も高い。

研究成果の概要(英文)：Primary lung adenocarcinomas with a micropapillary pattern (MPP) are characterized by more frequent and pronounced vascular invasion, higher incidence and more advanced lymph node involvement, and poorer prognosis than papillary adenocarcinomas without an MPP. Here we established a new lung cancer cell line, named KU-Lu-MPPt3, featuring micropapillary structure from a patient with adenocarcinoma with MPP. We found some genes associated with cancer metastasis and invasion.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺腺癌 微乳頭構造 細胞株 転移 浸潤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦で原発性肺癌は悪性腫瘍のうち最多の死因であり、死亡数も年間 7 万 4 千人を超えている。原発性肺癌の組織型は多彩であるが、中でも肺腺癌において微乳頭構造を有する肺腺癌は脈管侵襲やリンパ節転移の頻度が高く、長期予後は不良である (Am J Surg Pathol 27: 101-9, 2003; Cancer 102: 81-6, 2004)。しかしながら、この微乳頭構造を示す肺腺癌は他の肺腺癌に比べて研究材料は限られており、悪性度の解明や治療法開発のための基礎研究が進んでいない。そこで申請者らが樹立した MPP の原発巣組織に由来する新規細胞株 (KU-Lu-MPPt3) を用いて解析を行うことにより、これまで成し得なかった上記解析が可能となり、肺腺癌の病態解明や治療法開発につなげることが可能となると期待される。

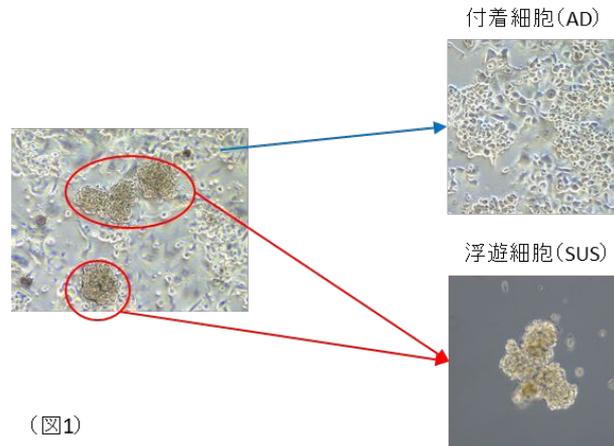
2. 研究の目的

微乳頭構造を示す原発性肺腺癌 (micropapillary pattern: 以下 MPP) は、新たに WHO 肺癌組織分類 (第 4 版) に採用されたが、通常の腺癌より浸潤・転移を起こしやすく予後不良であり、癌の早期転移・浸潤の解析モデルとして注目されている。そこで申請者らが新規に樹立した MPP 細胞株 (KU-Lu-MPPt3) を用いて肺腺癌における転移・浸潤機構を明らかにし、その知見を踏まえて新たな肺癌治療法の開発に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

遺伝子およびタンパク発現の検索:

KU-Lu-MPPt3 細胞株は、その多くが結合性の強い付着細胞であるが、一部の細胞は房状に隆起し、また一部は完全に浮遊して小集塊として増殖するという極めて珍しい特徴を有している。これは MPP の組織像の特徴を反映しているものと考えられる。この特徴を持つ細胞のうち、付着細胞 (AD) と浮遊細胞 (SUS) をそれぞれ独立して培養し、継代を重ねたものを使用して、遺伝子およびタンパク発現の網羅解析を行う。(図 1)



Wnt5a, Ror1, Ror2 シグナルの検索:

悪性腫瘍の浸潤・転移能との関連が示されている Wnt5a-Ror1-Ror2 の pathway について、それらの発現レベルを解析するとともに、上流シグナルと考えられている Wnt5a の発現をリアルタイム PCR で解析する。さらに、Wnt5a-Ror2 シグナル、Ror1 シグナルの活性化が検出された場合には、MMPs の発現誘導や浸潤能の亢進が想定されるため、浸潤アッセイおよび増殖アッセイを行う。

モデル動物の作製: KU-Lu-MPPt3 細胞株を NOD/SCID マウスの尾静脈もしくは肺実質に接種して肺転移モデルならびにリンパ節転移モデルの作製を行う。

4. 研究成果

遺伝子およびタンパク発現の検索:

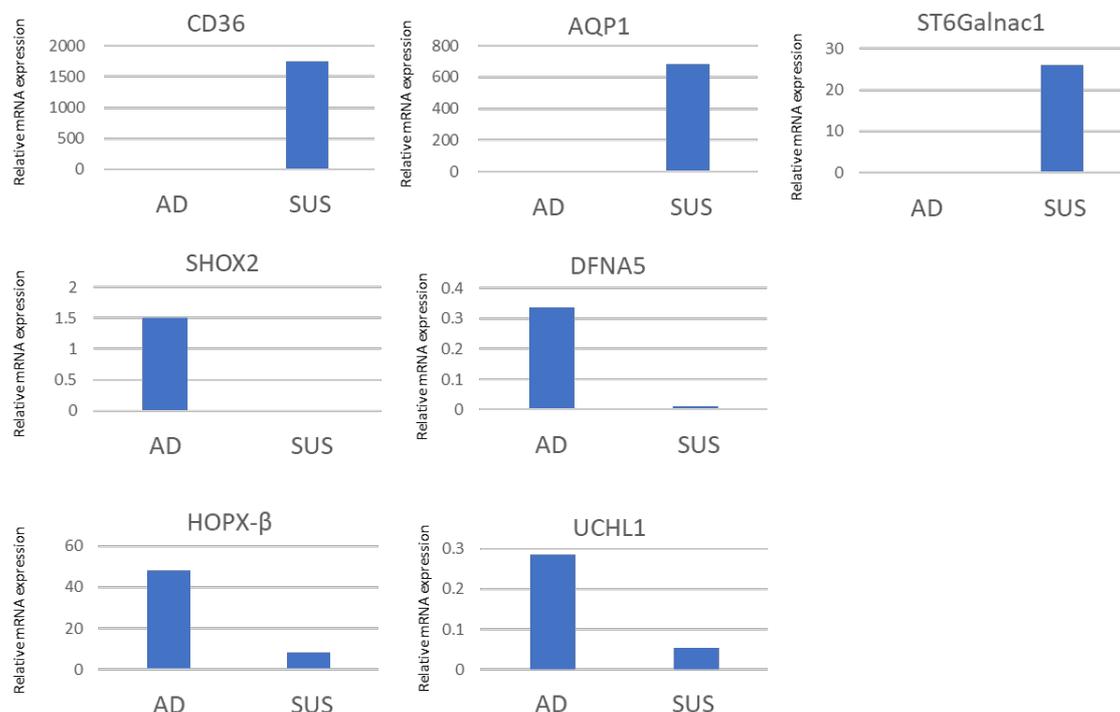
KU-Lu-MPPt3 細胞株の AD と SUS に分けた細胞を用いて DNA マイクロアレイによる網羅的解析を行った。その結果、AD と SUS の間で 2 倍以上差のある遺伝子が 8054 個同定された。それらのうち、AD に対して SUS が 2 倍以上のものが 3882 個、SUS に対して AD が 2 倍以上のものが 4172 個であった。

これらの遺伝子の中から、候補遺伝子を複数個挙げ (CD36, AQP1, ST6GalNac1, SHOX2, DFNA5, HOPX-β, UCHL1)、実際の発現量についてエンドポイント PCR を用いて比較したところ、CD36, AQP1, ST6GalNac1 が AD に対して SUS で発現の亢進を認め、SHOX2, DFNA5 では抑制を認めた。(図 2) HOPX-β, UCHL1 についてはエンドポイント PCR で差は認められなかったが、リアルタイム PCR で解析したところ、SHOX2, DFNA5 と同様に発現の抑制を認めた。また、CD36, AQP1, ST6GalNac1, SHOX2, DFNA5 のリアルタイム PCR による解析では、エンドポイント PCR と同様の結果が得られた。(図 3) これらの結果から、腫瘍の脂肪代謝や水代謝、がん幹細胞関連の遺伝子の関与が示唆された。



(図 2)

今後はこれらの遺伝子に焦点を当てると共に、他の差異のある遺伝子も候補に挙げ、AD と SUS という増殖形態の違いの原因となる因子の特定を行う。



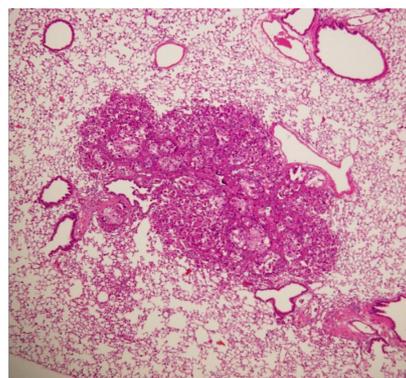
(図3)

Wnt5a, Ror1, Ror2 シグナルの検索：

リアルタイム PCR で mRNA 量を測定したところ、Wnt5a および Ror1 で高発現を認めため、Ror1 が本腫瘍の浸潤・増殖に関与していると想定された。そこで、KU-Lu-MPPt3 細胞株を用いて Ror1 および Wnt5a をノックダウンし、浸潤アッセイ及び増殖アッセイを行ったところ、浸潤能および増殖能に明らかな相違は証明されなかった。

モデル動物の作製：

マウス尾静脈より KU-Lu-MPPt3 細胞を投与し、3 か月後に肺を摘出して病理組織を作製した。薄切して肺組織切片の H.E.染色を行ったが、腫瘍塊は認められなかった。そこで、左肺の肺実質に直接 KU-Lu-MPPt3 細胞を接種し腫瘍の増殖モデル作成を試みた。接種の 30 日後に肺を摘出して組織切片の H.E.染色を行ったところ、接種した細胞の増殖は認められたものの、肺内転移あるいはリンパ節転移は認められなかった。(図 4)これは、本細胞株の増殖速度に起因するものと考えられた。今後は肺接種後に、さらに長期間にわたるインターバルを置いたリンパ節転移モデルの作製を試みる。



(図4)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Mikubo M, Naito M, Matsui Y, Shiomi K, Ichinoe M, Yoshida T, Satoh Y. Relevance of intraoperative pleural lavage cytology and histological subtype in lung adenocarcinoma. Ann Thorac Surg. 2018 Dec; 106(6):1654-1660. 査読有 DOI : 10.1016/j.athoracsur.2018.07.035.

Matsuo Y, Shiomi K, Sonoda D, Mikubo M, Naito M, Matsui Y, Yoshida T, Satoh Y. Molecular alterations in a new cell line (KU-Lu-MPPt3) established from a human lung adenocarcinoma with a micropapillary pattern. J Cancer Res Clin Oncol. 2018 Jan; 144(1):75-87. 査読有 DOI : 10.1007/s00432-017-2541-0.

〔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：
国内外の別：

取得状況(計 1 件)

名称：微乳頭構造を有する肺腺癌細胞用培地及びその利用
発明者：佐藤之俊，松尾由紀子，中島裕康
権利者：学校法人北里研究所
種類：特許
番号：特許第 6472084 号
取得年：平成 31 年
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：内藤 雅仁
ローマ字氏名：(NAITO, masahito)
所属研究機関名：北里大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：50648730

研究分担者氏名：三窪 将史
ローマ字氏名：(MIKUBO, masashi)
所属研究機関名：北里大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：90723940

研究分担者氏名：中島 裕康
ローマ字氏名：(NAKASHIMA, hiroyasu)
所属研究機関名：北里大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：30769831

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。