

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月3日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19082

研究課題名(和文) 浸潤性肺腺癌組織亜型に関わるエピジェネティクス変化の解明と個別化治療への応用

研究課題名(英文) Investigation of epigenetic changes related to histological subtype in invasive lung adenocarcinoma and development of precision medicine.

研究代表者

坂部 友彦 (SAKABE, Tomohiko)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：50639747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Stage Iの浸潤性肺腺癌の組織亜型と患者予後との関連について解析を行い、high grade亜型を有する患者は、無再発生存期間が優位に短く予後不良であることを明らかにした。また、病理標本におけるヒストン修飾変化の検出を試みたが、目的のピークを検出することは出来ず、サンプルの処理条件を検討する必要があると考えられた。さらに、マウス肺から採取した上皮細胞を三次元培養することで、肺腺癌の起源となるクララ細胞、II型肺胞上皮細胞を含む肺オルガノイドを培養することができ、組織亜型を模倣可能なモデル細胞およびモデル動物として有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

High grade亜型を有する浸潤性肺腺癌患者は早期のステージであっても予後不良であることから、high grade亜型に対する治療法が必要であるが、現在のところ有用な治療薬は存在しない。本研究の実施による組織亜型形成に重要な分子メカニズムの解明、治療標的の同定、モデル動物の作成は、将来的に肺腺癌患者の長期予後改善に繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the association between the histological subtype and prognosis in patients with stage I invasive lung adenocarcinoma, and demonstrated that patients with high grade subtype had significantly shorter relapse-free survival and poor prognosis. Additionally, although we tried to detect histone modification in pathological specimens, it was impossible to detect the peak of interest. It was considered necessary to examine the protocol of sample preparation. Furthermore, lung organoids containing Clara cells and type II alveolar epithelial cells, which are the source of lung adenocarcinoma, were established by three-dimensional culture of epithelial cells obtained from mouse lung, suggesting that it is useful as a model cell and model animal capable of mimicking histological subtypes of lung adenocarcinoma.

研究分野：実験病理学

キーワード：IASLC/ATS/ERS分類 三次元培養

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

1. 研究開始当初の背景

近年の研究結果によって、腫瘍組織は癌幹細胞を含む多様な細胞によって構成された極めて不均一な集団であることが明らかになってきており、そのため腫瘍の分子生物学的プロファイルの詳細に明らかにした上で、腫瘍内ヘテロジェニティを考慮した治療法を開発することが、今後の癌治療における課題であると考えられる。肺腺癌は様々な癌腫の中でも腫瘍内ヘテロジェニティが大きく、病理学的な組織型に基づいた IASLC/ATS/ERS 分類が病理診断において使用されている (*Proc Am Thorac Soc* 2011;8:381-5)。IASLC/ATS/ERS 分類において浸潤性肺腺癌は、その増殖形態に基づいて 5 種類に分類 (lepidic, acinar, papillary, micropapillary, solid)され、腫瘍細胞を占める割合が最も大きい成分を用いた優勢組織亜型分類がなされている。肺腺癌内にはこれらの組織亜型が混在しており、患者予後にも密接に関与していることが示唆されている。特に、micropapillary, solid は high grade に大別され、high grade 亜型を有する患者はリンパ節転移が多く、全生存期間、無再発生存期間が短いことが報告されている (*Eur J Cardiothorac Surg* 2015;11, *Ann Thorac Surg* 2014;98:453-8)。そのため、high grade 亜型の浸潤性肺腺癌患者に対応した治療の実施が必要であるが、現在のところ組織亜型ごとの分子生物学的プロファイルは検討されておらず、組織亜型の形成メカニズムや分子標的は明らかになっていないため、high grade 亜型を標的とした治療薬は開発されていない。

申請者は、浸潤性肺腺癌の組織亜型が初期段階 (ステージ I)から確立されていることから、長い期間を経て蓄積していく遺伝子変異が亜型ごとに生じている可能性は低いと考え、より柔軟で可逆性の高いヒストン修飾によるエピジェネティクス制御に着目し、エピジェネティクス変化に伴う変化による遺伝子発現変動によって各組織亜型が形成されているのではないかと考えた。また、組織亜型形成における分子生物学的プロファイルの検討が進まない要因として、IASLC/ATS/ERS 分類が腫瘍の組織学的形態に基づいた分類であり、組織亜型を模倣できるモデル細胞やモデル動物が存在しないことで、DNA や RNA の採取ができず、分子生物学的解析が困難となっていると推測し、腫瘍の組織形態を壊すことなく切片上の分子を検出できる質量分析イメージングを用いた本研究を考案した。

2. 研究の目的

本研究は、浸潤性肺腺癌の組織亜型 (lepidic, acinar, papillary, micropapillary, solid)ごとに生じているヒストン修飾の違いを検討し、各組織亜型が生じるメカニズムを解明することで、予後不良な high grade 亜型 (micropapillary, solid)を標的とした新規治療薬開発の為の分子標的探索を行うことを目的としている。また、組織亜型形成を模倣で可能なモデル動物作成に向けた基礎的研究も同時に実施する。

3. 研究の方法

(1) 浸潤性肺腺癌予後解析

2003年から2016年に鳥取大学医学部附属病院で外科切除を受けた肺腺癌患者492例について優勢組織亜型の解析および無再発生存期間解析を行った。生存期間解析については、優勢亜型が lepidic, acinar, papillary の患者を low grade、micropapillary, solid の患者を high grade に分類し、ログ・ランク検定によって2群間の生存期間比較を実施した。

(2) 質量分析イメージング

ヘマトキシリン&エオジン染色により、腫瘍内に複数の組織亜型が混在していることが確認できた浸潤性肺腺癌外科切除検体の病理標本から、10 μm 厚の薄切片を作成し、ITO コートスライドガラスに貼り付けた。サンプルはキシレンによる脱パラ、エタノールによる脱水、水和後に、10 mM Tris/EDTA (pH 9.0)で抗原賦活化を行った。sDHB マトリクス塗布後、rapiflex のリニアポジティブイオンモードによる測定を行った。また、サンプル準備の別条件として、水和後のサンプルを propionic acid による誘導体化後にトリプシン処理によるタンパクの断片化を行い、DHB マトリクス塗布後、ultraflex II による測定を行った。

(3) マウス肺線維芽細胞分取

マウスより採取した肺を DMEM/F12 をもとに作成した protease solution (450 U/mL Collagenase Type I, 4 U/mL Elastase, 5 U/mL Dispase, 0.33U/mL DNase I)で 37°C、25 分間振盪することで細胞を分離した。分離細胞を 1×RBC Lysis Buffer で処理することで赤血球を溶血し、10 cm 培養皿に播種後、37°C、5% CO₂ でインキュベートした。接着細胞をマウス肺線維芽細胞として培養し、1 mg/mL マイトマイシン C で細胞増殖を止めた後、以後の実験に使用した。

(4) マウス肺上皮細胞分取

マウスより採取した肺を protease solution で 37 °C、25分間振盪することで細胞を分離した。抗 CD31 抗体、抗 CD45 抗体を用いた magnetic-activated cell sorting (MACS)によって分離細胞に含まれる血管内皮細胞、血球細胞を除去した。さらに、細胞を APC 標識抗 EpCAM 抗体、PE-Cy7 標識抗 CD31 抗体、PE-Cy7 標識抗 CD45 抗体を用いて染色し、flow cytometry (FCM)によって APC+/PE-Cy7-分画を回収して、これをマウス肺上皮細胞として、以後の実験

に使用した。

(5) マウス肺オルガノイド培養

マウス肺から回収した肺線維芽細胞、肺上皮細胞をマトリゲル内で共培養することで肺オルガノイドの作成を行った。肺オルガノイド用培地 (mTEC/Plus medium) に懸濁した肺線維芽細胞と肺上皮細胞を 5.0×10^4 cells/well ずつマトリゲルに混和 (培地 : マトリゲル = 2 : 1) し、24-well トランスウェルプレートの上段に播種した。トランスウェルプレートの下段には 600 μ L mTEC/Plus medium を加えて、37 °C、5% CO₂ でインキュベートした。下段のメディウムは毎日交換し、2~3 週間培養することで肺オルガノイドを作成した。

(6) 遺伝子発現解析

培養 14 日後のオルガノイドに Cell Recovery Solution を加えてマトリゲルを分解し、回収したオルガノイドから RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA から high capacity RNA-to-cDNA Kit によって cDNA を合成し、これをテンプレートとして TaqMan Gene Expression Master Mix、LightCycler 96 system による real-time PCR を実施して遺伝子発現解析を行った。各遺伝子の発現量は内在性コントロール (GAPDH) による標準化を行い、マウス肺における遺伝子発現と比較した。

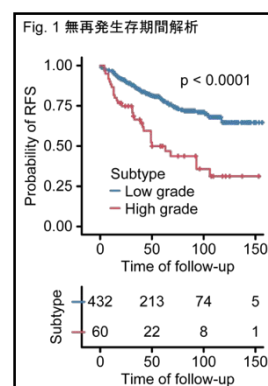
(7) タンパク発現解析

培養 21 日後のオルガノイドに Cell Recovery Solution を加えてマトリゲルを分解し、オルガノイドを回収した。回収したオルガノイドを iPCell によってゼリー状に固めた後、4% PFA/PBS で固定し、ホルマリン固定パラフィン包埋標本を作成した。パラフィン包埋標本から 3 μ m 厚の切片を作成し、キシレンによる脱パラフィン、エタノールによる脱水、クエン酸バッファー (pH 6.0) による抗原賦活化、ブロックエースによるブロッキング処理の後、抗 SFTPC 抗体、抗 PDPN 抗体、抗 CC10 抗体を用いて 1 次抗体反応を 4 °C、o/n で実施した。2 次抗体には 3 種類の蛍光色素 (Alexa Fluor 488, 568, 647) を用いて反応を行い、封入剤 (ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI) による封入および対比染色を実施し、共焦点顕微鏡による観察を行った。

4. 研究成果

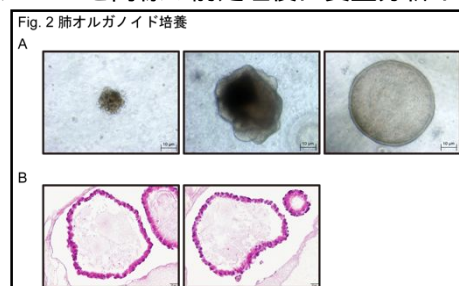
(1) 浸潤性組織亜型と肺腺癌患者予後との関連解析

Stage I の浸潤性肺腺癌患者 492 例の外科切除検体において、優勢組織亜型の割合は、lepidic predominant が 87 例 (17.7%)、acinar predominant が 272 例 (55.3%)、papillary predominant が 73 例 (14.8%)、micropapillary predominant が 4 例 (0.8%)、solid predominant が 56 例 (11.4%) であった。これらの患者について low grade (lepidic, acinar, papillary) および high grade (micropapillary, solid) の 2 群に分類し、無再発生存期間について 2 群間の比較検討を行った。検討した症例のうち、60 例が high grade に分類され、high grade の患者は、low grade の患者と比較して有意に無再発生存期間が短く予後不良であることが明らかとなった (Fig. 1)。これらの結果から、浸潤性肺腺癌患者の予後改善のためには、high grade 亜型に対する新規治療薬開発の必要性が示唆された。



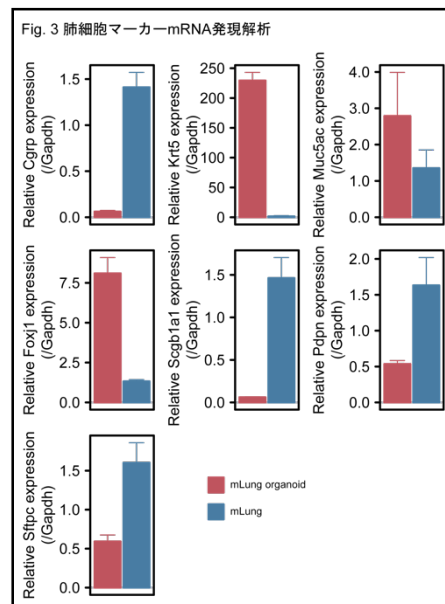
(2) 浸潤性組織亜型におけるエピジェネティクス変化の検討

各組織亜型におけるエピジェネティクス変化を可視化するために質量分析イメージングによるヒストン修飾の検出を行なった。病理検体から薄切片、前処理を行なった切片に sDHB マトリックスの噴霧後、検出を行なったが、目的としていたヒストンタンパクを含めた他のタンパクのピークを検出することは出来なかった。今回使用した病理標本は、ホルマリン固定によるメチレン架橋などが生じており、タンパクの二次元/三次元構造の消失、マトリックスがタンパク分子に到達しにくくなっているために、ピークが検出できなかったと推測した。そこで、サンプルのさらなる前処理として、タンパク架橋を乖離させる不活化処理やトリプシンを用いた酵素処理、プロピオン酸による誘導体化を行なった上で検出を行なった。コントロールとして組み換えヒトヒストン H3、および組み換えヒトヒストン H4 を同様の前処理後に質量分析イメージングを実施した。コントロール標品における解析ではタンパクを示すピークが検出されたが、ヒストン H3 断片 (TK₄QTAR, K₉STGGK₁₄APR, K₁₈QLATK₂₃VAR, K₂₇SAPATGGVK₃₆KPHR, EIAQDFK₇₉T)、ヒストン H4 断片 (GK₅GGK₈GLGK₁₂GGAK₁₆R) として予測された質量を検出することは出来なかった。病理検体でのヒストン修飾の検出を実現するためには、サンプルの調整法をより詳細に調整する必要があることが示唆された。



(3) マウス肺オルガノイドの作成

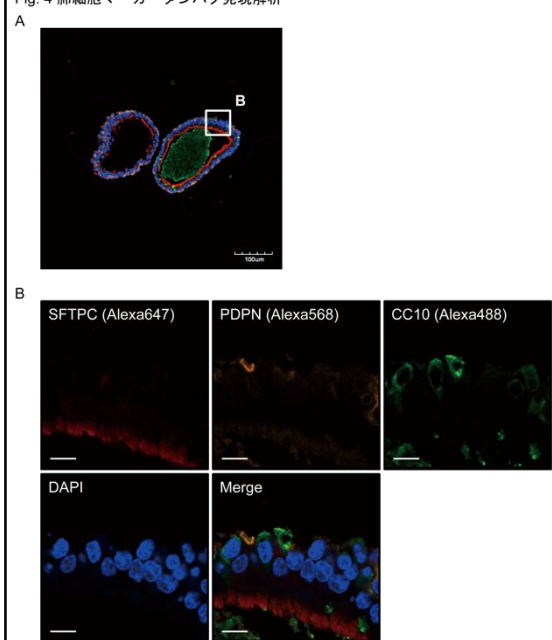
肺腺癌組織亜型を模倣可能なモデル動物を樹立するために、様々な遺伝子操作が可能な *in vivo* 発癌モデルに着目して、マウス肺オルガノイドの作成を行った。トランスウェルプレートでマトリゲルとマウス肺上皮細胞単独、およびマウス肺線維芽細胞と混和して14~21日間培養したところ、肺胞上皮細胞単独ではオルガノイドの形成は認められなかったが、肺線維芽細胞との共培養によってマウス肺由来オルガノイドの形成が確認できた (Fig. 2A, B)。作成したオルガノイドは、一般的なオルガノイド構造を示すものの他に、房状および球体構造を示すオルガノイドが混在していた。肺組織は中枢と末梢で構成細胞が異なっており、中枢である気道域には気道上皮細胞が存在し、末梢である呼吸域には肺胞上皮細胞が存在している。多様な構造を示すオルガノイドが形成されたのは、それぞれ気道域、および肺胞域の異なった領域の細胞へ分化しながらオルガノイドが形成されたためであると推測された。



(4) 肺細胞マーカー発現解析

作成したオルガノイド内にどのような細胞が存在しているかを明らかにするために、肺組織を構成する細胞に特徴的なマーカー遺伝子の発現を検討した。肺構成細胞のマーカーとして、Scgb1a1 (クララ細胞)、Muc5ac (杯細胞)、Foxj1 (線毛細胞)、Cgrp (神経内分泌細胞)、Krt5 (基底細胞)、Pdpn (I型肺胞上皮細胞)、Sftpc (II型肺胞上皮細胞)を使用した。マウス正常肺と遺伝子発現を比較した結果、肺オルガノイドではKrt5、Muc5ac、Foxj1が高発現しており、呼吸部の肺胞上皮細胞よりも気道部の細胞が多く存在していることが示唆された。また、肺腺癌はII型肺胞上皮細胞およびクララ細胞を起源として発生することが報告されている (*Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 4952-4957)ことから、蛍光免疫染色によるタンパク発現を検討した。作成したオルガノイド内腔にはSftpcを発現するII型肺胞上皮細胞が存在し、外側にScgb1a1 (CC10)を発現するクララ細胞およびPdpnを発現するI型肺胞上皮細胞が存在していることが明らかになった。また、これらのタンパクを発現する細胞は異なっており、オルガノイド内に複数の肺構成細胞が別々に存在していることが明らかになった。さらに、肺腺癌の由来となるII型肺胞上皮細胞、クララ細胞が一定数含まれていることから、マウス肺オルガノイドが肺腺癌組織亜型を模倣可能なモデル動物作成に有用であることが示唆された。

Fig. 4 肺細胞マーカータンパク発現解析



5. 主な発表論文等

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。