

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15638

研究課題名(和文)3次元培養を用いた肺癌の発生・浸潤における癌間質の役割及び機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of cancer stroma in the development and invasion of lung cancer using three-dimensional cell culture

研究代表者

森田 茂樹(Morita, Shigeki)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：30707021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌細胞株及び線維芽細胞株を用いて、3次元培養での浸潤モデルの確立を行った。作成された浸潤モデルのホルマリン固定パラフィン包埋検体から標本作成し、免疫組織化学的に線維芽細胞で-SMAやCD10等の cancer associated fibroblast (CAF) 関連遺伝子の発現亢進を確認した。また、in situ hybridizationで、線維芽細胞でのmicroRNA発現の変化も検討した。手術材料のCAF中にcalumeninなどのCAF 関連遺伝子やmiR-21の高発現が見られ、予後不良因子と考えられた。加えて、細胞株での機能解析でも、相互作用や浸潤の促進が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年肺癌の研究では間質の変化が注目されてきているが、本研究では3次元培養(層状培養)の新規手法を確立し、癌周囲の線維芽細胞に見られる因子(-SMA、calumenin等)やmicroRNAの局在、発現の変化を捉えることで、肺腺癌の発生・浸潤過程における間質の役割について新たな知見を加え、補強することになったと考えられる。また、これらの知見は新たな診断マーカーや治療ターゲットにつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established an invasion model of lung cancer and fibroblast cell line using three-dimensional culture. Additionally, we prepared formalin-fixed paraffin-embedded specimens of the invasion model and immunohistochemically confirmed that cancer-associated fibroblast (CAF) -related factors such as -SMA and CD10 were upregulated in fibroblasts. We also examined the changes of microRNA expression in fibroblasts by in situ hybridization.

In the investigation of surgical specimens, high expression of CAF-related factors such as calumenin and miR-21 in CAFs were a poor prognostic factor. In addition, functional analysis using cell lines also suggested that they interact and promote invasion of lung adenocarcinoma.

研究分野：人体病理学

キーワード：肺癌 間質 3次元培養 浸潤 癌関連線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 上皮 (癌細胞) と間質

肺癌の発生、進展では上皮 (癌細胞) の変化に加えて、間質の変化が報告されている。形態学的には肺腺癌では中心部に癌関連線維芽細胞 (Cancer associated fibroblast, CAF) の出現、線維化を伴って、癌の進展、浸潤が見られる。遺伝子発現の変化としては、肺癌間質の線維芽細胞でミスマッチ修復遺伝子の発現上昇、Cox1 や Smad3 の発現低下の変化が認められ、癌の発生・進展に際しては癌間質における遺伝子発現の変化も重要である。また、間質での microRNA 発現異常の報告もあり、エクソソーム等を介した経路による細胞間伝達によって、癌の発生、進展に影響を与えることが想定されているが、癌細胞での報告に比して癌間質での研究は少ない。

### (2) 線維化及び浸潤形態に伴った肺癌の予後

肺腺癌では、中心部の線維化を伴って非浸潤癌から浸潤癌に至るプロセスが知られており、線維化 grading や上皮下の myofibroblast 発現パターンの変化が予後因子として報告されている。肺扁平上皮癌での間質量、間質内への浸潤形態として近年 budding の検討も行われているが、大腸癌等に比して肺癌では予後に有意差が不明瞭なことが多い。肺癌では立体的に腫瘍が浸潤するため、浸潤先端部を評価できていない可能性が考えられ、3次元構築を踏まえての評価方法の工夫が必要と考えられる。

### (3) 3次元培養 (層状培養)

3次元培養は、新規手法として発生や腫瘍などの研究に徐々に用いられるようになってきた。層状培養などの数種類の方法が知られているが、癌の間質について詳細に検討されているものは少ない。微小環境の変化でヒト気管支上皮細胞株の形態が変化するという報告や CAF と癌細胞株を混ぜて培養するとマトリゲル内への浸潤が促進されるとの報告も見られ、3次元培養は間質細胞の遺伝子発現の変化が癌細胞へ与える影響を調べるのには有用な方法と考えられる。

## 2. 研究の目的

肺癌では癌の進展や浸潤に間質が密接にかかわると想定されているが、癌細胞と間質細胞の相互作用の評価に有効な解析手法と考えられる3次元培養を用いて、間質中の CAF で高発現する遺伝子や近年注目されている microRNA の発現と癌の発生や進展との関係について探求する。尚、研究に際しては3次元培養に加えて、*in situ* hybridization (ISH) や免疫組織化学 (immunohistochemistry, IHC) などの組織形態学的手法を主に用いる。具体的には(1)浸潤モデルとしての3次元培養法の確立、(2)癌間質での CAF 関連遺伝子や microRNA の局在やその意義の検討、(3)間質での CAF 関連遺伝子や microRNA の発現と臨床病理学的因子との関係性の解明、を行っていく。

## 3. 研究の方法

### (1) 3次元培養及び標本作成

癌細胞株 (A549, H522, MKN7)、胎児肺線維芽細胞株 (IMR-90 及び MRC-5) に対して、市販の専用のキット CellFeuille (住友ベークライト) を用いて条件検討を行った。具体的には、チャンバースライドのメンブレン上に時間差で重ねて細胞懸濁液を入れていき、培養を行った。細胞の層の厚さの調整については細胞量で調整し、異なった細胞の多層を作成するときはマトリゲルを層と層の間に入れることで、生体内の基底膜と類似させた。メンブレンをはがし、ホルマリン固定パラフィン包埋後に標本作成し、観察した。細胞の種類や層の厚さ (細胞量) やゲルの量や種類等について最適化を行った。

### (2) 3次元培養に対する免疫組織化学的検討 (IHC) 及び microRNA ISH

3次元培養法から作成されたホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) 材料を用いて、サイトケラチン (AE1/AE3)、vimentin、CAF と関連する因子 (-SMA, podoplanin, CD10 等) や Ki-67 (増殖能の評価) に対する免疫組織化学的検索を行った。microRNA ISH については、間質での発現の報告のある microRNA (miR-21, 98, 210 等) 及び先行研究においてマイクロアレイで浸潤部/非浸潤部で有意に差が見られた microRNA (miR-199a) について検討した。また、miR-199a の標的遺伝子である caveolin-1 については、IHC の条件検討を行った。

### (3) 細胞生物学的検討

肺癌細胞株 A549、胎児肺線維芽細胞株 MRC-5 及び IMR-90 を用いた。肺癌細胞株 (A549) の conditioned media (CM) を用いた線維芽細胞株の変化の観察を行った。また、逆に線維芽細胞株に対する microRNA mimic (miR-21) 導入あるいは導入前後の CM を用いた癌細胞の変化も検討した。それぞれ、RNA 抽出、タンパク抽出を施行して microRNA, mRNA 測定、Western blotting 等を施行した。CM を用いた実験では、細胞株の増殖能及び浸潤能の計測も行った。

#### (4) 肺癌手術症例を用いた検討

2005～2008年における東京大学医学部附属病院での肺癌切除検体 91例に対して腺癌の間質の線維化の量や種類についての検討を行った。Scar gradeや浸潤径、Fibrous scar内への腫瘍浸潤、肺癌や他臓器の癌での文献等を参考に腫瘍胞巣周囲の線維増生や腫瘍周囲の線維化の幼若度等も評価した。また、上記症例を含む150例から作成されたtissue microarray (TMA) ブロックを用いて、CAF関連遺伝子(-SMA, calumenin, periostin, podoplanin, perilipin 2) に対する免疫組織化学的検討及びmicroRNA ISHを行った。TMAに用いた症例については、染色の結果と臨床病理学的因子(喫煙歴, 性別, 年齢, 既往症, 予後等)を統計学的に解析した。

#### (5) レーザーマイクロダイセクション、RNA抽出、定量的PCR

miR-21に関しては、肺癌手術例のFFPE検体を用いて、非癌部、癌腫及び癌間質での発現を定量的RT-PCRで検討した。マイクロダイセクション用のスライド(Leica #11505189)作成はRNA-freeの環境で行った。標本の各部位をレーザーマイクロダイセクション装置(LMD7000 system, Leica)で分取し、Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion)を用いてRNAの抽出を行った。7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystem)を用い、抽出したRNAよりmiR-21の発現量を定量した。microRNAの逆転写及びQuantitative RT-PCRに使用する試薬、プライマーはTaqManMicroRNA Assays (Applied Biosystem)を用いた。発現量を標準化するための内因性コントロールとしてsmall RNAの一つであるRUN6Bを測定した。

#### (6) microRNA ISH

肺癌切除検体のFFPE、TMA及び3次元培養から作成した標本に対してExiqon社のmiRCURY LNATM microRNA ISH Optimization Kit (FFPE)(Cat#90009)及び各microRNAに対するmiRCURY LNA Detection probeを用いてmicroRNAのISHを行った。miR-21の陽性シグナル(発現量)の評価は、0(発現なし) 1+(低発現) 2+(中等度) 3+(高発現)の4段階で行った。positive controlとしては定量的RT-PCRでmiR-21が高発現であった症例(3+)を用いた。内因性コントロールとして肺胞マクロファージ(3+)、気管支上皮(0)を参照し、標準化を行った。LNA U6 snRNAプローブで発現が認められなかった症例は検討から除外した。

### 4. 研究成果

#### (1) 3次元培養法の決定及びFFPEブロック作成

癌細胞株(A549, MKN7)、胎児肺線維芽細胞株(IMR-90)に対して、専用のキットCellFeuille(住友ベークライト)を用いて3次元培養を行った。線維芽細胞については、24wellのチャンバースライドで5層( $1.0 \times 10^6$ 個)以上となるように懸濁液を調整し、専用キットによる細胞のコATING作業を行った後、1時間静置、培地交換をして24時間静置した。多層にする場合は、1層目(下層)を作成後にコラーゲンゲル(Cellmatrix(新田ゼラチン))を重ね、15分後にゲルを可能な限り除去後に癌細胞からなる2層目(上層)を同様の手順で作成した。24時間培養後にメンブレンをはがし、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを作成した。コラーゲンゲルを入れない場合、比較的短時間で細胞成分が混在してしまっていた(図1AB)が、間にコラーゲンゲルを挟むことで多層化が可能となった(図1CD)。

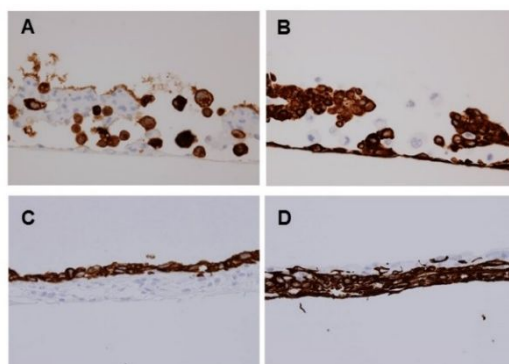


図1 3次元培養条件検討。  
MKN7+IMR90でのFFPE標本に対する免疫染色。AB, コラーゲンゲルなし; CD, ゲルあり。AC, AE1/AE3; BD, vimentin。

#### (2) 3次元培養に対するIHC及びmicroRNA ISH

上記(1)で作成したFFPEブロックから、HE染色標本、IHC及びmicroRNA ISHを行った。サイトケラチン(AE1/AE3)、Vimentinを用いて細胞の分布を確認した。癌細胞株に接する線維芽細胞の一部で-SMAやCD10の陽性像が確認され(図2)相互作用による線維芽細胞の活性化が考えられた。microRNA ISHに関しては、複数のmicroRNAについて検討したが、発現量の多いmiR-21も含めて3次元培養の標本では染色性が弱く、組織標本で検討することとした。尚、3次元培養前のセルブロックを用いた検討では、胃癌細胞株のMKN7でmiR-21の陽性像が見られたため、3次元培養時の処理(細胞のコATING

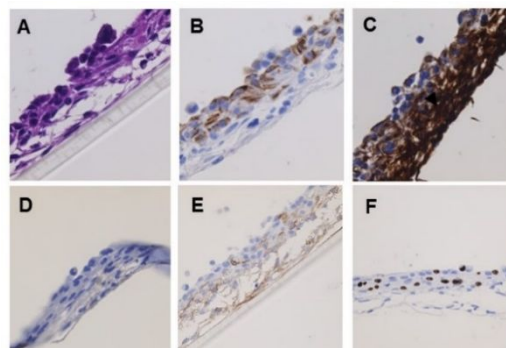


図2 3次元培養FFPE標本(A549+IMR90)  
A. HE染色; B, AE1/AE3; C, vimentin; D, -SMA; E, CD10; F, Ki-67

ング等)による影響が考えられた。

### (3) 細胞生物学的検討

肺癌細胞株 A549 及び胎児肺線維芽細胞株 (IMR-90、MRC-5) を用いて検討した。miR-21 を過剰発現させた線維芽細胞株では、形態変化及び遊走能の亢進 ( $p < 0.01$ ) が見られ、CAF 関連遺伝子である calumenin の発現を増加させることを mRNA 及び、Western blotting で確認した。miR-21 mimic を導入した線維芽細胞株を培養した conditioned media (CM) 中では、肺癌細胞株の増殖能及び浸潤能の亢進が観察された。calumenin を抑制すると肺癌細胞株の増殖能・浸潤能の抑制が認められた。また、肺癌細胞株の CM 中で、肺線維芽細胞株を培養すると TGF- $\beta$  作用時と同様の miR-21 発現亢進及び形態変化が見られた。miR-21 と calumenin は癌細胞及び CAF 中で相互に作用し、肺腺癌の増殖・浸潤を促進していると考えられた。

### (4) 肺癌手術症例を用いた検討

肺腺癌 FFPE 材料での腺癌間質の線維化、浸潤について評価を行った。91 例の平均で、浸潤径(長径)  $21.7 \pm 12.1$ mm、浸潤面積  $230.6 \pm 302.2$ mm<sup>2</sup>、癒痕面積  $110.1 \pm 273.8$ mm<sup>2</sup>であった。既報と同様に Modified scar grade、浸潤径や線維化巣の腫瘍の局在で予後との相関が見られたのに加えて、線維化巣内の腫瘍量、腫瘍胞巣間の間質量でも disease free survival (DFS) で有意差が認められた ( $p=0.034$  及び  $p=0.003$ )。

免疫組織化学的検討では、carcinoma と接する線維芽細胞 (CAF) に  $\alpha$ -SMA に加えて calumenin、periostin、podoplanin、perilipin 2 の陽性像が認められた。また、miR-21 ISH でも、carcinoma 部分だけでなく、CAF に高発現が確認された。CAF 関連蛋白及び miR-21 については上皮・間質ともに浸潤部で非浸潤部に比して

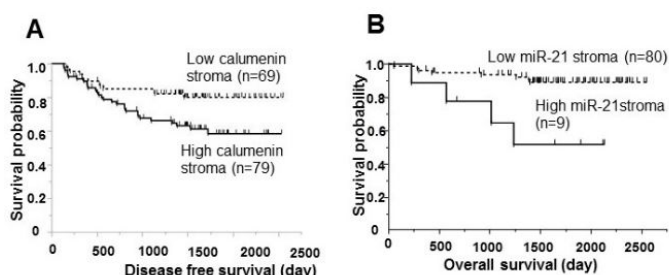


図3 肺腺癌浸潤部間質での calumenin (A) 及び miR-21 (B) 発現と予後

より高い発現が見られる傾向が認められた。Tissue micro array を用いた検討では、間質の calumenin について 4 段階で 0, 1+ を低発現、2+, 3+ を高発現とした場合に DFS に有意差が認められた (図 3A,  $p=0.0149$ )。miR-21 (ISH) は上皮の発現では予後に差がなかったが、間質では 0 ~ 2+ を低発現、3+ を高発現とした場合には、overall survival に有意差が見られた (図 3B,  $p=0.0021$ )。CAF での miR-21 及び calumenin の高発現が肺腺癌の予後不良因子と考えられた。単変量で予後に有意差の見られた臨床病理学的因子との多変量解析でも、間質の miR-21 発現量は予後に有意差が認められた ( $p=0.0158$ )。

### (5) レーザーマイクロダイセクション、RNA 抽出、定量的 PCR

miR-21 に関しては、腺癌手術例の FFPE 検体を用いて、非癌部、癌腫、癌間質での発現を定量的 RT-PCR で検討し、非腫瘍部に比して癌腫・癌間質 (CAF) では miR-21 の発現亢進が認められた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyata Morita Kana, Morita Shigeki, Matsutani Noriyuki, Kondo Fukuo, Soejima Yurie, Sawabe Motoji	4. 巻 69
2. 論文標題 Frequent appearance of club cell (Clara cell) like cells as a histological marker for ALK positive lung adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 688 ~ 696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12864	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Terada Yuriko, Takahashi Tsuyoshi, Morita Shigeki, Kashiwabara Kosuke, Nagayama Kazuhiro, Nitadori Jun-Ichi, Anraku Masaki, Sato Masaaki, Shinozaki-Ushiku Aya, Nakajima Jun	4. 巻 29
2. 論文標題 Spread through air spaces is an independent predictor of recurrence in stage III (N2) lung adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 442 ~ 448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/icvts/ivz116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watabe Shiori, Kikuchi Yoshinao, Morita Shigeki, Komura Daisuke, Numakura Satoe, Kumagai Togashi Arisa, Watanabe Masato, Matsutani Noriyuki, Kawamura Masafumi, Yasuda Masanori, Uozaki Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Clinicopathological significance of microRNA 21 in extracellular vesicles of pleural lavage fluid of lung adenocarcinoma and its functions inducing the mesothelial to mesenchymal transition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 2879 ~ 2890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.2928	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kunita Akiko, Morita Shigeki, Irisa Tomoko U., Goto Akiteru, Niki Toshiro, Takai Daiya, Nakajima Jun, Fukayama Masashi	4. 巻 8
2. 論文標題 MicroRNA-21 in cancer-associated fibroblasts supports?lung adenocarcinoma progression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8838-8838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-27128-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsutani Noriyuki, Sawabata Noriyoshi, Yamaguchi Masafumi, Woo Tetsukan, Kudo Yujin, Kawase Akikazu, Shiono Satoshi, Iinuma Hisae, Morita Shigeki, Kawamura Masafumi	4. 巻 9
2. 論文標題 Does lung cancer surgery cause circulating tumor cells??A multicenter, prospective study	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Disease	6. 最初と最後の頁 2419 ~ 2426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jtd.2017.07.33	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮田佳奈, 森田茂樹, 近藤福雄, 副島友莉恵, 沢辺元司
2. 発表標題 ALK融合遺伝子陽性肺癌におけるapocrine secreting cellの検討
3. 学会等名 第65回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮田佳奈, 森田茂樹, 向山淳児, 赤嶺亮, 石井美樹子, 斉藤光次, 笹島ゆう子, 近藤福雄
2. 発表標題 肺腫瘍の術中迅速組織診における捺印細胞診併用の有用性についての検討
3. 学会等名 第60回 日本臨床細胞学会総会（春期大会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡部朱織, 菊地良直, 森田茂樹, 河村大輔, 沼倉里枝, 渡邊雅人, 松谷哲行, 川村雅文, 安田政実, 宇崎崎宏
2. 発表標題 肺癌における胸腔洗浄液中の細胞外分泌小胞内miR-21の臨床病理学的意義と機能
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内直子, 国田朱子, 森田茂樹, 日向宗利, 牛久綾, 深山正久
2. 発表標題 肺癌における肥満細胞浸潤に関する臨床病理学的検討
3. 学会等名 第108回 日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡部朱織, 菊地良直, 森田茂樹, 富樫有紗, 渡邊雅人, 松谷哲行, 川村雅文, 安田政実, 宇於崎宏
2. 発表標題 肺腺癌組織および術前胸腔洗浄液中細胞外分泌小胞に含まれるmiR-21の発現は胸膜浸潤と相関する
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡部朱織, 菊地良直, 森田茂樹, 富樫有紗, 渡邊雅人, 松谷哲行, 川村雅文, 安田政実, 宇於崎宏
2. 発表標題 肺癌胸腔洗浄液中のエクソソーム内miR-21発現量は細胞診判定と胸膜浸潤を反映する
3. 学会等名 第57回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田茂樹, 古谷弦太, 安藤純世, 森正也
2. 発表標題 IL-6, G-CSF 産生肺癌の一部検例
3. 学会等名 第75回日本病理学会関東支部学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----