

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16615

研究課題名（和文）肺癌細胞におけるdormancyのモデル化と分子機構の解明

研究課題名（英文）Creation of in vivo dormant human lung adenocarcinoma model

研究代表者

柴野 智毅 (Shibano, Tomoki)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：10648900

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）：近年肺癌の予後改善に伴い術後遠隔期の転移や再発に遭遇する機会が増えてきている。兼ねてより予後の良い癌腫ではがん細胞が体内で休眠状態となる現象（dormancy）が問題視されてきたが、肺癌ではdormancyは証明されていなかった。我々は様々なヒト肺腺癌細胞の全身転移モデルを作成する中で、肺癌においてもdormancyのモデルとなる細胞を特定しdormancyモデルの作成することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌のdormancyに関する研究は今後の肺がん患者の予後改善のためには必要不可欠であるが、進行の早い肺癌では適切なdormancyモデルは存在しない。本研究により得られたヒト肺癌細胞dormancyモデルを今後さらに解析し、確立することで肺がん研究のさらなる発展に繋がると考えている。

研究成果の概要（英文）：Since prognosis of lung cancer has improved in the past few decades, the opportunity to encounter late recurrence has also increased. Dormancy, a phenomenon that cancers achieve resistant to treatment and sleeps inside the body for few years had been frequently discussed in cancers with slow progression; ie. breast cancers or prostatic cancers, but not for lung cancers. In this study, we discovered that some human adenocarcinoma cell lines express dormant characteristics in vivo and in vitro, suggesting dormancy may also exist in lung cancers.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 転移 微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌は予後の悪い癌腫の一つであり、国内での罹患数は年々増加している。肺癌は手術単独では治療効果が不十分なことが多く化学療法が重要な役割を果たしている。近年様々な分子標的薬の開発や検診の普及に伴う早期発見率の向上によりその予後は延長してきているが、化学療法で根治を目指せるまでには達していない。特に近年 Adenocarcinoma in situ や Bronchoalveolar carcinoma など予後の良い肺癌に遭遇する頻度が増えている一方、治療後 5 年以上の無再発期間の後に突然転移や再発を認める症例に遭遇する機会も増えてきた[1-3]。このような現象は兼ねてから乳癌や前立腺癌など予後の比較的良い癌腫で問題視されており、Dormancy (休眠) と呼ばれている[4]。Dormancy 中の癌細胞は増殖や転移能が著しく低下する一方、薬剤感受性も低下するため、長期間体内に癌細胞が潜伏可能となるが、数年の後に増殖能を再度獲得し再活動を始める。

我々が所属している研究室では、これまで肺腺癌の細胞 40 株の遺伝子変異、遺伝子発現、薬剤感受性、形態などを肺癌組織と合わせて解析してきた(Nakamura, Niki et al. Cancer Sci 2008; Matsubara, Niki et al. J Thorac Oncol 2010; Matsubara, Niki et al. Am J Pathol, 2010; Matsubara, Niki et al. J Thoracic Oncol 2012; Matsubara, Niki et al. Cancer Sci, in press)。この 40 株のドライバー変異は、KRAS (n=11), EGFR (n=5), MET (n=3), HER2 (n=2), BRAF (n=2), EML4-ALK (n=1), Others (n=16) である。さらに上記 40 株の細胞株を低接着性の培養皿上で長期培養 (2 ヶ月以上) することで、親株とは異なる性質を獲得する細胞を作成し転移モデルの作成を行ってきた。接着培地から低接着培地に移植した細胞の細胞数は一気に減少するが、いずれ定常状態に達し、その後数週間~数ヶ月後に再増殖を始める。再増殖までにかかる期間は細胞株により異なり、A549 は数週間と早い、LC-2/ad や H2009 などでは 2 ヶ月以上経過しても再増殖を認めなかった (図 1)。後者の細胞株は浮遊環境下においては増殖能が停止し dormancy となっている可能性が考えられた。これらの背景から我々は肺癌においても dormancy が存在すると考え本研究を立案した。

図 1

A549 と LC-2/ad および H2009 の浮遊状態での細胞数の変化



2. 研究の目的

肺癌は近年、画像診断の進歩や分子標的薬の開発により長期生存が得られるようになってきたが、未だ根治を得られるまでには至っていない。特に、予後の改善に伴い治療後 5 年以上の無再発期間の後に突然転移や再発を認める症例に遭遇する機会が増えてきた[1-3]。兼ねてより乳癌のような予後の良い癌種ではこのような現象 (Dormancy) が問題視されているが、未だにその全容は解明されておらず、また肺癌での dormancy は証明されていない[4]。申請者は今までの当教室の研究成果から肺癌でも dormancy は存在すると考えている。本研究で肺癌の dormancy を証明し、dormancy 及び休眠中の細胞の再増殖に関わる因子の特定を目指す。

3. 研究の方法

in vivo における転移モデルの作成

ヒト肺腺癌細胞株である A549, H441, H2009, LC-2/ad, H2228 に D-Luciferin を添加した細胞株を用いる。2.5x10⁵/200 μL の濃度で NOD/SCID マウスの左心室内にエコーガイド下に移植し IVIS で生体モニタリングを行う。移植後 8 週目で屠殺解剖し組織学的検証を行う。

in vitro における dormancy モデルの作成と解析

接着プレートにて培養した肺がん細胞を特殊なハイドロゲルにてコーティングされた超低接着表面プレート (Corning®) に移植し数ヶ月培養し浮遊 (FL) 細胞株を作成する。作成した浮遊細胞を用いて細胞の再増殖などに関与する分子機構を解析する。

4. 研究成果

in vivo における dormancy モデルの作成

A549, H441, H2009, LC-2/ad, H2228 をそれぞれマウスの左心室に移植し転移モデルを作成した。A549 および H441 は多臓器への転移を認めたものの、H2009, LC-2/ad, H2228 は IVIS にて検出可能な転移はみられなかった (図 2)。後者の細胞を移植したマウスの組織標本を確認すると、ごく少数の細胞により形成された転移巣を僅かに確認することができた (図 3)。これらが微小転移のモデルになり得ると考えられた。

図2 高転移モデルおよび低転移モデルの IVIS 画像。低転移株では IVIS で転移巣が確認できない。

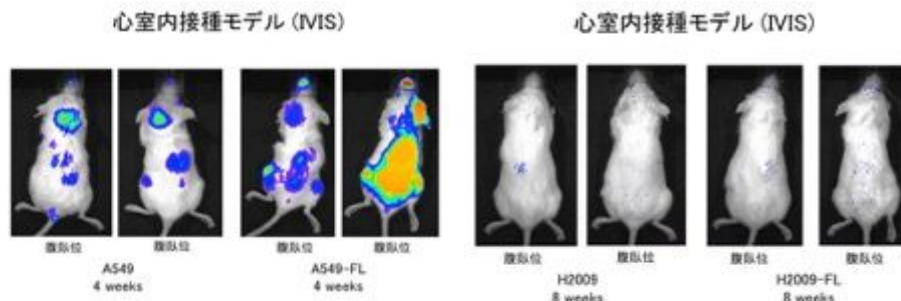
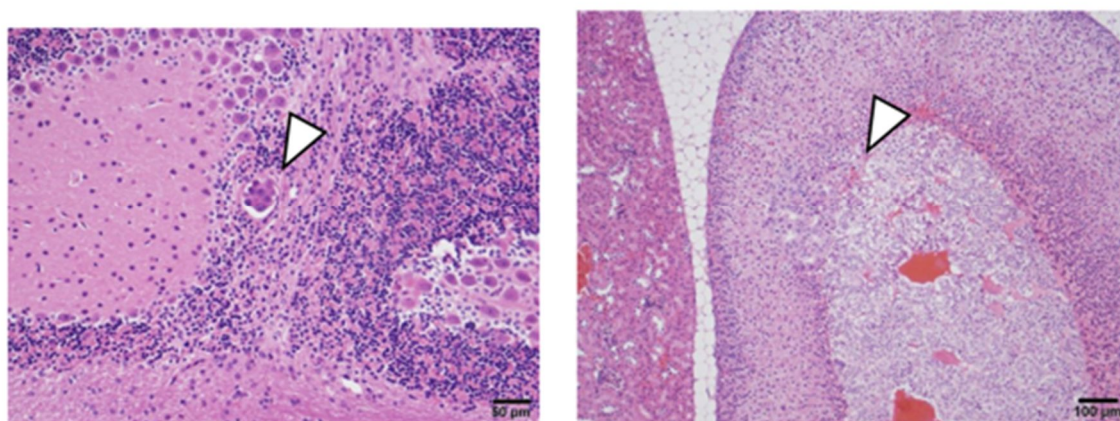


図3 LC-2/ad をマウスの左心室へ移植後 8 週で sacrifice。IVIS では検出できないものの、脳 (左) や 副腎 (右) への微小転移を認める。



in vitro における dormancy モデルの作成と解析

当教室ではこれまで浮遊細胞を用いた実験も行ってきた。肺がん細胞は低接着プレートに移植した直後は細胞数が一気に減少するが、いずれ定常状態に達し、数ヶ月後に再増殖し従来の接着細胞に比べ高い増殖能や転移能力を獲得する [Nakano T. et al, Plos One 2017.]. 左心室に移植し体内を浮遊・循環しているがん細胞にも同様の変化が起きていると予想される。細胞数の再増殖までにかかる期間は細胞により異なり、高転移株では再増殖までの期間が短く、低転移株では長く 2 ヶ月以上経過しても再増殖を認めない。これらの結果から、がん細胞は浮遊環境の初期段階においては何かしらの抑制因子により増殖が抑制され dormancy の状態になっている可能性が考えられた (図 1)。

接着細胞と長期浮遊細胞を比較検証したところ、肺がん細胞は低接着プレートに移植した直後は p27 の発現が亢進するものの、長期的に浮遊環境下に置くと p27 の発現が減弱することがわかった。また細胞増殖シグナルである EGFR や Met のリン酸化は増殖が停止している間は発現が低下していることが判明した。このことから、浮遊細胞の増殖能の一時的な低下や再活性化には p27 や EGFR、Met などが制御因子として関わっている可能性が示唆された。

また、さらに増殖能に関わる代謝経路を特定する目的で浮遊細胞系を 5 つのポイント (接着細胞、浮遊後 24 時間、浮遊後 1 週間、長期浮遊細胞、浮遊細胞の再接着) に分け、それぞれの時点での metabolome 解析および mRNA profiling データを取得し現在解析中である。

< 引用文献 >

1. Ishida, J., et al., [Recurrence of Anaplastic Lymphoma Kinase Positive Lung Cancer Nineteen-year after the Primary Surgery]. *Kyobu Geka*, 2015. 68(10): p. 832-5.
2. Wong, D.R. and H.J. Henteleff, Ten-year follow-up of a province-wide cohort of surgical lung cancer patients in Nova Scotia. *Can J Surg*, 2008. 51(4): p. 257-62.
3. Matsuoka, H., et al., [Small size lung adenocarcinoma with rocal recurrence and port site recurrence 56 months after partial resection]. *Kyobu Geka*, 2011. 64(13): p. 1154-7.
4. Yeh, A.C. and S. Ramaswamy, Mechanisms of Cancer Cell Dormancy--Another Hallmark of Cancer? *Cancer Res*, 2015. 75(23): p. 5014-22.
5. Casimiro, S., et al., Molecular Mechanisms of Bone Metastasis: Which Targets Came from the Bench to the Bedside? *Int J Mol Sci*, 2016. 17(9)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nakano Tomoyuki, Kanai Yoshihiko, Amano Yusuke, Yoshimoto Taichiro, Matsubara Daisuke, Shibano Tomoki, Tamura Tomoko, Oguni Sachiko, Katashiba Shizuka, Ito Takeshi, Murakami Yoshinori, Fukayama Masashi, Murakami Takashi, Endo Shunsuke, Niki Toshio	4. 巻 12
2. 論文標題 Establishment of highly metastatic KRAS mutant lung cancer cell sublines in long-term three-dimensional low attachment cultures	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0181342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181342	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomoki Shibano
2. 発表標題 Long-term, 3-dimentional spheroid culture: a putative model to study evolution of detached cancer cells in tumor metastasis.
3. 学会等名 Metastasis Research Society 17th Biennal Congress（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴野 智毅
2. 発表標題 低接着培養下における肺癌細胞のシグナル伝達と細胞周期制御分子の解析
3. 学会等名 第26回日本がん転移学会学術集会・総会
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