

機関番号：24701
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2010
 課題番号：19591644
 研究課題名（和文） ヒト非小細胞肺癌副腎転移の分子機構の解析
 研究課題名（英文） Analysis for the molecular mechanism of lung cancer adrenal metastasis
 研究代表者
 尾浦 正二（OURA SHOJI）
 和歌山県立医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：10194060

研究成果の概要（和文）：

非小細胞肺癌の副腎転移の動物実験系を確立し、肺癌副腎転移の臓器特異性発現機構の解析を行うことを目的とした。ヒト非小細胞肺癌細胞株をヌードマウスの副腎組織片上で継代培養し、高副腎転移株を得た。マイクロアレイ解析を用いて高副腎転移株と original の細胞株の遺伝子発現の変化を検討したところ、8 遺伝子の発現増加と 2 遺伝子の発現低下を確認した。副腎転移を規定する分子機構として、これらの遺伝子産物の変化が候補として考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the organotropism of non-small cell lung cancer (NSCLC) adrenal metastasis. Highly metastatic NSCLC cell line to adrenal gland was established after culture on athymic mouse adrenal tissue specimens. Results of microarray analysis revealed the increased expression in 8 genes and decreased expression in 2 genes in highly adrenal metastatic cells. These alterations might be associated with the organotropism in NSCLC adrenal metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：呼吸器外科学

1. 研究開始当初の背景

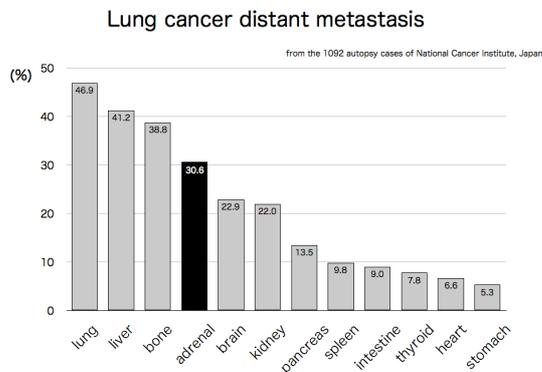
癌治療を行う上で、個々の症例で転移がどこに生じるか予見することは重要な問題である。癌の転移しやすさの指標となる因子は多数知られているが、それだけでは転移がどこに生じるかを予見することはできない。

転移先の臓器は、癌細胞にとって原発巣と

は異なった細胞外環境を持ち、これに適した癌細胞だけが転移巣を形成し得ると考えられる。これは seed and soil theory と呼ばれている。我々は以前より、癌転移の臓器特異性の分子機構についての研究を行ってきた。最近では、ヒト肺癌の培養細胞株を用いた肺癌脳転移の動物実験系を開発し、それを用い

て、脳組織に豊富に存在する細胞外基質である laminin と肺癌細胞において高頻度に高発現を示す integrin alpha 3 beta 1 の関与が、肺癌脳転移の形成に重要であることを示し、報告した。(Yoshimasu T, Oura S, et al. Increased expression of integrin alpha 3 beta 1 in highly brain metastatic subclone of a human non-small cell lung cancer cell line. Cancer Sci. 2004;95:142-8.)

肺癌は多くの臓器に転移を来す腫瘍であり、肺、骨、肝、副腎、脳など多くの臓器に転移を示す。副腎は、4番目に転移の好発する臓器で、下図に示す剖検例の集計報告では30.6%に転移が見られる。副腎は重要な機能を有する臓器であるにもかかわらず、臓器のsizeが小さいため、副腎転移では、比較的早期に機能低下に陥りやすく、予後不良である。



この図に示されているように、副腎を除けば、肺癌の臓器転移の頻度は解剖学的に組織の体積または血流量の多い順に高くなっている。肺、肝、骨など組織量の多い臓器に転移が好発することは、その臓器に癌細胞が到達する確率が高いためであろうと推測される。しかし、sizeの小さい副腎で肺癌において転移の発生頻度の高いことは、これでは説明できない。すなわち、解剖学的因子とは異なる seed and soil theory で説明されるべき何らかの臓器特異性の機序が存在するものと考えられる。

副腎転移は予後不良な病態であり、治療法の進歩のためにも、その臓器特異性の分子機構の解明が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、動物実験および in vitro の解析系を用いて、肺癌において副腎転移の形成を規定する分子生物学的機序を解明することである。

これまでに、実験動物を用いた既存の肺癌副腎転移の実験系で確立したものは存在しなかった。そのため本研究は、次に述べる2段階の目標が設定された。

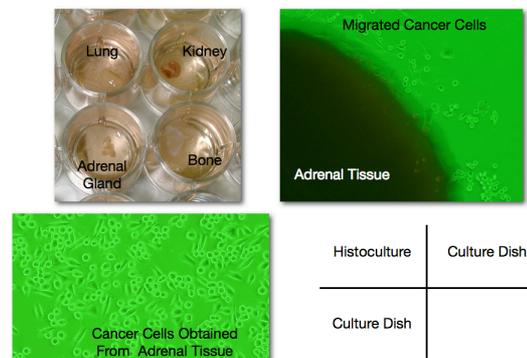
- ① ヒト肺癌の培養細胞株とヌードマウスを用い、肺癌の副腎転移の動物実験モデルを確立すること。
- ② 作成された高副腎転移株と original の細胞株の細胞性状の評価を行い、肺癌の副腎転移における臓器特異性を決定する分子機構の検索を行うこと。

3. 研究の方法

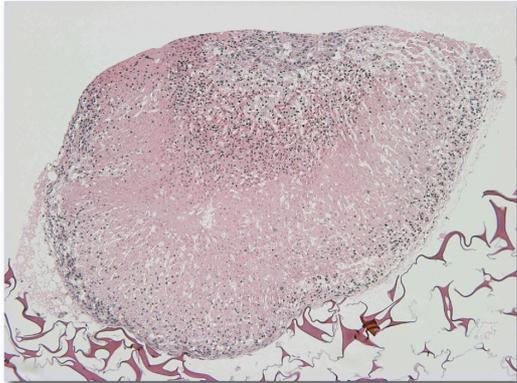
当初、NSCLC の cell line をヌードマウスに直接投与する方法を行ったが、副腎転移の形成率が低いため、副腎転移の再現性に乏しく、in vitroでの継代が困難であった。そこで、それまでの検討で副腎転移を起こし得ることが確認された細胞株を用いて、組織培養法を応用した in vitroでの transplantation の実験系を考案し、これを実験に用いた。

- ① ヌードマウス (Balb/c-nu/nu) の副腎を摘出し、約 1mm 厚の slice とした。
- ② 非小細胞肺癌の培養細胞株 PC-14 を single cell suspension とし、副腎の剖面上に接着させた後、コラーゲンゲル上に乗せて 37°C、5% CO₂ の条件で 7 日間培養した。培養液は RPMI-1640+10% ウシ胎児血清を用いた。
- ③ 組織培養終了後、副腎組織と接着した PC-14 細胞をともに通常の培養系に戻し、生存し得た PC-14 を回収した。
- ④ 7 日間の組織培養後、副腎組織を十分に洗浄した後、通常の培養系に戻し、組織上に接着して生存し得た PC-14 細胞を回収した。
- ⑤ control として、肺、肝、腎、骨、筋を用いて同様の培養操作を行い、それぞれの臓器由来 PC-14 細胞を回収した。

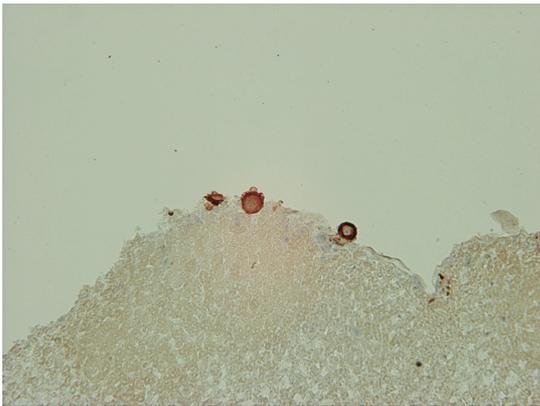
下図の写真で、左上は、組織培養中の臓器で、右上は副腎組織を通常の培養系に戻したところである。組織剖面上に生着していた PC-14 cell がフラスコ底面へ遊走してきている。左下は回収された培養細胞で、これが副腎転移を simulate した細胞と考えられる。



H. E. 染色では、下図のごとく、1 週間の培養では、副腎の細胞構築が正常に保たれていることが確認された。



また、下の写真は、副腎剖面上に生着した PC-14 細胞のヒトサイトケラチン (AE1/AE3) の免疫組織染色像である。



この実験系を用い、PC-14 を副腎組織上で 5 継代して得られた細胞株を PC-14/adrenal とした。

得られた細胞は、細胞外基質への反応性を調べるとともに、遺伝子発現の変化をマイクロアレイ解析にて比較した。

4. 研究成果

- ① PC-14 細胞は、副腎および、肺、腎、筋、骨では 5 継代が可能であり、細胞を回収することができた。肝組織片上では初回の組織培養では細胞を回収できたが、2 継代以降は培養が不可能であった。これは、複数回の追加実験でも再現性があったため、PC-14 細胞は、肝組織上では長期生存が不可能であると判断される。
- ② PC-14/adrenal を、ヌードマウスの左心腔内に移植したところ、40%の頻度で副腎転移を形成することが確認された。

Original の PC-14 細胞では、同一条件では、稀にしか副腎転移を形成しないので、転移能が増強していることが確認された。

- ③ これらの細胞株において、細胞外基質との接着アッセイを行ったところ、下図のごとく、fibronectin と vitronectin に対しては全ての臓器に共通して接着性の低下が見られた。laminin と collagen に関しては、臓器により接着性の変化の傾向が異なっていた。

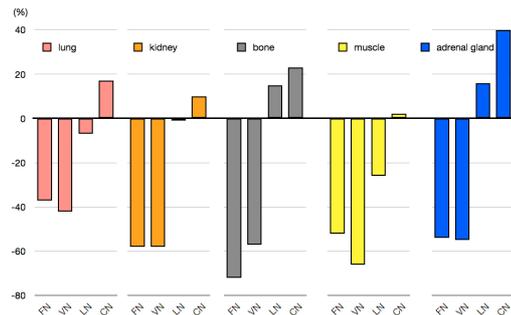


図1. 細胞外基質への反応性の変化
グラフの縦軸は、original と比較した場合の接着細胞数の変化率を示す。
FN: fibronectin, VN: vitronectin, LN: laminin, CN: collagen

Fibronectin と vitronectin については、in vivo の癌転移モデルにおいては一般的に反応性が増強することが知られている。本実験系では、逆に低下していることより、副腎転移の転移能の増強には、細胞外基質との反応性の増強が関与していない可能性が考えられた。そこで、関与因子を同定するための探索的方法として、マイクロアレイ解析を施行した。

- ④ Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0ST Array (遺伝子数 28,869 個) を用いてマイクロアレイ解析を行い、original の PC-14 と PC-14/adrenal の遺伝子発現の変化を比較した。さらに、control として、肺、腎、筋、骨から得られた PC-14 細胞についてもマイクロアレイ解析を行った。
解析の結果、PC-14/adrenal においては、PC-14/original に比し、6 種の smRNA, DUSP1 などの計 18 遺伝子の発現増加を確認した。これらの遺伝子は、接着分子に関連するものは少なく、副腎転移形成における臓器特異性の決定に、接着分子が重要な働きをしている可能性は低いと考えられた。また、明らかな発現低下は 2 遺伝子であった。他臓器由来の subclone の遺伝子発現の変動と比較す

ると、PC-14/adrenal での発現変動遺伝子数は少なかった。また、PC-14/adrenal と他臓器由来 subclone の間で共通する発現変動遺伝子は DUSP1 の増強であった。これは、ストレス環境下における細胞の生存に関与する遺伝子であり、本実験系の実験条件に依存する変化と考えられた。

DUSP1 以外の遺伝子変動は副腎転移において特徴的であった。そのうち、肺癌の予後因子として報告されている既知の遺伝子としては、CALB1 が合致していた。副腎転移を規定する分子機構の一つとして、この CALB1 遺伝子産物の変化が一つの候補として考えられる。今後、得られた候補遺伝子について、一つずつ検証していく必要があると考えられる。

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)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 吉増達也, 尾浦正二, 太田文典, 中村理恵, 平井慶充, 内藤古真, 遠藤春香, 橋本沙代子, 川後光正, 岡村吉隆: 組織培養法を用いた肺癌転移先臓器特異性決定遺伝子群の検索. 第 63 回日本胸部外科学会定期学術集会. 2010. 10. 24-27, 大阪.
- ② 吉増達也, 尾浦正二, 中村理恵, 平井慶充, 内藤古真, 清井めぐみ, 宮坂美和子, 岡村吉隆. 肺癌転移における臓器特異性決定機構の解析. 第 22 回 Young Oncologist Conference. 2010. 1. 29, 和歌山
- ③ 吉増達也, 尾浦正二, 玉置剛司, 太田文典, 平井慶充, 内藤古真, 宮坂美和子, 川後光正, 岡村吉隆: 非小細胞肺癌 in vitro 多臓器転移モデルにおける臓器親和性の検討. 第 109 回日本外科学会定期学術集会. 2009. 4. 2-4, 福岡
- ④ 吉増達也, 尾浦正二, 玉置剛司, 太田文典, 中村理恵, 清水幸生, 内藤古真, 清井めぐみ, 平井慶充, 川後光正, 岡村吉隆: 組織培養法を用いた非小細胞肺癌副腎転移モデルの開発. 第 108 回日本外科学会学術総会. 2008. 5. 15-17, 長崎
- ⑤ 吉増達也, 尾浦正二, 玉置剛司, 太田文典, 中村理恵, 清水幸生, 内藤古真, 清井めぐみ, 平井慶充, 川後光正, 岡村吉

隆: 組織培養法を用いた in vitro 多臓器転移モデルにおける抗癌剤耐性発現の検討. 第 60 回日本胸部外科学会定期学術集会, 2007. 10. 17-20, 仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾浦 正二 (OURA SHOJI)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 10194060

(2) 研究分担者

平井 慶充 (HIRAI YOSHIMITSU)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号: 10508013