

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09312

研究課題名(和文) 新規肺腺がん細胞株を用いた肺がん浸潤・転移機構の解析と治療薬開発への応用

研究課題名(英文) Analysis of invasion and metastasis mechanisms of lung adenocarcinomas and its application to novel therapeutics using an established 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：微小乳頭状を呈する肺腺癌(Micropapillary lung adenocarcinoma: MPA)は、転移しやすく予後不良である。そのメカニズムを解明するために、申請者らが樹立したMPAの原発巣組織に由来する細胞株(KU-Lu-MPPt3)を用いて、分子学的特徴の解析を行った。その結果、MPAにおける癌の転移・浸潤に係る候補遺伝子をいくつか挙げることが出来、その中から細胞接着に関与する分子について、その阻害薬がMPAに対する新たな治療戦略となる可能性があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでMPAに係る研究は臨床情報や病理検体を用いることでしか成し得なかったが、我々が樹立した細胞株(KU-Lu-MPPt3)を用いることで、MPAの分子レベルでの解析が可能となった。MPAの組織学的特徴とKU-Lu-MPPt3細胞株の特徴の類似点から、微小乳頭成分と予後不良の因果関係を探求することで、MPAに対する新規治療法開発にも貢献できる可能性が高く、社会的貢献度が高い。

研究成果の概要(英文)：Micropapillary lung adenocarcinoma (MPA) shows more invasiveness and poorer prognosis than papillary adenocarcinomas without an MPA pattern. To clarify the mechanism, we investigated the molecular features in a cell line (KU-Lu-MPPt3) established from the MPA tissue. We identified some genes associated with cancer metastasis and invasion, and we found that inhibitors of molecules involved in cell adhesion may be useful therapeutic agents for the treatment of MPA.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 腺癌 微小乳頭状 細胞株 転移 浸潤 細胞接着

1. 研究開始当初の背景

癌の死因の第1位である肺癌は、大きく4つの組織型に分類され、それぞれ予後や治療方針が異なる。最も発生頻度の高い組織型は腺癌で、さらに腺癌はその組織形態によって亜型分類される。この亜型の中で、微小乳頭状を呈する肺腺癌(Micropapillary Lung Adenocarcinoma: MPA)は早期であっても転移しやすく、他の腺癌亜型と比べて予後不良である(Am J Surg Pathol.2003)。MPAの病理学的特徴は、肺腔内に浮かぶように存在する数個の細胞で構成された小花冠状やリング状管腔構造をとる細胞集塊の存在である(図1のHE染色画像)。この存在が予後不良因子であるとの報告は散見されるものの、実際に微小乳頭成分の細胞がどのように予後不良と関連するのか、その機序は解明されておらず、最適な治療法もないのが現状である。そのため、微小乳頭成分の独自の増殖、浸潤能を解析し、それらを規定する分子を同定することが治療戦略の鍵になると考えられる。

申請者はこれらの解析を進めるために「基盤研究(C) 16K10689 新規肺腺がん細胞株を用いたがん浸潤・転移機構の解析(平成28年度~30年度)」において、MPAの腫瘍組織に由来する細胞株(KU-Lu-MPPT3)を世界で初めて樹立し、この細胞株がMPAの組織形態を反映していることを報告した(Cancer Res Clin Oncol.2018)。この細胞株の樹立により、これまで成し得なかったMPAの分子生物学的な解析が可能となった。

樹立された数々の肺腺癌細胞株のほとんどが付着の培養形態を取る中で、KU-Lu-MPPT3細胞株は、付着細胞と房状に集塊形成した浮遊細胞が混在するという稀有な特徴を持っている。申請者はこの「小さな房状に集塊形成した浮遊細胞」とMPA腫瘍組織の微小乳頭成分の形態的および分子学的特徴が類似していることから、この浮遊細胞こそがMPAの予後不良をもたらすと考え、混在していた浮遊(SUS)細胞と付着(AD)細胞の単離培養を行った(図1)。

これらの研究材料を用いて、まずはSUS細胞とAD細胞の両者の遺伝子発現の差異を検査するためにDNAマイクロアレイによる網羅解析を行った。その結果、AD細胞とSUS細胞間で2倍以上発現比率の異なる遺伝子を8054個同定し、その中から癌幹細胞性、転移能、増殖能、腫瘍抑制に関連する遺伝子を選び出して解析を進めていた。本研究課題において、新たに遺伝子を選出し、MPAの予後を司る原因遺伝子を突き止めるための研究計画を作成した。

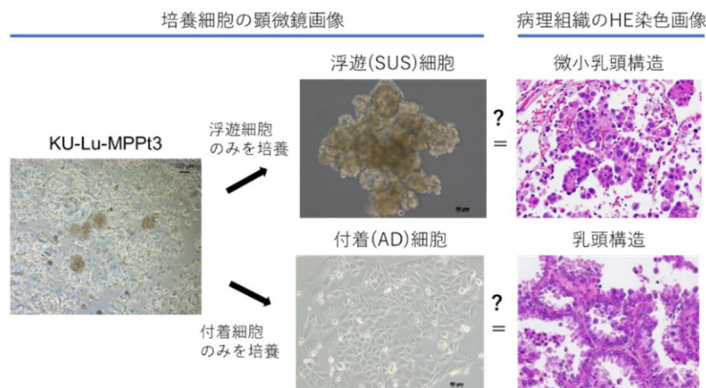


図1. 樹立したKU-Lu-MPPT3細胞株と単離した浮遊(SUS)細胞と付着(AD)細胞と樹立元となる腫瘍組織の病理像(HE染色)

2. 研究の目的

近年の肺癌治療の発展は目覚ましく、上皮成長因子受容体(EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor)チロシンキナーゼ阻害薬やALK(Anaplastic Lymphoma Kinase)阻害剤をはじめとする分子標的治療薬は、肺癌治療の発展に大きく貢献している。分子標的治療薬がもたらす治療成績の向上から見ても、肺癌における上記のようなドライバー遺伝子の発見が治療法開発の要になることは明白である。しかし、申請者がMPA細胞株の樹立に成功するまで、MPA研究は臨床情報とホルマリン固定パラフィン包埋等の病理標本を用いたものに留まらざるを得ず、少なくともこういった材料不足がMPA研究を遅滞させた要因であったと言える。

本研究課題に先立って実施したDNAマイクロアレイの結果から、AD細胞とSUS細胞間で2倍以上発現比率の異なる遺伝子群より、癌幹細胞性、転移能、増殖能、腫瘍抑制に関連する候補遺伝子を選出し、それぞれについてエンドポイントPCRを実施して、発現量の確認を行った。その結果、CD36, AQP1, ST6GALNAC1, SHOX2, DFNA5, HOPX, UCHL1, Ror1の遺伝子を解析対象に絞り込んだ。本研究課題では、これらの遺伝子についてKU-Lu-MPPT3細胞株における機能解析を行う。MPAの腫瘍組織に由来したKU-Lu-MPPT3細胞株を用いることで、生きた細胞を用いた解析はもちろんのこと、MPA以外の腺癌細胞株との比較も可能なため、MPA細胞株独自のシグナル伝達機構の探索が可能である。特に同一の腫瘍組織に由来しながら、2つの培養形態を示すAD細胞とSUS細胞を比較することで、MPAの微小乳頭成分に特徴づけられる予後不良の病態機序を解明し、新規のMPA治療法に繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

AD細胞とSUS細胞間で比較したDNAマイクロアレイの解析結果から、細胞間で差異のある遺伝子のうち、癌幹細胞性、転移能、増殖能、腫瘍抑制に関連する遺伝子を選出する。これらの遺伝子の発現調節を行うことでKU-Lu-MPPT3細胞株の浮遊細胞もしくは付着細胞の機能変動を解析し、鍵となる分子を探索する。

(1) 発現量に差異のある遺伝子に関するタンパク発現の確認

エンドポイント PCR による発現量の確認を行った遺伝子について、AD 細胞と SUS 細胞のセルブロックを用いた免疫細胞化学染色と KU-Lu-MPPt3 細胞株の樹立元となった腫瘍組織を用いた免疫細胞化学染色を行い、腫瘍細胞と腫瘍組織におけるタンパクレベルでの発現の有無を確認する。

(2) 遺伝子導入による発現変動解析

(1) でタンパク発現の差を確認出来た遺伝子について、PCR クローニング法によりプラスミドを作製し、カチオン性脂質媒介性トランスフェクション試薬を用いて KU-Lu-MPPt3 細胞に遺伝子導入し、一過性の強制発現をさせる。反対に、siRNA を遺伝子導入して一過性の発現抑制をさせる。遺伝子導入を行った細胞から RNA とタンパクを抽出し、エンドポイント PCR とウェスタン・ブロッティング法による強制発現または発現抑制の有無を確認した後、他の候補遺伝子について発現量に変動があるか否かをエンドポイント PCR またはリアルタイム PCR で解析する。一過性の強制発現で評価できない場合は、DNA ベクターを用いた安定トランスフェクションを実施し、安定発現細胞株を作製した後に候補遺伝子の発現量に変動があるか否かを確認する。

(3) 細胞増殖能および浸潤能の解析

AD 細胞と SUS 細胞の増殖能の違いを軟寒天コロニー形成アッセイによる足場非依存性の増殖能を測定する。また、コラーゲンコートディッシュに播種した細胞の増殖能を、発色基質の WST-8 を用いた細胞増殖アッセイにより足場依存性の増殖能を測定する。浸潤能についても WST-8 を用いて測定する。

(4) MPA 動物モデルの作製

生体内における KU-Lu-MPPt3 細胞の動態を解析するために免疫不全マウスに KU-Lu-MPPt3 細胞を移植して MPA 動物モデルを作製する。本研究課題に先立ち、尾静脈投与と肺実質に直接注入移植する 2 つの方法を試みた。しかし、静脈塞栓や気胸により施術時に死亡する例が多く、肺実質への直接投与による生着成功例のマウスについても肺内あるいはリンパ節転移は認められなかった。そこで本研究課題では、気管切開後に留置針を用いて KU-Lu-MPPt3 細胞を経気道的に肺に移植する。移植 30 日後に肺と所属リンパ節を摘出して病理標本を作製し、肺内およびリンパ節転移の有無を確認する。肺の mRNA を抽出した後、cDNA を合成してリンパ節転移の有無と遺伝子の変動を解析する。

(5) MPA 細胞株の樹立

KU-Lu-MPPt3 細胞株の他に、MPA 腫瘍組織に由来する細胞株の樹立を試みる。樹立の方法は KU-Lu-MPPt3 細胞株の樹立時と同様にコラーゲンコートした培養皿で培養し、培地は RPMI1640 培地に 10%FCS と N2 サプリメントを添加したものをを用いる。樹立に成功した細胞はセルブロックを作製し、腺癌マーカーを用いて免疫細胞化学染色を行う。

4. 研究成果

(1) CD36 および AQP1 の発現解析

DNA マイクロアレイの結果より、候補遺伝子の中で AD 細胞と比較して SUS 細胞における遺伝子発現比率が特に高かった CD36 (AD に対して 1116.15 倍) および aquaporin1 :AQP1 (AD に対して 523.46 倍) の遺伝子発現量をリアルタイム PCR で確認したところ、それぞれの発現について SUS 細胞で有意に高かった (図 2)。

さらにタンパク発現を免疫細胞化学で確認したところ、遺伝子発現の結果と同様に AD 細胞で陰性、SUS 細胞で強陽性であった (図 3)。

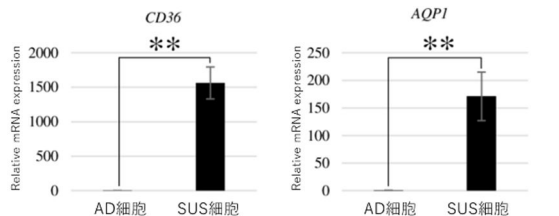


図2 リアルタイムPCRによるCD36およびAQP1の遺伝子発現量の比較 **P < 0.01

CD36 は脂肪酸受容体で、癌細胞が転移を開始するためのエネルギー源として脂質を取り込む際に CD36 を介する。AQP1 は細胞膜を介した水輸送を担うチャンネル分子ファミリーの代表で腫瘍血管新生の亢進、浸潤能、転移形成に関連し、MPA において AQP1 の過剰発現と予後不良が有意に相関するとの報告もある。

これらの遺伝子が MPA の転移能の高さに関連している可能性があるため、発現の低い AD 細胞へ CD36 または AQP1 の一過性トランスフェクションを試み、癌幹細胞性やメチル化、腫瘍抑制に関わる遺伝子 (ST6GALNAC1, SHOX2, DFNA5, HOPX, UCHL1) の発現量の変動を PCR で測定した

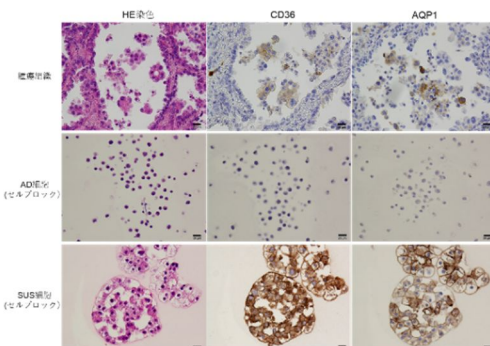


図3 樹立元となる腫瘍組織とAD細胞およびSUS細胞CD36とAQP1の免疫染色画像

が、変化は認められなかった。さらに、SUS 細胞で発現の高かった癌幹細胞マーカーである CD44 (AD に対して 40.39 倍) についても同様に検討を行い、加えて CD44 の安定発現細胞株でも検討を行ったが、AD 細胞に対する CD44 のクローニングは成功しなかった。これは他の肺腺癌細胞株では成功した為、AD 細胞はクローニングが困難な細胞株であると考えられる。CD44 については AD 細胞と SUS 細胞の選択的スプライシングによるバリエーションアイソフォームが大きく異なることから、MPA の悪性度と関連する可能性がある。CD44 は細胞貫通型接着分子で、腫瘍の増大、転移に関連し、治療抵抗性を促進するという報告があるため、AD 細胞と SUS 細胞のバリエーションアイソフォームの大きな違いがそれらと関連しているか否かを、今後別の方法で検討する。

(2) FAK と Akt の発現解析

DNA マイクロアレイの結果より、発現に差異を認めた遺伝子群を KEGG pathway enrichment 解析にかけたところ、pathway 候補の中に細胞接着分子と Akt シグナル伝達経路を認めた。そこで遺伝子群の中から細胞接着分子と Akt シグナル伝達経路に関連する遺伝子を抽出したところ、SUS 細胞で Akt 経路の活性化に関連する CD36, phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) および Janus kinase 1 (Jak1) の高発現を認めた。一方、AD 細胞では限局性接着キナーゼ (FAK: focal adhesion kinase) 経路の活性化に関与している paxillin および TIMP1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1) の高発現を認めた。これらの遺伝子発現量をリアルタイム PCR で確認したところ、それぞれの発現についてマイクロアレイ結果と同様の傾向を認めた (図 4)。

これらの遺伝子の中から AD 細胞で高発現し、接着に関わる FAK と SUS 細胞で高発現し、代謝や増殖に関わる Akt に着目した。浮遊していた SUS 細胞が付着する際、FAK のリン酸化亢進と Akt のリン酸化低下を認め (図 5)、培養皿に接地する細胞に葉状仮足突起の形成が観察され、同時に突起の先端に FAK リン酸化の蓄積を認めた (図 6)。

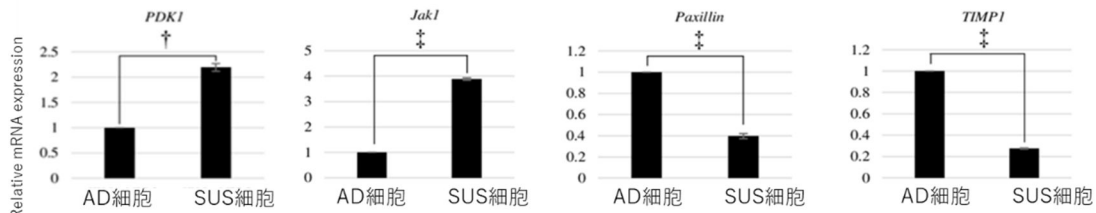


図4 リアルタイムPCRによるPDK1, Jak1, Paxillin, TIMP1の遺伝子発現量の比較 † P<0.001 ‡ P<0.0001

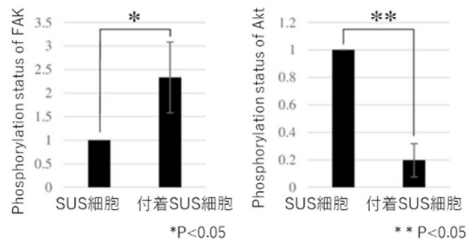


図5 リアルタイムPCRによるFAKリン酸化とAktリン酸化の遺伝子発現量の比較 *P<0.05 ** P<0.05

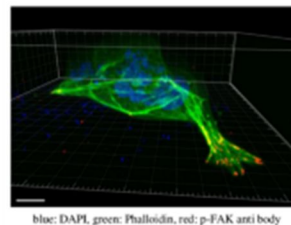


図6 培養皿に接地したSUS細胞に形成されたFAKのリン酸化を伴う葉状仮足突起 (赤色)

また、SUS 細胞に Akt 阻害薬を投与すると、Akt のリン酸化低下のみならず FAK のリン酸化亢進を認めた。その一方で、FAK 阻害薬を投与すると FAK と Akt のリン酸化低下を認めた (図 7, 8)。さらに、SUS 細胞に Akt 阻害薬または FAK 阻害薬を投与することで細胞の接着と増殖が有意に抑制され、また、Akt 阻害薬によってリン酸化 FAK の蓄積を伴う葉状仮足突起の形成が抑制された。これは SUS 細胞の接着に FAK と Akt の活性が関与していることを示唆し、これらの阻害薬が MPA における新たな治療薬となる可能性を示唆する。

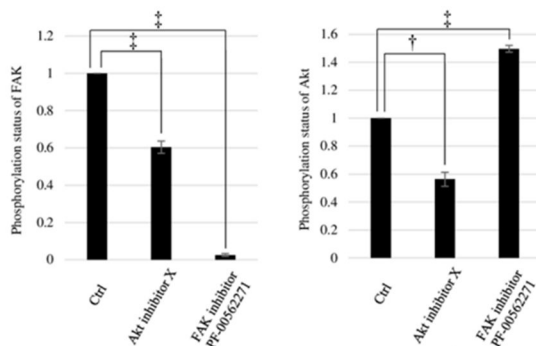


図7 SUS細胞にAkt阻害薬およびFAK阻害薬を投与した後のリアルタイムPCRによるリン酸化レベルの測定

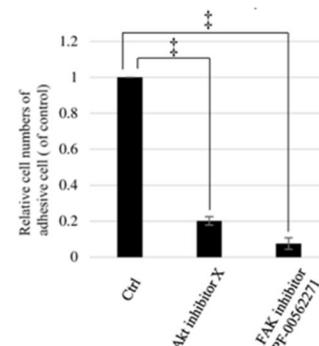


図8 SUS細胞にAkt阻害薬およびFAK阻害薬を投与した後の細胞接着アッセイ

(3)動物モデルの作製

免疫不全マウスに KU-Lu-MPPt3 の AD 細胞を経気道投与したところ、投与後 30 日以内に呼吸性喘鳴を認めた。開胸して確認したところ、気管支内および気管支周辺で腫瘍塊の形成を認めた。これは気管切開をした箇所から留置針を抜き取る際に切開箇所腫瘍が付着し、気管内と漏出した気管周囲で腫瘍が増殖したことによるものと考えられる。マウスモデルの作製には更なる工夫が必要であるため、今後は新たな方法や経気道投与の方法を工夫して作製を試みる。

(4) MPA 細胞株の樹立

同意を得た MPA 患者の腫瘍組織から細胞株の樹立 1 例を試みた。細胞株の樹立は成功したが、KU-Lu-MPPt3 のような付着細胞と浮遊細胞が混在せず、通常の肺腺癌細胞株と同様に付着細胞のみが観察された。セルブロックを作製して、腺癌のマーカである Cytokeratin の免疫細胞化学染色を行ったところ陽性であった(図 9)。これは、樹立に用いた腫瘍組織が手術で摘出した腫瘍のごく一部であるため、微小乳頭成分が含まれていなかった可能性がある。しかしながら、MPA と診断された原発腫瘍から樹立したため、今後の MPA 研究で利用できる可能性は高い。

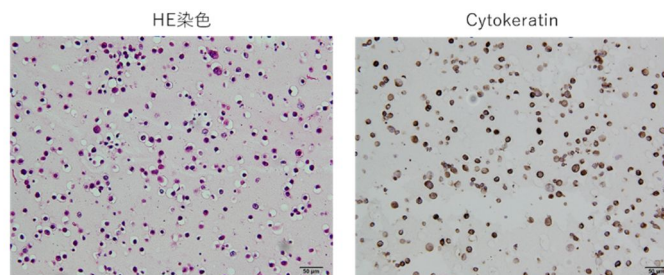


図9 新規に樹立したMPA細胞株のセルブロックを用いたHE染色とCytokeratinの免疫染色

本研究課題で得られた成果は、MPA細胞株である KU-Lu-MPPt3 でしか成し得ないものであった。本研究課題において、FAK と Akt が MPA における腫瘍細胞の生存や浸潤に重要な因子である可能性が示唆された。しかし、FAK と Akt の間をつなぐ機序は明らかになっていない。今後は DNA マイクロアレイの結果を再検討し、他の候補遺伝子についても検討を進め、研究が遅れている MPA の予後不良因子を解明し、新たな治療法の開発に繋げたい。

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 0件）

1. 著者名 Sonoda Dai, Kamizaki Koki, Matsuo Yukiko, Aruga Kana, Mikubo Masashi, Yamashita Keishi, Nishita Michiru, Minami Yasuhiro, Satoh Yukitoshi	4. 巻 47
2. 論文標題 Characterization of morphological alterations in micropapillary adenocarcinoma of the lung using an established cell line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2021.8230	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 園田 大, 松尾由紀子, 松島圭吾, 三窪 将史, 内藤 雅仁, 佐藤 之俊
2. 発表標題 微小乳頭型肺腺癌における細胞株を用いた悪性度の検討
3. 学会等名 第59回日本臨床細胞学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sonoda D, Kamizaki K, Matsuo Y, Shiomi K, Minami Y, Satoh Y.
2. 発表標題 Characterization of morphological and invasive in lung micropapillary adenocarcinoma using a cell line.
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会
4. 発表年 2021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
研究分担者	三窪 将史 (Mikubo Masashi) (90723940)	北里大学・医学部・講師 (32607)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	内藤 雅仁 (Naito Masahito) (50648730)	北里大学・医学部・助教 (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関