

機関番号：14501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591670

研究課題名 (和文) 肺腺癌浸潤における宿主由来線維芽細胞の役割に関する研究

研究課題名 (英文) The role of cancer-host interaction in the invasion of lung adenocarcinoma

研究代表者 眞庭 謙昌 (MANIWA YOSHIMASA)

神戸大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：50362778

研究成果の概要 (和文)：外科切除された肺腺癌における主病変部における Necl-5 の発現について、免疫組織化学染色で調べ、68%で強い発現を確認した。そして本蛋白質の発現はリンパ節転移の有無、病理病期、BAC 率と有意に相関し、発現例では有意に予後不良であった。これらの結果から、同蛋白質が原発性肺癌の臨床において重要な役割を持つことが明白となり、癌治療、とくに癌浸潤・転移コントロールにおける分子標的になり得ることが示された。

研究成果の概要 (英文)：A total of 63 surgically resected primary pulmonary adenocarcinoma tissues were investigated by immunohistochemistry for the expression of Necl-5. The overexpression of Necl-5 by cancer cells was significantly associated with lymph node metastasis, TNM staging and the bronchioloalveolar carcinoma ratio of tumors. Furthermore, the disease-free survival rate in patients with positive Necl-5 overexpression was significantly lower than that in patients with negative Necl-5 overexpression. These results indicate that Necl-5 plays a role in mediating tumor cell invasion and that the overexpression of Necl-5 in cancer cells has clinical significance for prognostic evaluation of patients with primary pulmonary adenocarcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

近年、原発性肺癌の中で増加が著しい細気管

支肺癌上皮癌の病理学的な研究において、癌細胞の浸潤・転移の開始部位として宿主由来の線維芽細胞と混在傾向を示す部分が注目されている。同部では、癌細胞の間質への侵入に際して、線維芽細胞との相互作用が重要な働きを持つことが予想され、そのメカニズムの理解と制御法の確立は新しい癌治療法の開発につながると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、癌浸潤における癌・宿主由来細胞間相互作用の分子機構を明らかにして、新しい癌浸潤コントロールのための標的を見出すため、癌細胞の線維芽細胞周囲での運動のメカニズムを、とくに両細胞における細胞間接着分子のダイナミクスに注目して、我々が開発した **3D** 環境モデルを用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体の検討

細気管支肺癌上皮癌の病理学的な研究において、宿主由来の線維芽細胞と混在傾向を示す部分は **invasive component** として浸潤・転移における癌・宿主細胞の相互作用が注目されている。我々は、肺癌切除標本において本コンポーネントを含むパラフィンブロックを 50 検体保管している。これを用いて、上記蛋白質に対する抗体を用いた免疫染色を行い、各蛋白質の癌細胞および線維芽細胞における発現および局在を調べる。

(2) 3次元浸潤モデルを用いた癌細胞—線維芽細胞相互作用の検討

培養細胞：肺癌細胞として PC3 (肺 中分化腺癌) と A549 (細気管支肺癌上皮癌: BAC)、間質との相互作用を観察するため WI-38 (線維芽細胞) を使用した。

2層コラーゲン半球 (DL-CGH) の作成：酸可溶性コラーゲン I、10% ham's F12 培養液、再構成用バッファーを 8:1:1 の比率で混合し、さらに培養細胞を 1ml 中 3.0×10^6 個となるよう調整して加えた。こうしてできた細胞を含有したコラーゲン液 $5 \mu\text{L}$ (細胞 15,000 個含有) をプラスチックディッシュ上に滴下し、ゲル化したものを中心核とした。この中心核を完全に覆うように、細胞を含有していないコラーゲン液 $30 \mu\text{L}$ を滴下する。そうしてできた 2 層の半球を、培養液中で、培養した。2 種類の細胞の相互作用を観察する場合、それぞれの細胞を 7,500 個ずつ混合し、中心核とした。細胞をニュートラルレッドで染色の後、風乾を行った。

細胞の浸潤能の測定と数値化：細胞浸潤能は、染色された 2 層化コラーゲン半球 (DL-CGH) の、赤く染色された細胞の広がり測定し、定量化を行った。染色、風乾された標本をデジタルカメラで撮影し、コンピュ

ータに取り込む。染色された細胞が浸潤した領域は、画像解析ソフト上で自動的に選別され、その領域のピクセル数が計示される。これを浸潤能の測定値とした。

経時的動画撮影：Motioncam 2000 デジタル顕微鏡システムを用いて細胞浸潤の動画撮影を行った。カメラヘッドを倒立顕微鏡の接眼レンズ部に装着し、顕微鏡ごと 37°C 、5% 炭酸ガス培養機の中に入れて培養を行った。細胞を 10 倍の対物レンズを用いて顕微鏡下に観察した。カメラコンピュータで制御され、DL-CGH 作成後 24 時間経過してから 96 時間まで、20 分ごとに撮影を行った。計 288 枚の画像が撮影され、これらを 30 秒間の動画に構成した。

Matrix Metalloproteinase (MMP) の抑制：MMP を抑制する阻害剤 (MMPi) として N-[(2R)-2-(hydroxamido carbonylmethyl)-4-methylpentanoyl]-L-tryptophan methylamide (Cal- biochem, Merck Bioscience) を使用した。これをそれぞれ $0.5 \mu\text{M}$ から $5 \mu\text{M}$ の濃度で、PC-3 を封入した DL-CGH の培養液に添加し、その効果を比較した。ネガティブコントロールとして N-t-butoxycarbonyl- L-leucil-L-tryptophan methlamide (Cal-biochem) を使用した。2 種類とも 7 日間の培養の後、ニュートラルレッドで染色した。

PC-3 における細胞間接着因子 (CD44、E-Cadherin) の影響：細胞間接着因子に対する RNA 干渉実験 (RNAi) を、CD44 と E-cadherin に対する siRNA と、非特異的 siRNA を用いて行った。それぞれの siRNA で PC3 にトランスフェクションを行い、培養の後、それぞれの DL-CGH を作成した。

A549 の緑色蛍光色素蛋白質 (GFP) による標識：A549 を pAcGFP1-Actin を用いてトランスフェクションし、GFP による標識を行った。この標識された細胞を用いて DL-CGH を作成した。

経時的動画撮影・通常光撮影と蛍光撮影の合成：炭酸ガス培養室をもった蛍光顕微鏡 AZ8000 を用いて、上記の標識された A549 に対し、通常撮影と蛍光撮影を行った。培養開始後 24 時間から撮影を開始し、96 時間まで撮影を行った。通常光撮影と蛍光撮影は同時に 20 分ごとに行い、上記と同様に 30 秒間の動画を作成した。

4. 研究成果

(1) 正常肺組織では Necl-5 の発現は認められなかった。非浸潤癌である野口タイプ A の細気管支肺癌 2 例では、腫瘍辺縁部の肺胞壁の間質で Necl-5 の発現が認められたが、癌細胞での Necl-5 の強発現は認められなかった。多くの浸潤癌の標本において腫瘍内の浸潤傾向を示す部位で癌細胞における

Necl-5 の強発現が認められ、周囲の間質も強く染色されていた。Necl-5 を強発現している癌細胞はいくつかの標本では、散在性に観察されたが、多くの標本では腫瘍の一部でびまん性に観察された。抗vimentin抗体を用いた免疫染色で間質細胞でも Necl-5 が発現していることが確認された。抗Necl-5 抗体、抗 integrin $\alpha_v\beta_3$ 抗体を用いて連続切片を免疫染色し、Necl-5 を発現している癌細胞で integrin $\alpha_v\beta_3$ が発現していることが確認できた。

腫瘍中の癌細胞の 5%以上で Necl-5 が強発現している症例を Necl-5 陽性、その他を Necl-5 陰性と判定したところ、43 例が Necl-5 陽性 20 例が Necl-5 陰性と判定された。Necl-5 の発現はリンパ節転移 ($p=0.0398$)、TNM 病期 ($p=0.0367$)、腫瘍の BAC 率 ($p=0.0423$) と有意差を持って関連していた。年齢 ($p=0.7774$)、性 ($p=0.7301$)、T 因子 ($p=0.2059$)、N 因子 ($p=0.3270$)、肺動脈浸潤 ($p=0.0528$)、リンパ管浸潤 ($p=0.0508$)、肺静脈浸潤 ($p=0.1156$) との有意な関連は示されなかった。

無再発 5 年生存率は Necl-5 陽性群で 33.7%、Necl-5 陰性群で 94.7% と、有意に陽性群が不良であった ($p=0.0004$)。単変量解析により、T 因子、リンパ節転移、Necl-5 の発現と予後の関連が示された。多変量解析によりリンパ節転移と Necl-5 の発現が予後に影響を与える独立した要因であることが示された。

TNM 病期 I 期の 37 症例中 21 例が Necl-5 陽性、18 例が Necl-5 陰性であった。TNM 病期 I 期における Necl-5 陽性群の無再発 5 年生存率は 46.9%、Necl-5 陰性群の無再発 5 年生存率は 100% で、有意に陽性群が不良であった ($p=0.0192$)。

(2) 2 層化コラーゲンゲル半球 (DL-CGH) を用いた細胞浸潤能測定：前述の対象と方法の項で述べたように、中心核に PC-3 と A549 を封入した、2 種類の 2 層化コラーゲンゲル半球 (DL-CGH) を作成した (Fig.1)。それぞれ 7 日間の培養を行い、ニュートラルレッドを用いて染色した。細胞の浸潤能を、染色された細胞の、コラーゲンゲル外層への広がりを測定する事で評価した (Fig.2)。PC-3 は外層へ広く広がっていった (染色領域 94,457 pixels)。一方 A549 は、ほとんど外層への浸潤を示さなかった (5,273 pixels)。外層への染色領域の広がりが細胞浸潤によるものかどうか、MMPi とネガティブコントロールを用いて確認した。PC3 の単層培養において、MMPi が細胞の分裂能に影響を与えないことを確認している。MMPi の濃度を上げていくにしたがって、外層への染色された領域の広がりは減少していった (Fig.3)。

(3) 癌細胞の浸潤能における、ノックダウンされた細胞間接着因子の影響：癌細胞にお

いて細胞間接着因子の機能不全をしばしば認めることができる。E-cadherin の発現抑制が癌の悪性度 (浸潤や転移) と強く関連していることが報告されている。また腫瘍の転移に必要なとされる細胞膜表面レセプター CD44 の発現が細胞間の接着や浸潤に重要な働きを持っていることも報告されている。

我々はこれらの細胞間接着分子の細胞浸潤における働きについて in vitro で調べるため、DL-CGH 法を使用した。E-cadherin と CD44 の発現を特異的に抑制する siRNA を用いて PC3 にトランスフェクションを行った。E-cadherin と CD44 の発現はウエスタンブロットングで確認し、発現量が非接触群やコントロール siRNA で処理した群と比較して、50%未満に抑制されていた。

このように、トランスフェクションされた細胞を DL-CGH の中核へ封入し、4 日間培養の後、浸潤能を検討した。それぞれの DL-CGH を 6 サンプルずつ作り、染色領域のピクセル数を測定、それらの平均と標準偏差を計算した。コントロール群、CD44 RNAi 群と比較し、E-cadherin RNAi 群の浸潤範囲は有意に増大していた (Fig.4B)。このように E-cadherin も CD44 も siRNA で発現を抑えられたが、E-cadherin の発現が抑えられた群だけ浸潤能の活性化を示した。このことは癌細胞において、E-cadherin の発現抑制が、癌の浸潤と関連しているという臨床報告と一致している。

(4) 浸潤における癌細胞と間質細胞の相互作用：A549 と WI-38 を混合し、DL-CGH の中核に封入し、通常通り培養を行い、倒立顕微鏡下で観察を行った。線維芽細胞がまず外層へ侵入し、癌細胞はその線維芽細胞が作った道の上を追いかけて進んでいくように見えた。

一方 A549 を中核に、WI-38 細胞を外層へ封入した DL-CGH を作成し、培養を行った。A549 が、外層にある線維芽細胞のネットワークに導かれるよう、突き進んでいく様子が観察された。これらの A549 の動きは GFP で標識された画像でより鮮明に確認することができた。通常撮影と蛍光撮影を合成した動画において、蛍光標識された A549 がアメーバのように姿を変えつつ、素早く線維芽細胞の表面を伝っていく様子が見て取れた。12 時間にわたり、標識された細胞が、線維芽細胞の表面上の約 $50 \mu\text{m}$ の距離を動いている。これらの映像から、単独では外層へ侵入できない BAC 細胞が、先に侵入していた線維芽細胞に導かれるように、広がっていく様子が観察された。

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Nakai R, Maniwa Y, Tanaka Y, Nishio W, Yoshimura M, Okita Y, Ohbayashi C, Satoh N, Ogita H, Takai Y, Hayashi Y, Overexpression of Necl-5 correlates with unfavorable prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2010, 101:1326-1330 (査読あり)
2. Tanaka Y, Maniwa Y, Bermudez VP, Doi T, Nishio W, Ohbayashi C, Okita Y, Hurwitz J, Hayashi Y, Yoshimura M. Non-synonymous SNPs in DNA damage repair pathways and lung cancer risk. *Cancer* 2010, 116:896-902 (査読あり)
3. Maniwa Y, Yoshimura M, Hashimoto S, Takata M, Nishio W. Chemosensitivity of Lung Cancer: Differences between Primary Tumor and Lymph Node Metastasis. *Oncology Letters*. 2010, 1: 345-349 (査読あり)
4. Maniwa Y, Nishio W, Yoshimura M. Application of hRad9 to lung cancer treatment as a molecular marker and a molecular target. *Thoracic Cancer*, in press. (査読あり)
5. Doi T, Maniwa Y, Tanaka Y, Tane S, Hashimoto S, Ohno Y, Nishio W, Nishimura Y., Ohbayashi C, Okita Y, Hayashi Y, Yoshimura M. MT1-MMP plays an important role in an invasive activity of malignant pleural mesothelioma cell. *Exp Mol Pathol*, in press (査読あり)
6. Chang O, Yano Y, Masuzawa A, Fukushima N, Teramura K, Hayashi Y. The cytological characteristics of small cell change of dysplasia in small hepatic nodules. *Oncol Rep* 2010, 23:1229-1232 (査読あり)
7. Tateiwa S, Yano Y, Seo Y, Miki A, Kawano Y, Azuma T, and Hayashi Y. Clinical significance of hepatitis B virus-DNA in hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus surface antigen. *Exper Therapeutic Med* 2010, 1:343-346 (査読あり)
8. Maekawa T, Maniwa Y, Doi T, Okada K, Nishio W, Yoshimura M, Ohbayashi C, Hayashi Y, Okita Y. Expression and localization of FOXO1 in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2009, 22: 57-64(査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

1. 第 27 回日本呼吸器外科学会総会 2010 年
2. CHEST2010 (USA)、2010 年

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞庭 謙昌 (MANIWA YOSHIMASA)

神戸大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：50362778

(2) 研究分担者

林 祥剛 (HAYASHI YOSHITAKE)

神戸大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：50189669