

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21390395

研究課題名(和文) 組織培養法を応用した肺癌多臓器転移モデルによる転移先臓器特異性決定遺伝子群の同定

研究課題名(英文) Microarray analysis to detect genes predicting organotropism of lung cancer metastasis.

研究代表者

吉増 達也 (Yoshimasu, Tatsuya)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60316099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,900,000円、(間接経費) 3,270,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、組織培養法を応用して複数臓器への同時多発転移をsimulateしたin vitroの実験系に、多数のヒト非小細胞肺癌細胞株をapplyし、マイクロアレイを用いて転移先臓器決定遺伝子群の同定を行うものである。ヒト肺腺癌培養細胞株A549、PC-14、およびVMRC-LCDを用い臓器上培養から得られた各細胞株の遺伝子発現をoriginalの細胞株の遺伝子発現と比較した。以上の処理により、肺、肝、腎、副腎、骨、筋において、それぞれ24、21、25、76、151、27の候補遺伝子を抽出した。これらが臓器特異性決定遺伝子群の候補であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer easily metastasizes to multiple organs, such as bone, lung, brain, liver, and adrenal gland. We applied microarray analysis to find the gene expression influencing organotropism of lung cancer metastasis. Human lung adenocarcinoma cell lines were used. Cell were cultured on the fresh tissue slice of athymic mouse. After that, proliferated cancer cells were collected from the surface of organ slice and cultured in the flask again. Then the conditioned cells from each organ were obtained. Microarray analysis was applied to these cells including original cells in order to detect specific gene alteration in each organ. Gene expressions of conditioned cells obtained from each organ were compared with original cells. Organ specific alterations were checked using unpaired t-test. We detected 76 genes as adrenal metastasis specific alterations, 22 genes with lung, 212 with liver, 25 with kidney, 141 with bone, and 27 with muscle.

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 呼吸器外科学

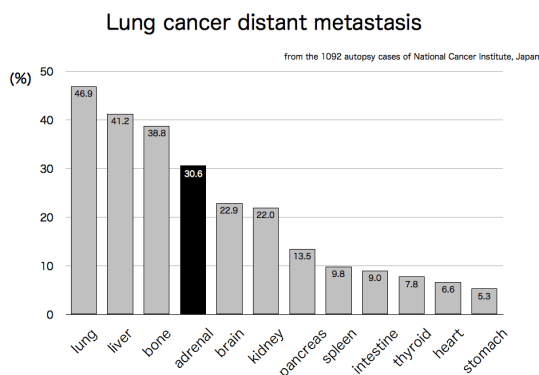
キーワード：肺癌 臓器特異性 マイクロアレイ

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, 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。下図は剖検例における臓器別の転移頻度である。



この図に示されているように、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、副腎は size が小さいにも関わらず 30.6% と 4 番目に転移の頻度が高い。このことは、組織体積や血流量の多寡だけでは説明できない。すなわち、肺癌の遠隔転移には解剖学的因子とは異なり 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。

現在まで、肺癌において予後を規定する多数の遺伝子マーカーが報告されてきた。しかし、これらは全体的な「悪性度」の指標であり、個々の臓器への転移のしやすさを予測する遺伝子マーカーの検索は、これまでほとん

どなされていない。

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。つまり転移先臓器の特異性決定因子は、一般的な転移のしやすさ、「癌の悪性度」を規定する因子とは異なると考えられる。

転移先臓器特異性決定因子は、原発巣とそれぞれの転移巣の遺伝子発現を比較することで検索可能と考えられる。しかし、検討に必要な検体を臨床例で多数得ることは非常に困難である。従って動物実験系あるいは in vitro の実験系が望ましい。そこで、本研究では、組織培養法を応用して複数臓器への同時多発転移を simulate した in vitro の実験系を用いて、転移先臓器決定遺伝子群の同定を行う研究を計画した。

2. 研究の目的

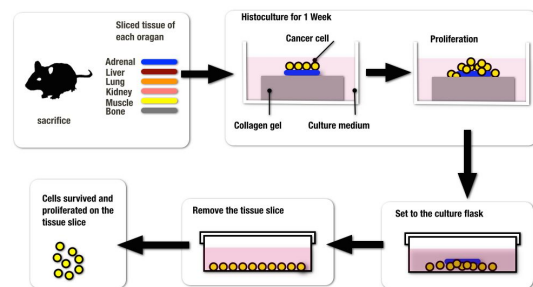
本研究では、組織培養法を応用して複数臓器への同時多発転移を simulate した in vitro の実験系に、多数のヒト非小細胞肺癌の cell line を apply し、DNA マイクロアレイを用いて転移先臓器決定遺伝子群の同定を行うことを目的とした。

組織培養法の技術的問題から、肺、肝、腎、副腎、骨、筋を対象臓器として研究を行った。

3. 研究の方法

【組織培養による in vitro 転移モデル】

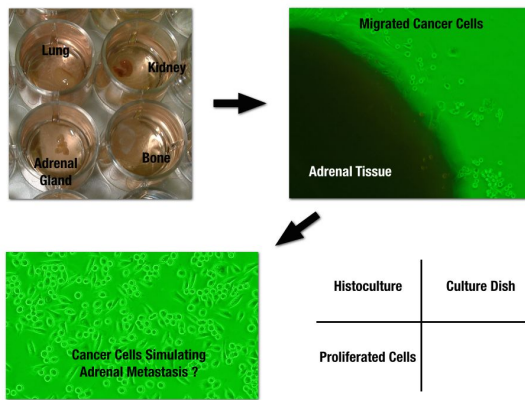
ヌードマウス (Balb/c-nu/nu) を sacrifice し、肺、肝、腎、副腎、骨、筋を 1mm 厚の組織片とする。組織片を collagen gel 上に載せ、ヒト NSCLC の cell line の monolayer cell を overlay し、1 週間培養する。組織片上で培養し増殖した細胞を組織片とともに通常の培養系へ回収する。3 日間の培養の後、組織片を除去し、Flask で NSCLC 細胞を増殖させる。増殖させた細胞を、転移巣を simulate したもものとして回収する (図)。



次ページの図は実際の培養状況で、この場合は副腎組織切片上から migrate した癌細胞を回収することができている。

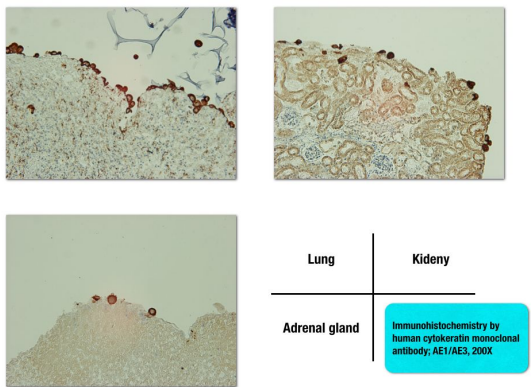
組織から得られた細胞は、さらに同一組織上で継代を進め、形質を安定させる。

継代数としては、5 継代まで行うこととした。対象とした臓器であるが、脳に関してはこの実験系において必要な期間 viability を維持することができないことが判明してい



るため、今回は検討できなかった。また、他の臓器に関しては、培養後の組織が viability を維持していることを確認済みである。

下図は培養中の臓器のヒトサイトケラチン染色の標本である。このように、臓器の剖面上に接着した形で癌細胞が培養される。

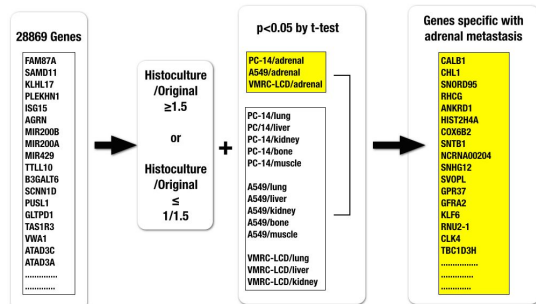


使用する細胞株は、cell bank より供給を受けたもので、ヒト腺癌培養細胞株 PC-14, A549, VMRC-LCD の 3 株を用いた。

【マイクロアレイ解析】

マイクロアレイ解析には、アフィメトリクス社製 Human Gene 1.0 ST array を用いた。Original の 3 種の癌細胞について、それぞれ、組織培養から得られた細胞の遺伝子発現を比較した。

Original の細胞株に比し、組織培養から得られた細胞株において、1.5 倍の発現の増加または減少の得られた遺伝子を、有意な変化として抽出した。これらの遺伝子変動のうち、それぞれの臓器についての変動が、他の臓器



の変動に比し、t-検定で $p < 0.05$ のものを、それぞれの臓器において、臓器特異性を決定する遺伝子群として抽出した (図)。

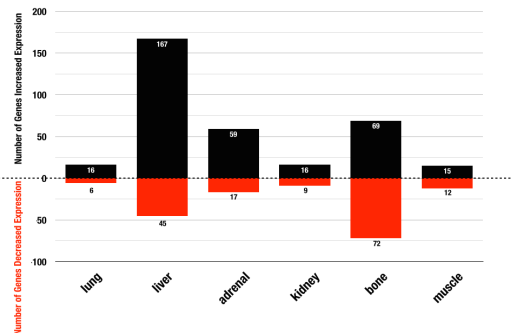
4. 研究成果

[1] 組織培養について

PC-14, A549 の 2 株においては、肺、肝、腎、副腎、骨、筋の全ての臓器上から、細胞の回収が可能であったが、VMRC-LCD では、骨、筋からは細胞を回収することができなかった。組織培養法自体でも、臓器親和性を検討することが可能であると推測された。

[2] マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析の結果、臓器特異的な遺伝子発現の変化として、肺では 16 遺伝子の増強、6 遺伝子の減弱、肝では 167 遺伝子の増強と 45 遺伝子の減弱、副腎では 59 遺伝子の増強と 17 遺伝子の減弱、腎では 16 遺伝子の増強と 9 遺伝子の減弱、骨では 69 遺伝子の増強と 72 遺伝子の減弱、筋では 15 遺伝子の増強と 12 遺伝子の減弱が抽出された。これらが、転移先臓器の特異性決定遺伝子群の候補であると考えられる (図)。



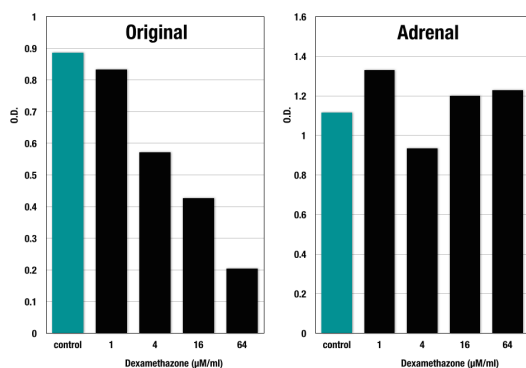
[3] 整合性の検討

マイクロアレイ解析は、あくまでスクリーニング検査に過ぎず、これらが実際に肺癌における転移先臓器特異性決定遺伝子群の候補であるかは、何らかの別の方法で検証する必要がある。

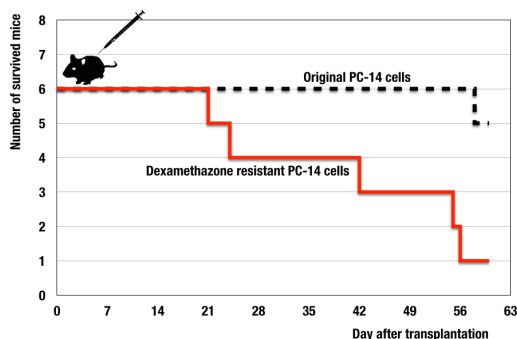
マイクロアレイ解析にて抽出された候補遺伝子のうち、発現変動が最も大きかったものは、副腎における calbindin-D28k の増強であった。そのため、これをターゲットとして検証を行うこととした。calbindin-D28k は、Vitamin D 依存性蛋白であり、正常臓器だけでなく癌細胞でも発現が確認されている。癌細胞および正常細胞において、caspase 3 の機能を直接抑制することにより細胞のアポトーシスを抑制する働きを持つ。悪性腫瘍、特に血液、リンパ球系の悪性腫瘍においては、糖質ステロイドによるアポトーシス誘導は、良く知られている現象である。糖質ステロイドによる刺激は caspase-9 を経て caspase-3, PARP cleavage を経てアポトーシスに至る。Calbindin-D28k はこの経路に影響してアポトーシスを抑制することが確認されている。

糖質ステロイドによるアポトーシス誘導は血液腫瘍だけでなく、正常細胞や固形癌においても起きることが知られており、肺癌においてもこの機序が存在することが確認されている。副腎では皮質において糖質コルチコイドが産生されており、この高ステロイド環境において癌細胞は通常、アポトーシスが促進されるため転移の形成が抑制される。すなわち、肺癌細胞における calbindin-D28k の高発現が、副腎という高ステロイド環境に到達した肺癌細胞のアポトーシス抑制に働くことで副腎転移の頻度を高くしているものという仮説が考えられる。

副腎の組織培養より得られた PC-14 (PC-14/adrenal) と original の PC-14 において、dexamethazone に対する反応を in vitro の培養系で比較したところ、図に示すように、original では濃度依存性に生存細胞数の低下が確認された。一方、PC-14/adrenal では、64 μ M の高濃度に置いても、明らかな増殖抑制が認められなかった。副腎上から得られた細胞株では、dexamethazone に対する耐性が生じていることが確認された。



次に、PC-14 を dexamethazone に接触させて培養し、64 μ M 濃度でも増殖可能な耐性株を作成した。これをヌードマウスに移植し、original の PC-14 と比較したところ、下図のごとく、original に比し、生存率の低下を認めた。本研究手法により、癌の転移先臓器特異性遺伝子群の抽出が可能であると考えられる。



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7件)

Yoshimasu T, Oura S, Kokawa Y, Kawago M, Hirai Y, Ohashi T, Nakamura R, Nishiguchi H, Matsutani M, Honda M, Okamura Y: Calbindin-D28k expression is correlated with the organotropism of lung cancer adrenal metastasis. 15th World Conference on Lung Cancer; 2013/10/27-31, Sydney.

吉増達也, 尾浦正二, 粉川庸三, 川後光正, 平井慶充, 大橋拓矢, 中村理恵, 西口春香, 松谷雅子, 本田麻里子, 岡村吉隆: 肺癌の副腎転移における calbindin-D28k の関与. 第 66 回日本胸部外科学会定期学術集会, 2013/10/16-19, 仙台.

吉増達也, 尾浦正二, 太田文典, 平井慶充, 内藤古真, 中村理恵, 田中由美, 池田雅子, 川後光正, 大橋拓矢, 粉川庸三, 岡村吉隆: マイクロアレイ解析を用いた肺癌副腎転移の臓器特異性規定遺伝子の検索. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012/9/19-21, 札幌.

吉増達也, 尾浦正二, 太田文典, 平井慶充, 内藤古真, 中村理恵, 池田雅子, 田中由美, 川後光正, 岡村吉隆: マイクロアレイを用いた肺腺癌の転移先臓器特異性決定遺伝子群の検索. 第 64 回日本胸部外科学会定期学術集会. 2011.10.10-12, 名古屋.

Yoshimasu T, Oura S, Ota F, Hirai Y, Naito K, Nakamura R, Nishiguchi H, Hashimoto S, Kawago M, Okamura Y: Microarray analysis to detect genes predicting organotropism of lung cancer adrenal metastasis. 14th World Conference on Lung Cancer. 2011/7/3-7, Amsterdam.

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.

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.

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉増 達也 (YOSHIMASU TATSUYA)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：60316099
研究者番号：

(2)研究分担者

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

(3)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