

機関番号：32653

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790330

研究課題名 (和文) 肺特異的腫瘍転移における血清アミロイドの分子機構

研究課題名 (英文) Molecular mechanism of serum amyloid signaling in lung metastasis

研究代表者

富田 毅 (TOMITA TAKESHI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20302242

研究成果の概要 (和文)：腫瘍が転移する際には、腫瘍原発巣からのサイトカイン刺激が転移先の臓器に到達し、いわゆる「転移前状態」という転移を誘導する状態が形成される。本研究では、肺特異的細胞であるクララ細胞が、この転移前状態を引き起こしているとする分子「血清アミロイド A3」の増幅起点であることを実験動物、器官培養、培養細胞を用いて明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：In tumor metastasis, primary tumor secretes cytokines to stimulate remote organs to induce a pre-metastatic phase, which facilitates tumor cells migration. This project revealed that Clara cell, located only in terminal bronchioles, functions as a control tower of serum amyloid A3 cascade, a culprit of the pre-metastatic phase formation, by using animal model, organ culture, and cell culture techniques.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

転移性肺がんは、多くのがん患者に見られるが、診断・予防・治療が困難であるためにその根本的な研究が求められている。研究代表者の所属する研究室では、転移性肺がんの発症機構の研究を行っていた。一連の研究の結果、腫瘍原発巣からのサイトカイン刺激が肺に到達し、そこで S100A8、血清アミロイド A3 (SAA3) が分泌されていることと、これらの分子が骨髄細胞の肺への動員およびがん細胞の肺への移動を促進していることが明らかにされた。さらに S100A8、SAA3 の発現

上昇は TLR4 依存的事象であることも示された。これらの結果を踏まえ、肺では S100A8-SAA3-TLR4 のカスケードが機能しており、腫瘍原発巣からのシグナルにより、実際にがん細胞が転移する前に転移を誘発する土壌が形成されているという「転移前状態」仮説を打ち出した。この研究は S100A8、SAA3 という分子レベルの反応が、がん転移というマクロスコピックな事象を説明しているという点の他に、自然免疫の中心的存在である TLR4 分子に内因性の配位子が存在し、生体内で重要な役割を担っていることを示

唆するものであったために、非常に注目を集めた。

しかしながら、この S100A8-SAA3-TLR4 カスケードの研究に登場する細胞は血管内皮細胞およびマクロファージのみであり、これだけでは肺特異性を説明することはできない。そこで肺特異性を説明する要素が肺に存在すると考え、肺特異的な肺上皮細胞に注目し、転移前状態の形成にどうかかわっているかを明らかにする研究を着想した。

2. 研究の目的

予備的検討の結果、肺上皮細胞であるクララ細胞と肺胞 2 型上皮細胞に注目した研究を行うこととした。これらの細胞が転移前状態とどのような役割を担っているかを、特に S100A8-SAA3-TLR4 カスケードとの関連性に重点をおいて、分子レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 高転移株 (3LL) を用いた転移アッセイ
高転移株 3LL を一辺 2mm のブロック状に切ったものを C57BL6 マウスの背部皮下に移植する。1、2、または 3 週間後に肺を取り出しパラホルムアルデヒドで固定後、30%スクロース溶液に浸漬し、OCT コンパウンドで臓器をなじませてからドライアイス中で凍結した。凍結した臓器はクライオスタットにて薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。染色像から転移の多寡の評価を行った。

(2) 蛍光標識細胞を用いた転移アッセイ
Lewis lung carcinoma (LLC) 1×10^7 個を 0.1ml の PBS に懸濁し C57BL6 マウスの背部皮下に注入した。10 日後に蛍光標識した LLC 細胞 1×10^5 個を PBS に懸濁し尾静脈より注入した。12 時間後肺を取り出し、凍結切片を作成後、蛍光顕微鏡下で蛍光標識した細胞数を計測した。
これに追加して LLC 細胞注入の代わりに、菌体内毒素 LPS を注入してこのアッセイも行った。この場合、蛍光標識した LLC 細胞の尾静脈からの注入は LPS 処理後 8 時間後に行った。

(3) 骨髄移植マウス

野生型および TLR4 ノックアウトマウスに放射線を照射し、骨髄細胞を除いたものに、それぞれ野生型および TLR4 ノックアウトマウスの骨髄細胞を注入した。組み合わせをえることにより、野生型骨髄細胞を持つ野生型マウス、TLR4 ノックアウトの骨髄細胞を持つ野生型マウス、野生型骨髄細胞を持つ TLR4 ノックアウトマウス、TLR4 ノックアウトマウス骨髄細胞を持つ TLR4 ノックアウトマウスを作製した。これらのマウスを用いて上述の

腫瘍移植を行い、蛍光標識細胞を用いた短期間の転移アッセイを実行した。

(4) 器官培養

マウス肺を取り出し直ちに 2mm 角に裁断しトランスウェルメンブレン上に置いたトランスウェルは 24 穴プレート上に置きトランスウェルの外側に培地を加えた。培地に GST および GST 融合タンパク質を添加し 90 分培養した後、裁断した肺から RNA を抽出した。

(5) 肺初代培養細胞

マウス肺を単離後コラゲナーゼ・ディスパーゼ・DNアーゼ溶液に浸漬し、37°C で 30 分間振とうした。得られた細胞を洗浄後、培地に懸濁し、細胞培養用ディッシュに播き 37°C で 1 時間培養する。培養上清を取り出し、新しいディッシュに播いて培養する。クララ細胞の単離には気管よりトリプシン・低融点アガロースを注入する方法により行った。またクララ細胞を単離する際には、コラーゲンコートディッシュと気道上皮細胞用の培地を用いた。

(6) 培養細胞株を用いたアッセイ

樹立済みの細胞株である、マウス肺胞 2 型上皮細胞 (MLE15)、マウスクララ細胞 (C22) マウスマクロファージ (RAW264.7) を用いて GST 融合タンパク質による刺激実験のほか、細胞遊走能計測等の各種アッセイを行った。

4. 研究成果

(1) 高転移株 (3LL) を用いた転移アッセイ
3LL 移植 2 週間後の肺では平均 15 個の転移結節が観測された。一方ナフタレンを腹腔内投与することによって作成する、クララ細胞除去マウスでは、3LL 移植 2 週間後の転移結節は平均 5 個に減少していた。両者のマウスの間で転移結節の大きさに違いは見られなかった。このことから、クララ細胞が 3LL の自発的転移を促進していることが示唆された。

また腫瘍移植を行うと、肺で CD11b 陽性細胞が増加することが明らかにされている。CD11b 陽性細胞は転移前状態形成に伴い骨髄より肺へと動員されると考えられており、がん細胞との直接的な相互作用においても重要な役割を果たしていると考えられている。クララ細胞除去マウスでは、腫瘍移植しても肺での CD11b 陽性細胞の増加は見られなかった。

ナフタレン投与によるクララ細胞の除去は組織染色によって判断した。クララ細胞特異的に発現する CYP2F2 の酸化反応により、ナフタレンは選択的にエポキシ化される。このエポキシシドが自殺基質として作用しクラ

ラ細胞にアポトーシスを引き起こさせる。シナプタレンは非特異的な炎症反応も肺全体にも引き起こす。炎症反応が S100A8、SAA3 の発現上昇を引き起こし、その結果骨髄細胞の肺への動員およびがん細胞の肺への転移促進へとつながる可能性は高いと考えられるが、クララ細胞の効果はそれらを上回っていると思われる。

(2) 蛍光標識細胞を用いた転移アッセイ

腫瘍をマウス背部皮下に移植して作成する腫瘍モデル動物においては、この短期間の転移アッセイでは腫瘍のないコントロールマウスに比べて、有意に多くの蛍光標識細胞が肺で観測されることが先行研究によって示されている。このことは皮下腫瘍からのサイトカイン刺激が肺に影響を与え、肺でより多くの腫瘍細胞が留まる機構が働いていると考えられる。本研究でも、先行研究の結果を確認した上で、クララ細胞除去マウスを用いて同様の実験を行った。その結果、クララ細胞除去マウスでは腫瘍移植による蛍光標識細胞の肺への集積効果が見られなかった。

次に肺で炎症反応が起こった際に短期間の転移アッセイに与える影響を見るために、腫瘍移植の代わりに LPS を直接肺に作用させる実験を行った。まず 0.1 マイクログラムの LPS を気管より注入し一過性の炎症反応を肺で起こさせた。LPS 注入後 8 時間後に蛍光標識細胞を注入し肺での蛍光標識細胞を計測した結果を下図に示す。

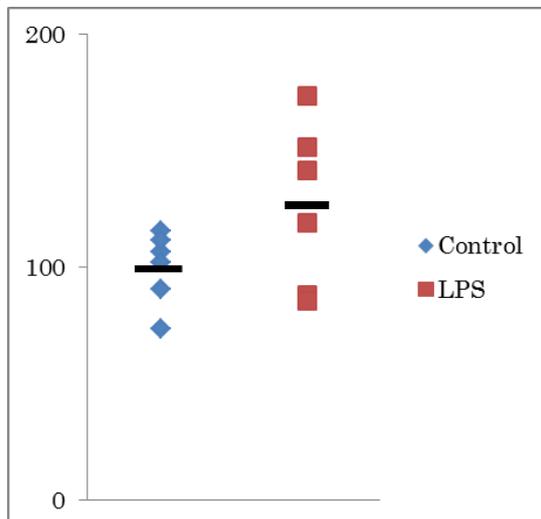


図 コントロールおよび LPS 注入マウスにおける短期間の転移アッセイ。図中の点は各マウス肺切片 1mm² における蛍光標識細胞の数を示す。図中にコントロールおよび LPS 注入マウスでの値の平均値を示す黒棒を書き加えた。

結果より、肺で炎症反応が起きている場合には、よりがん細胞が転移しやすい環境にある

ことを確認した。LPS 投与後の肺での SAA3 の発現レベルを定量 PCR で確認したところ、投与後 8 時間で SAA3 の発現レベルは最高となり約 100 倍の発現上昇が見られている。クララ細胞除去マウスで同様の実験を行ったところ、LPS 投与による SAA3 の発現上昇は見られなかった。このことからクララ細胞が肺での主要な供給元であると考えられる。

(3) 骨髄移植マウス

野生型骨髄細胞を持つ野生型マウス、TLR4 ノックアウトの骨髄細胞を持つ野生型マウス、野生型骨髄細胞を持つ TLR4 ノックアウトマウス、TLR4 ノックアウトマウス骨髄細胞を持つ TLR4 ノックアウトマウスの 4 通りのマウスに対して、同様に腫瘍移植後短期間の転移アッセイを施行した。その結果、TLR4 ノックアウトマウス骨髄細胞を持つものは、腫瘍移植による効果が、肺での CD11b 陽性細胞の計測と短期間の転移アッセイでは見られなかった。このことから、骨髄細胞の TLR4 が転移前状態の形成に役割を果たしていることが判明した。一方肺上皮細胞での TLR4 の重要性をこの実験から直接示すことができなかった。これは骨髄細胞導入後、実験開始まで 8 週間以上経過しており、肺上皮細胞の一部が骨髄由来のものと置換されているためであると考えられる。実際これらのマウスの肺切片の TLR4 免疫染色像を見てみると、TLR4 陰性細胞と TLR4 陽性細胞が混ざっている状態であることが確認された。

(4) 器官培養

器官培養は 90 分という短期間の培養でのみ実験を行った。大腸菌で発現させ、精製した GST 融合 SAA3 を培地に添加したところ、TNF α の発現上昇が見られた。この TNF α の発現上昇はクララ細胞除去マウスの肺器官培養でも同様に観測された。このことから、SAA3 刺激による TNF α の発現上昇にはクララ細胞が関与しないことが示唆された。なお GST 融合 SAA3 を培地に添加する際には、エンドトキシンの影響を除くために、ポリミキシン B を培地中にあらかじめ加えている。

(5) 肺初代培養細胞

野生型および TLR4 ノックアウトマウスから肺初代培養細胞およびクララ細胞を調製した。野生型クララ細胞に大腸菌由来 GST 融合 SAA3 を作用させたところ、SAA3 の発現上昇が見られた。この発現上昇は LPS 添加によって引き起こされるものと同程度であった。一方 TLR4 ノックアウトマウスから調製したクララ細胞では GST-SAA3 による SAA3 の発現上昇は見られなかった。この結果から、SAA3 の増幅はクララ細胞上でオートクライン的に起こっていることと、この増幅は TLR4 を介

して起こっていることが明らかとなった。

肺初代培養細胞は90%が肺胞2型上皮細胞であり、残りがクララ細胞、血管内皮細胞、繊維芽細胞であると考えられる。この細胞にGST融合SAA3を作用させ6時間培養後にRNAを抽出し、cDNA合成後に定量PCRでSAA3およびTNF α の発現レベルを調べたところ、SAA3、TNF α の両者に発現上昇が見られた。前述のとおりSAA3の発現上昇はクララ細胞の働きによるものとして説明できるが、TNF α の発現上昇は、クララ細胞では起こらないため、クララ細胞以外の細胞の関与が疑われた。腹腔マクロファージをマウスから調製して同様のGST-SAA3刺激実験を行ったところ、SAA3の発現上昇は見られなかったが、TNF α の発現上昇は見られた。したがって、このTNF α の発現上昇にはマクロファージが関係している可能性がある。

肺初代培養細胞の調製時には一度培養皿にマクロファージを吸着させて取り除いているので、マクロファージ以外の細胞もTNF α の発現上昇に影響を及ぼしている可能性が高い。そこで肺胞2型上皮細胞が関わっていると考えられたので、以下の培養細胞株を用いた実験により証明することとなった。

(6) 培養細胞株を用いたアッセイ

細胞株として樹立されている肺上皮由来の培養細胞、MLE15およびC22を用いて実験を行った。C22細胞ではフローサイトメトリーにより細胞表面でのTLR4-MD2複合体の発現を確認した後、GST-SAA3刺激を行い、定量PCRによりSAA3とTNF α の発現レベルを測定した。その結果クララ細胞由来のC22ではSAA3刺激によりSAA3の発現上昇が見られるが、TNF α には影響を与えないことが判明した。一方肺胞2型上皮由来のMLE15ではGST-SAA3刺激により、SAA3の発現レベルには変化が無かったが、TNF α の発現上昇が見られた。このことから、SAA3依存的にTNF α を発現しているものは、マクロファージと肺胞2型上皮細胞であることが明らかとなった。さらにルシフェラーゼアッセイまたは定量PCR実験を行い、C22細胞はTNF α 刺激によりSAA3の発現上昇があることと、MLE15細胞ではTNF α 刺激によりSAA3の発現上昇がある可能性が示唆された。

以上のことから、腫瘍原発巣からのサイトカインシグナルにより、肺上皮細胞が、血管内皮細胞・マクロファージと協同的にまたは単独で機能することにより、S100A8-SAA3-TLR4カスケードを活性化し、転移前状態を維持する機能を担っていると考えられる。今後は、この転移前状態を抑制する薬剤が存在する

か否か、HMGB1等他のTLR4配位子との関係、S100A8、SAA3はTLR4に結合することにより引き起こす細胞内シグナリングが、LPSがTLR4に結合することによって引き起こされるものと質的な違いがあるのかどうか、S100A8、SAA3がTLR4以外の受容体と結合して機能することは無いのかどうか、といった問題に取り組みたい。

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)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Tomita T., Sakurai Y., Ishibashi S., Maru Y. “Imbalance of Clara cell-mediated homeostatic inflammation is involved in lung metastasis” *Oncogene* in press (2011) 査読あり
- ② Kido T., Tomita T., Okamoto M., Cai Y., Matsumoto Y., Vinson C., Maru Y., Kimura S. “FOXA1 plays a role in regulating Secretoglobin 1a1 expression in the absence of CAAT/Enhancer Binding Protein activities in lung in vivo” *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* in press (2011) 査読あり

[学会発表] (計4件)

- ① 富田 毅、丸 義朗 クララ細胞によるS100A8-SAA3-TLR4を介した肺特異的転移の機構 第69回日本癌学会学術総会・2010年9月23日・大阪
- ② Tomita T., Maru Y. ” Organ specific resident cells with TLR4 determine organotropism in metastasis” 14th International Congress of Immunology・2010年8月23日・神戸
- ③ Tomita T., Maru Y. “Organ specific resident cells determine organotropism in metastasis” 8th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association・2010年2月8日・ハワイ
- ④ 富田 毅、丸 義朗 クララ細胞によるS100A8-SAA3-TLR4を介した肺特異的転移の機構 第69回日本癌学会学術総会・2010年9月23日・大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 毅 (TOMITA TAKESHI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20322242