

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15381

研究課題名(和文) ヒト腫瘍組織を利用した、腫瘍の遠隔転移に関与する癌細胞-基底膜接着因子の探索

研究課題名(英文) Research for cell-basement membrane adhesion factors involved in distant metastasis of tumors using human tumor tissue.

研究代表者

河合 瞳 (Kawai, Hitomi)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：50895026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：導入：浸潤性粘液腺癌(IMA)は高頻度に経気道散布という遠隔転移形式を呈し、経気道散布は遠隔転移の初期段階状態と見なされる。目的：IMAの細胞膜タンパクを抗原としたモノクローナル抗体を作成し、経気道散布に関連する癌細胞膜タンパクの同定と機能解析を行う。結果：モノクローナル抗体を用いた免疫沈降サンプルの質量分析を行い、抗原候補としてMRP2が同定された。MRP2は肺腺癌細胞株(A549)およびIMAの細胞膜(特に頂部)に発現し、非腫瘍性の肺胞上皮・気管支上皮には発現しないことから、肺における癌特異的なタンパクとして機能していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IMAは高頻度に経気道散布という遠隔転移形式を呈する。経気道散布は遠隔転移の初期段階状態と見なすことができる。今回、IMAの細胞膜タンパクを抗原としたモノクローナル抗体を作成し、抗原候補としてMRP2が同定された。本報告ではMRP2がIMAおよび肺腺癌細胞株の細胞膜に発現することを初めて報告した。MRP2は薬物や生理活性物質の流出入に関わるタンパクであり、IMAにおけるMRP2の異所性の発現が、癌細胞-炎症細胞間に癌特異的な生化学的カスケードが構築している可能性が考えられた。MRP2の発現が癌細胞-基底膜間の接着に与える影響を調べることで、遠隔転移の初期段階の機序を解明する手がかりとなる。

研究成果の概要(英文)：Introduction: Invasive mucinous adenocarcinoma (IMA) frequently shows aerogenous spread of lung adenocarcinoma, which can be considered as an early stage of distant metastasis.

Object: I produced monoclonal antibodies whose antigens were membranous proteins extracted from frozen tissue samples of IMA, then identified the antigen and functionally analyzed the antigenic protein, which was considered to be associated with aerogenous spread.

Result: Mass spectrometry of immunoprecipitated samples using monoclonal antibodies identified MRP2 as a candidate antigen, which is expressed on the cell membrane (especially at the apex) of lung adenocarcinoma cell lines (A549) and IMA, but not on non-neoplastic alveolar and bronchial epithelia, suggesting that MRP2 functions as a cancer-specific protein in the lung.

研究分野：肺腺癌

キーワード：浸潤性粘液腺癌 細胞膜タンパク モノクローナル抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌の多臓器への転移(遠隔転移)の径路として、血行性転移、リンパ行性転移、播種が存在する。肺癌では上記 3 つの転移の径路以外に、経気道散布という概念が存在する。いずれの転移様式でも、初期段階として、癌細胞の基底膜からの遊離が必要である。

血行性・リンパ行性転移においては、癌細胞は基底膜から遊離した後、内皮細胞への接着・rollingにより脈管内に浸潤する。播種においては、癌細胞は周囲の間質組織に浸潤し、漿膜を貫通した後に体腔内に浮遊する。血行性・リンパ行性転移では癌細胞が基底膜から遊離した後、播種では基底膜から遊離する前に、内皮細胞との相互作用や、周囲の組織への直接浸潤による修飾をそれぞれ受けると考えられる。

一方、経気道散布とは、基底膜から遊離した癌細胞が肺胞腔内および気道内を浮遊・移動し、原発巣とは異なる領域の肺内に転移巣を形成するという転移様式である。経気道散布においては、癌細胞は基底膜から遊離した後、転移先となる異なる肺の領域(同一肺葉内の別の部位、同側の異なる肺葉、ないし対側肺)に達するまで、気腔内を浮遊して移動すると考えられている。すなわち、経気道散布の状態では、癌細胞は基底膜からの遊離以外の修飾を受けていない、遠隔転移の初期段階の状態にあると考えられる。In vitro の実験で、肺腺癌の細胞株である A549 について、細胞接着の減弱した状態では、接着因子である ICAM-1 が細胞膜から細胞質に移行していることが過去に報告され[PMID: 17575214]、経気道散布には癌細胞の細胞膜に発現する接着因子が関与している可能性が示唆されるが、その後の研究は進んでいない。

肺癌の中でも、肺腺癌の特殊亜型である浸潤性粘液性腺癌(invasive mucinous adenocarcinoma, IMA)は、非粘液性の通常型の肺腺癌に比較して、高頻度に肺内転移を合併する一方、血行性・リンパ行性の転移様式による肺以外の臓器への遠隔転移が他の肺腺癌に比較して極めて稀である[PMID: 27987593]。そのため、IMA は基底膜や血管、リンパ管への浸潤などの浸潤能が極めて乏しく、その転移は経気道散布によると考えられている。以上のことから、癌の転移の初期段階で発生する、癌細胞 - 基底膜間の接着因子の変化を解明するにあたり、IMA は有用な研究対象であると考えられる。

2. 研究の目的

癌細胞の遠隔転移の初期段階に着目し、IMA の腫瘍細胞の細胞膜に、癌細胞 - 基底膜間の接着を制御するタンパクが発現しているという仮説を立てた。癌の遠隔転移に關与する細胞膜タンパクの同定と機能解析を本研究の目的として設定した。

3. 研究の方法

ヒトの腫瘍組織から採取した癌細胞由来のタンパクは、癌細胞株から抽出されるタンパクと比較して、より生理的な構造に近い状態と考えられ、癌における機能の保たれた構造であると考えた。IMA の細胞膜を用いた基礎研究は現在までに報告がなく極めて新規性が高い。以上より、IMA の凍結材料から抽出した細胞膜タンパクを抗原としてマウスに移植してモノクローナル抗体を作製し、モノクローナル抗体を用いて免疫染色によるスクリーニング、網羅的タンパク解析(LC-MS/MS 法、プロテインアレイ法)による抗原同定を行うことで、IMA の細胞膜に発現し、癌細胞の接着機構に關与するタンパクを同定することを試みた。

具体的なワークフローを図 1 に示す。なお、図 1 における「1. 細胞膜タンパクの抽出」から「4. スクリーニング」についてはすでに先行研究で着手済みであった。

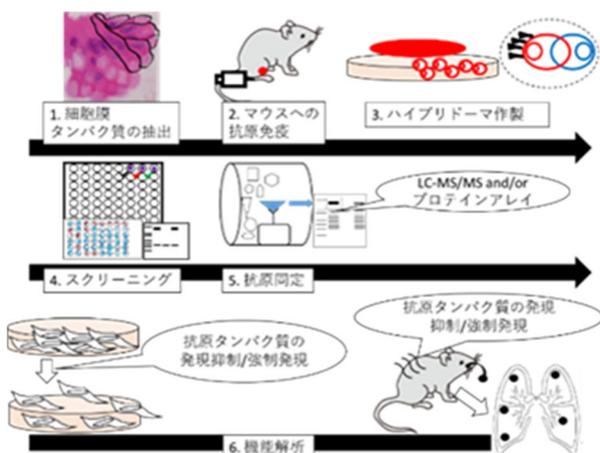


図 1: 研究の方法のワークフロー

4. 研究成果

先行研究で、モノクローナル抗体を産生するハイブリドマクローンを 207 個得た。様々な組織亜型の肺腺癌および非腫瘍性の肺組織を搭載した tissue microarray (TMA)を用いた免疫組織化学によるスクリーニングを行い、細胞膜タンパクに陽性となるモノクローナル抗体 18 種類の中を絞り込んだ。18 種類のモノクローナル抗体と、多臓器の腫瘍・非腫瘍性組織を搭載した TMA を用いた免疫組織化学によるスクリーニングを行い、IMA での陽性率が高く、IMA 以外の癌腫での陽性率が相対的に低く、非腫瘍組織に対する陽性率が最も低いクローンとして J04 が同定された。J04 の産生するモノクローナル抗体と、肺腺癌細胞株を用いてウエスタンブロットを行ったところ、A549 において最も濃いバンドが検出された。J04 の免疫組織化学およびウエスタンブロットの結果を図 2 に示す。

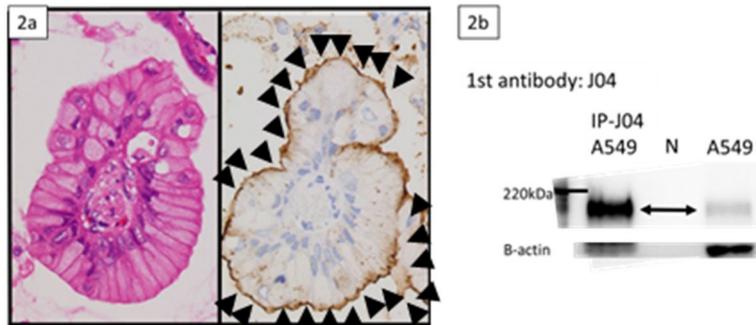


図 2 J04 抗体を用いた免疫組織化学(a)およびウエスタンブロット(b)。

a: IMA の細胞膜頂部に陽性像が見られる(右, 矢印)

b: A549 の whole cell lysate(右)および、A549 と J04 の免疫沈降サンプル(左)いずれでも、200 kDa の高さにバンドが田確認された(両矢印)。N=陰性コントロール。

J04 と A549 の細胞膜タンパクの免疫沈降サンプルを国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 創薬標的プロテオミクスプロジェクト プロテオームリサーチプロジェクトに提出し、質量分析を委託した。質量分析の結果、J04 の抗原候補として合計 116 種のタンパクが同定された。116 種類の中から陰性コントロールで検出されない 73 種のタンパクについて、Gene ontology で調べた結果、細胞膜に発現するタンパクが 14 種類同定された(表 1)。

Gene names	Mol. weight [kDa]		
ITGB4	194.46	CEACAM5	76.723
HACD3	43.159	ABCC1	151.66
SCRIB	174.88	ABCC2	174.21
ATP2A2	109.73	MYOF	233.47
LAMB1	198.04	MUC5B	596.33
FN1	249.4	PRPF8	273.6
CCDC88A	212.53	SEC16A	247.24

表 1 質量分析の結果、J04 の抗原候補として同定されたタンパクのリスト。

14 種のタンパクについて機能および局在を The Cancer Genome Atlas で確認した。また、肺腺癌細胞株 41 種の遺伝子解析データを用いて、14 種類の遺伝子について A549 と A549 以外の細胞株における発現を比較した。ABCC2(MRP2)は A549 での発現が高いタンパクで、生理的に結腸杯細胞の細胞頂部に発現するトランスポータータンパクであることから、MRP2 が J04 の抗原であるという仮説を立てた。

MRP2 抗体を用いた肺腺癌細胞株のウエスタンブロットでは、A549 で J04 と同じ高さにバンドが確認された(図 3)。免疫蛍光法では MRP2 が A549 細胞の細胞膜に発現していることが確認された(図 4)。免疫組織化学では、J04 が IMA の細胞膜頂部に発現するのに対し、MRP2 は細胞膜頂部が有意ではあるが、細胞膜全体に発現することが確認された(図 5)。MRP2 は非腫瘍性の肺上皮および気管支上皮には発現しなかった。既報告では肺腺癌を含む様々な癌腫での MRP2 の発現は検討されているが[PMID: 12121239]、肺腺癌細胞株、IMA の組織において、MRP2 が細胞膜(特に頂部)に局在することを示したのは本報告が初めてである。

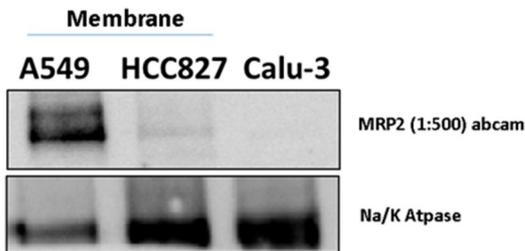


図 3 MRP2 抗体を用いた、各種肺腺癌細胞株の細胞膜タンパクに対するウエスタンブロット。

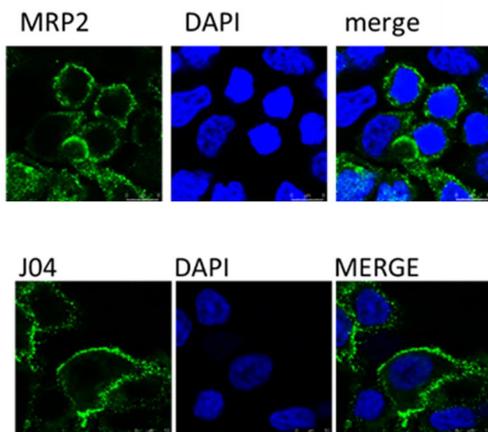


図 4 MRP2(上段), J04(下段)の A549 における発現を免疫蛍光法で確認した。

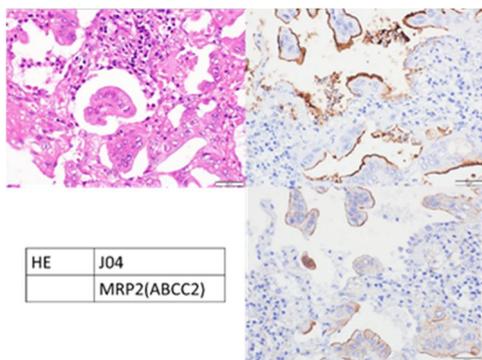


図 5 IMA に対する、J04, MRP2 抗体を用いた免疫組織化学。

J04 抗体と A549 の免疫沈降サンプルに対し、MRP2 抗体でウエスタンブロットを行うと、J04 抗体でウエスタンブロットをした場合と同じ高さにバンドが検出された。MRP2 抗体と A549 の免疫沈降サンプルに対し、J04 抗体でウエスタンブロットを行うと、MRP2 抗体でウエスタンブロットをした場合と同じ高さにバンドが検出された(図 6)。

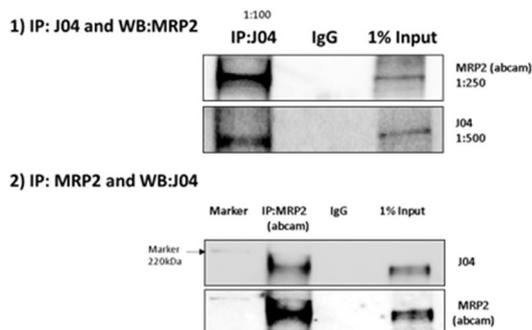


図 6 J04, MRP2 抗体を用いた免疫沈降・ウエスタンブロットの結果。

J04 の認識する抗体は MRP2 である可能性が高いと考え、A549 細胞を用いて si-RNA による MRP2 のノックダウンを試みた。複数種類の siRNA でノックダウンの条件を検討し(図 7)、si-MRP2 の条件を決定したが、ウエスタンブロットでは si-RNA 前後で MRP2 のバンドの発現に変化が得られなかった(図 8)。

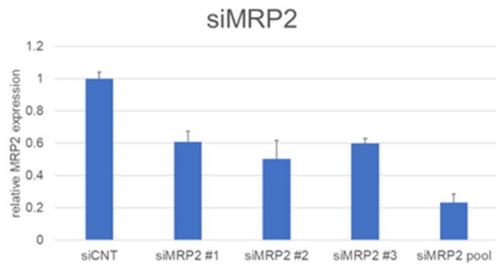


図 7 si-MRP2 の条件検討の結果。

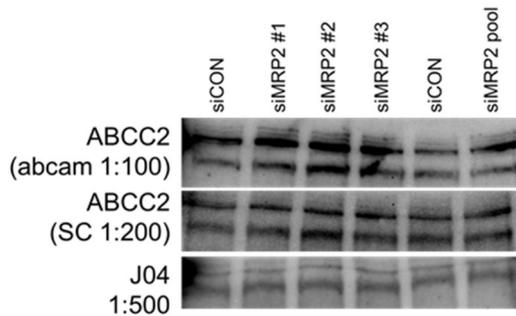


図 8 A549 を用いた si-MRP2 処理後のウエスタンブロット(SiMRP2-I, II, III)。siCON=陰性コントロール。

最後に MRP2 の強制発現による機能解析を試みた。ベクターを用いた MRP2 の強制発現によって、肺腺癌細胞株 HCC827 において MRP2 mRNA の発現が上昇することが確認された(図 9a)。強制発現実験後、MRP2 抗体および J04 抗体を用いたウエスタンブロットを行うと、J04 のバンドは強制発現前と比べて強制発現後でバンドの検出が減弱するという結果が得られた(図 9b, 右)。

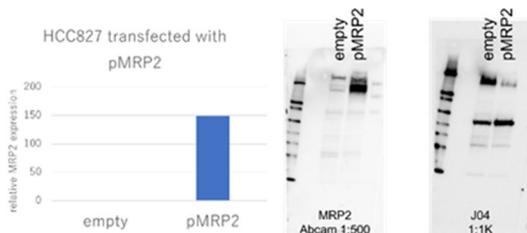


図 9 a: MRP2 の強制発現実験による遺伝子発現の変化。

b: MRP2 の強制発現前後での、MRP2(左)、J04(右)によるウエスタンブロットの結果。

MRP2 の強制発現実験では、HCC827 における J04 の認識するタンパクは MRP2 に比較してバンドがより明瞭に認識され、かつ MRP2 の強制発現後にはむしろ発現が減弱する傾向が確認された(図 9)。J04 の認識する抗原は MRP2 ではなく、MRP2 と同一の局在を呈する、異なるタンパクである可能性がある。抗原候補とした J04 以外のタンパク(表 1)が J04 の真の抗原であるかどうか、検証を進める必要がある。

更に、MRP2 の発現抑制実験では、ウエスタンブロットの結果が陰性コントロールと発現抑制後で変化しなかった(図 8)。MRP2 の半減期が長く、発現抑制後もタンパクの発現が持続している可能性があるが、ウエスタンブロットの工程に不具合がある可能性も考慮される。特に、今回はウエスタンブロットに細胞膜タンパクではなく whole cell lysate を用いたため、細胞膜タンパクを抽出してウエスタンブロットを再施行する必要がある。

一方、MRP2 が IMA の細胞頂部に発現すること、非腫瘍性の肺胞上皮・気管支上皮には発現しないことが、本研究で新規に確認された。MRP2 は薬物排出トランスポーター分子で、癌の分野では多剤耐性関連タンパクとして知られている[PMID:15845415]。近年では MRP2 の肺胞上皮での発現が黄色ブドウ球菌に依る肺炎において亢進することが報告されること、MRP2 の発現によって、炎症誘発性の生理活性物質であるヘポキシリン A3 の細胞外への流出が促進され、好中球などの多核細胞の細胞外への遊走が促進されることが報告されている[PMID: 29976647]。IMA における MRP2 の発現によって、癌細胞 - 炎症細胞間の生化学的カスケードが構築され、癌細胞 - 基底膜間の接着に影響を与えている可能性が考えられる。今後は後続の研究課題[研究課題/領域番号:23K14469]を通じて、MRP2 の肺腺癌における発現の臨床病理学的な意義を探索していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Yunjung Kim, Aya Shiba-Ishii, Tomoki Nakagawa, Tomoyo Takeuchi, Hitomi Kawai, Ryota Matsuoka, Masayuki Noguchi, Noriaki Sakamoto	4. 巻 101(5)
2. 論文標題 Gene expression profiles of the original tumors influence the generation of PDX models of lung squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 523-553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-021-00529-1	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 -

1. 著者名 Maki Masahiro, JeongMin Hong, Nakagawa Tomoki, Kawai Hitomi, Sakamoto Noriaki, Sato Yukio, Noguchi Masayuki	4. 巻 72
2. 論文標題 Aberrant OCIAD2 demethylation in lung adenocarcinoma is associated with outcome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 496 ~ 505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.13262	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河合 瞳, 吉澤 明彦, 谷田部 恭, 酒井 康裕, 大川 元春, 堀田 一弘, 野口 雅之
2. 発表標題 AI は “肺腺癌の浸潤” をどう判定するか？
3. 学会等名 第62回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河合 瞳, 吉澤 明彦, 谷田部 恭, 酒井 康裕, 大川 元春, 堀田 一弘, 野口 雅之
2. 発表標題 Development of AI diagnosis for the invasion of lung adenocarcinoma; Can AI predict the prognosis?
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河合 瞳, 吉澤 明彦, 谷田部 恭, 酒井 康裕, 大川 元春, 堀田 一弘, 野口 雅之
2. 発表標題 AIによる肺腺癌の浸潤部の判定: AIは組織学的な予後因子を抽出できるか?
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------