

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15670

研究課題名（和文）肺腺癌の治療ターゲットとしての脂質代謝関連因子の病理組織学的検討

研究課題名（英文）Histopathological analysis of lipid metabolism-related factor as a therapeutic target for lung adenocarcinoma

研究代表者

宮田 佳奈（Miyata-Morita, Kana）

帝京大学・医療技術学部・講師

研究者番号：60893641

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）： 癌細胞は増殖や浸潤のエネルギー源に脂質を利用する。本研究では、肺腺癌の細胞質に存在する小型脂肪滴表面のperilipin 2が脂質の貯蓄や分解に影響を及ぼすか、さらに癌細胞の機能にどのような影響を及ぼすか、を明らかにするため研究を行った。病理組織学的解析では、perilipin 2を高発現する肺腺癌は予後不良であり、ステージが進行した症例であることを明らかにした。また、肺腺癌培養細胞株では、肺腺癌のperilipin 2発現の低下により増殖能、移動能が低下し、エネルギー源である脂質を蓄えている脂肪滴は減少していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌治療において、切除不能例や再発例でdriver mutationをもつ症例は分子標的治療の適応となるが、適応とならない症例も多く存在する。本研究では肺腺癌においてperilipin 2が予後不良因子となることや、perilipin 2の発現が増殖能、移動能、脂肪滴の形成に影響を及ぼすことを明らかにした。今後、さらに癌の脂質代謝機構を解明することで、治療適応とならない進行した原発性肺腺癌における新たな治療標的の開発に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）： Cancer cells use lipids for cellular energy to facilitate proliferation and invasion. The purpose of this study was to clarify whether perilipin 2 on immature lipid droplets affects lipid storage and degradation, thus affecting the function of lung adenocarcinoma cells. In immunohistological analysis, high expression of perilipin 2 in lung adenocarcinoma cells was significantly associated with a higher pathological stage and a poor prognosis. In vitro, suppression of perilipin 2 expression decreased intracellular lipid droplets and reduced cell proliferation and migration in lung adenocarcinoma.

研究分野：呼吸器病理学

キーワード：肺腺癌 脂肪滴 Perilipin 2 脂質代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在の肺癌治療において、切除不能例や再発例で driver mutation をもつ症例は分子標的治療の適応となる。日本人肺腺癌患者の 74.9 %には何らかの遺伝子変異がみられるが、分子標的治療の適応とならない例も多い (Saito M, et al. 2016)。そこで、肺腺癌における新たな治療標的を見出すことを目標とし、本研究では癌細胞のエネルギーの貯蔵、細胞膜の合成、シグナル分子の生成に利用される「脂質」に着目した。

細胞の細胞質内には、エネルギー源の1つであるトリグリセリドを蓄える脂肪滴が存在する。脂肪滴表面には、脂質の貯蓄や分解を制御する perilipin が結合している。平常状態では perilipin は CGI-58 と結合しており、カテコールアミンの刺激で perilipin がリン酸化されると、CGI-58 は perilipin から遊離し、ATGL と結合することで脂肪分解が開始する。その後、脂肪滴中のトリグリセリドから脂肪酸とグリセロールに分解される過程で、ATGL、HSL、MGL が段階的に作用する。これまでに、ATGL 活性が高くなると癌の増殖が低下するという報告や (Hao Xie, et al. 2020) 活発な癌では MGL が高発現するとの報告もある (Nomura D K, et al. 2009)。また、perilipin 2 が発現する肺腺癌は「予後不良」であるとの報告もあり (Fujimoto M, et al. 2017)、脂質代謝に関する経路は癌治療の新たな標的となる可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

原発性肺腺癌の「脂質」に着目し、脂質代謝に関わる分子の発現が予後に関連するのか、また、治療適応とならない進行した肺腺癌における新たな治療標的となるのか、を明らかにするために本研究を計画した。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学的解析

2010~2016年に帝京大学医学部附属病院で外科的切除を施行し、原発性肺腺癌と診断された214症例の病理組織検体を対象に後方視的解析を行った。各症例の組織検体に対し perilipin 2、ATGL、MGL、Ki-67、p53、E-cadherin の免疫組織化学的解析を行い、表1の基準に従って評価した。Perilipin 2、ATGL、MGL の解析結果と、免疫組織化学的所見や臨床病理学的因子について比較し、統計学的解析を行った。

抗体	評価方法
Perilipin 2	陽性：腫瘍細胞の20%以上
ATGL	0、1+、2+、3+
MGL	0、1+、2+、3+
Ki-67	500個中の陽性細胞の割合
p53	陽性：腫瘍細胞の10%以上
E-cadherin	発現の減弱の有無

表1:免疫組織化学的解析の判定基準

(2) 肺腺癌培養細胞株における癌の機能解析

免疫組織化学的解析より、perilipin 2 の発現と肺腺癌患者の病期や予後の間に有意な関連を認めた。次いで、肺腺癌培養細胞株 (A549、PC-9) を用いて perilipin 2 ノックダウン (ND) 細胞を作製し、perilipin 2 の発現が肺腺癌の増殖、浸潤、遊走能等の機能に及ぼす影響を検討した。

Proliferation assay

96 ウェルプレートに細胞を播種 (A549; 0.375×10^3 個/ウェル、PC-9; 0.75×10^3 個/ウェル) し、24、48、72 時間後に細胞増殖試薬 WST-1 を加えて 2 時間、37 °C で反応後、マイクロプレートリーダーで OD 440、600nm を測定した。

Wound healing assay

6 ウェルプレートに細胞を播種 (A549; 1.5×10^4 個/ウェル、PC-9; 3×10^4 個/ウェル) し、コンフルエントになるまで 37 °C でインキュベーションを行った。200 μ l チップでスクラッチし、経時的にスクラッチ幅の短縮を測定した。

Migration assay

24 ウェルのカルチャーインサート上部に無血清培地と 2×10^4 個/ウェルの細胞を播種し、下部には血清入り培地を加え 37 °C でインキュベーションした。24 時間後、ギムザ染色を行い、遊走細胞数を比較した。

Invasion assay

24 ウェルのマトリゲルインベーションチャンバー上部に無血清培地と 3×10^4 個/ウェルの細胞を播種し、下部には血清入り培地を加え、37 °C でインキュベーションした。24 時間後、ギムザ染色を行い、浸潤細胞数を比較した。

4 . 研究成果

(1) 免疫組織化学的解析

脂質代謝関連因子である perilipin 2、ATGL、MGL について免疫組織化学染色を行ったところ、perilipin 2 陽性症例は分化度は低く、高い Ki-67 index、p53 変異、E-cadherin の発現低下と有意な関連があることがわかった (図 1)。また、perilipin 2 を高発現する肺腺癌は、脈管・リンパ管侵襲、胸膜浸潤や上皮間葉転換と関連し、高悪性度、ステージが進行した症例で多く、無増悪生存期間が有意に短い傾向を示していた。

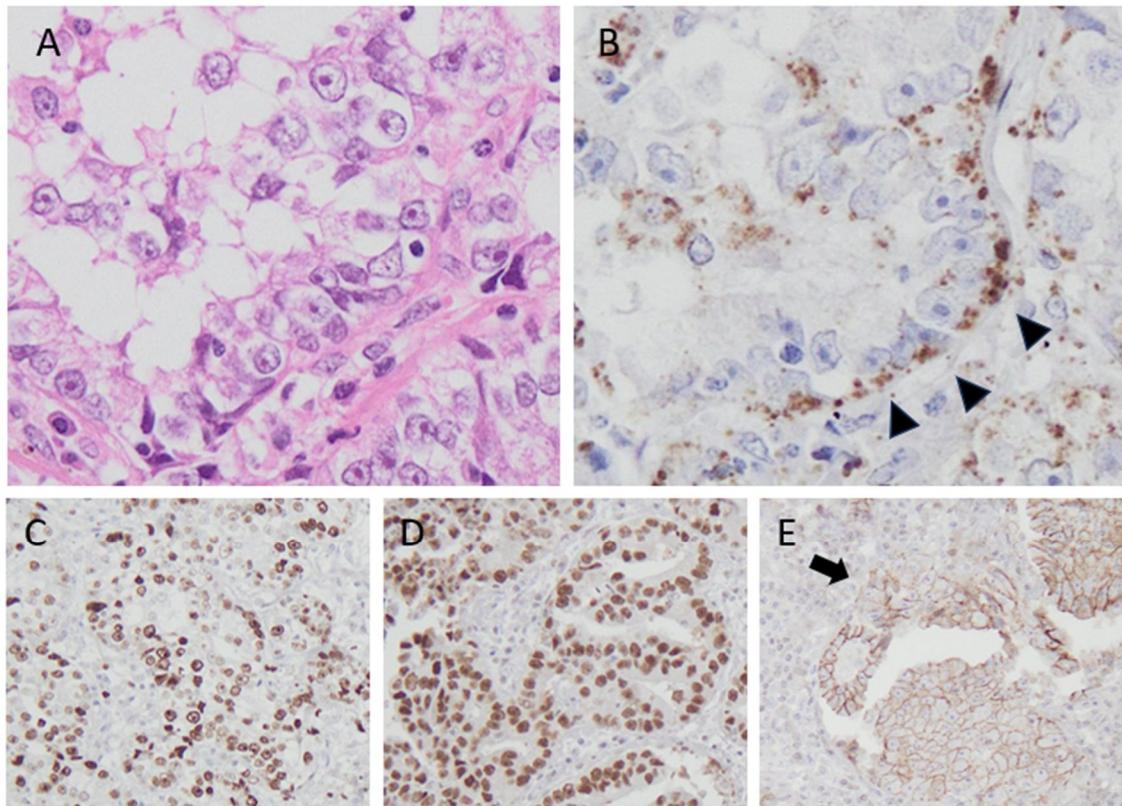


図 1: 免疫組織化学

A: HE 染色、B: Perilipin 2。腫瘍細胞の基底膜側に陽性像がシフトする特徴的な組織像を示した (矢頭)、C: Ki-67、D: p53、E: E-cadherin。E-cadherin の減弱を矢印で示す。

(2) 肺腺癌培養細胞株における癌の機能解析

肺腺癌培養細胞株 (A549、PC-9) の perilipin 2 ND 細胞および negative control 細胞における perilipin 2 の発現は蛍光抗体法 (図 2) 及びウエスタンブロッティング法で確認した。Perilipin 2 の発現を低下させた細胞株では、増殖能、移動能はともに低下しており、脂肪滴の数は減少していた。浸潤能は PC-9 のみ低下がみられた。

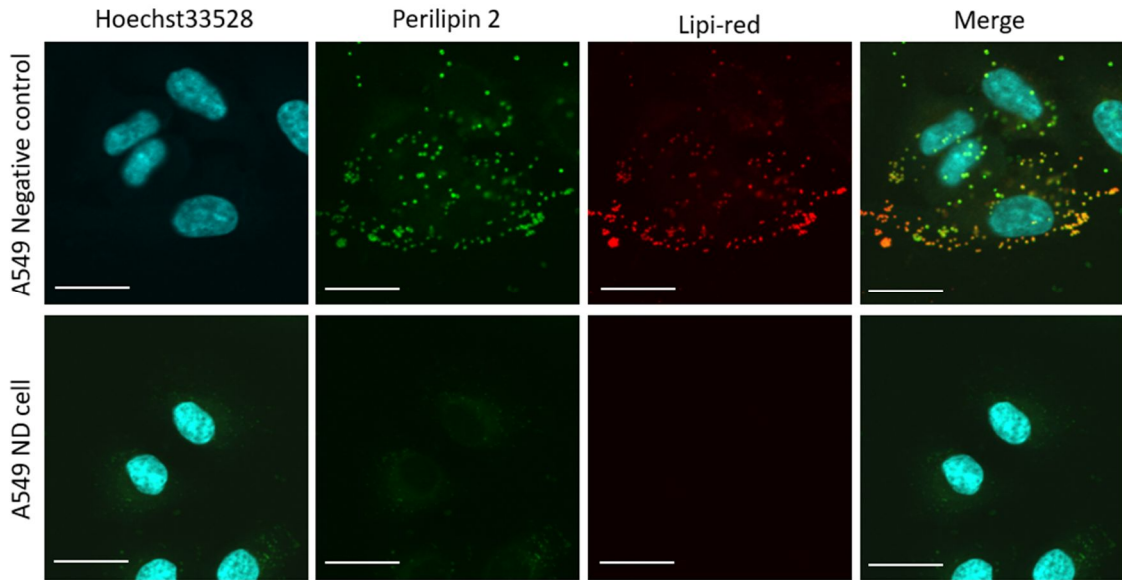


図 2: 蛍光抗体法 (A549)

A549 negative control 細胞と比較し、A549 ノックダウン (ND) 細胞では perilipin 2 と脂肪滴 (Lipi-red) の発現の低下が見られた。(Bar, 20 μ m)

以上より、肺腺癌において perilipin 2 の発現は予後不良因子となることや、培養細胞株を用いた実験では perilipin 2 の発現が増殖能、移動能、脂肪滴の形成に影響を及ぼすことを明らかにした。今後、さらに癌の perilipin 2 を初めとする脂質代謝機構を解明することで、治療適応とならない進行した原発性肺腺癌患者に対する新たな治療標的の開発に貢献することができると考えられる。

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 Miyata Kana, Morita Shigeki, Dejima Hitoshi, Saito Koji, Sakao Yukinori, Mochizuki Makoto, Sasajima Yuko	4. 巻 -
2. 論文標題 Cytological features of stromal spindle cells and their prognostic significance in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cytopathology	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） 10.1111/cyt.13232	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮田佳奈、森田茂樹、出嶋仁、斉藤光次、坂尾幸則、笹島ゆう子
2. 発表標題 肺腺癌におけるPerilipin 2の発現と臨床病理学的特徴の検討
3. 学会等名 第64回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------