

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790759

研究課題名（和文） 肺サーファクタント蛋白 SP-A の肺がん進展・転移における役割の解析

研究課題名（英文） The role of surfactant protein A in lung cancer progression and metastasis.

研究代表者

後東 久嗣 (GOTO HISATSUGU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号：00437641

研究成果の概要（和文）：ヒト肺がん細胞株を用いて SP-A 強制発現株を作成し、SP-A の肺がん進展における役割を解析した。強制発現株では、1. マウスモデルにおいて肺転移および胸水産生能の低下、2. 腫瘍内に集積したマクロファージ数の増加、3. マクロファージの中でも抗腫瘍活性をもつ M1 マクロファージの増加、が認められた。SP-A はマクロファージの極性を抗腫瘍作用を持つ M1 へと誘導し、肺がん進展に抑制的に働くことが考えられた。

研究成果の概要（英文）：Human SP-A gene was introduced into the human lung adenocarcinoma cell line, and *in vivo* effect of SP-A over-expression on cancer progression was examined in experimental mouse model. Lung tumor produced by SP-A over-expression cells had; 1. less tumor burden and pleural effusion, 2. increased number of infiltrated macrophages, 3. increased number of M1 macrophages (anti-tumor macrophages). SP-A may have a protective role in lung cancer progression through modulating host immune response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺がん、サーファクタント

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺がんは本邦でも男性のがん死亡率第一位となっており、その予後は極めて不良である。肺がんの難治化の原因の一つとして、診断時にすでに遠隔臓器に転移している場合が多く（約 70%）、肺内転移の頻度も高率に見られる。したがって、肺がんの克服には肺内進展と転移形成における分子機構の解明並びに肺がん進展に関わる分子を標的と

した生物学的制御法を検証していくことが必要不可欠である。申請者らのグループは、以前に肺がんの遠隔転移形成機構の解明を目的として、免疫不全マウスを用いた臨床を反映するヒト肺がん細胞株の多臓器転移モデルを確立した。今後、同モデルを用いることで肺がん克服のために実地臨床を反映した様々な基礎的研究が可能であると考えている。

(2) サーフアクトントは肺胞内腔を覆う脂質・蛋白質の複合体であり、蛋白質成分は Surfactant protein (SP)-A, -B, -C, -D に分類される。SP-B, -C は肺胞での気相-液相境界の表面張力を低下させ肺胞虚脱を防ぐ効果が知られているが、近年、SP-A, -D を中心に生体防御機能も有することが分かってきた。特に SP-A はオプソニン作用を発揮し、肺胞マクロファージによる病原菌排除を促進すること等が報告されている。ただ、これまでの報告では SP-A の免疫調節作用は感染症領域での研究が主で、その他の呼吸器疾患における SP-A の作用は不明な点が多い。

(3) SP-A は以前より肺腺がんのマーカーの一つとして用いられてきた。最近になり、肺がん細胞における SP-A の発現レベルが予後に関連するという報告がなされてきている。これらの報告は、SP-A が肺がんの単なるマーカーとしてではなく、肺という特殊な臓器微小環境条件下でがん化やがんの増殖・進展に関与している可能性を示唆しているものであり、その解明が求められる。

2. 研究の目的

本研究課題では、肺内微小環境下で肺がんの増殖・進展・転移における SP-A の役割とその作用機序について、主に申請者らがこれまで構築したマウスモデルを用いて解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各種ヒト肺がん細胞株から mRNA および蛋白質を抽出し、SP-A 発現レベルを real-time PCR 法および Western blot 法にて比較検討後、SP-A 低発現株に対してレトロウイルスを用いた遺伝子導入法により SP-A 遺伝子を導入し強制発現株を作成した。

(2) 得られた強制発現株を用いて、*in vitro* における細胞増殖能、遊走能に対する SP-A の効果を MTT 法およびダブルチャンバー法で検討した。

(3) 免疫不全 (ヌード) マウスを用いたヒト肺がん細胞株肺転移モデルを用いて、*in vivo* における肺がん肺転移に対する SP-A の関与を検討した。作成した強制発現株をヌードマウスに経静脈的に摂取し (マウス 1 匹あたり 1×10^6 細胞)、接種後 28 日目に形成された肺転移や胸水産生の程度を、転移数や臓器重量を測定することでコントロール細胞 (ベクター導入株) と比較検討した。

(4) 得られた肺転移巣を用いて凍結切片作成や RNA 抽出を行い、各種免疫染色および RT-PCR に供することで SP-A の肺がん進展・転移における分子生物学的役割を検討した。

4. 研究成果

(1) 各種ヒト肺がん細胞株から mRNA および蛋白質を抽出し、SP-A 発現レベルを real-time PCR 法および Western blot 法にて比較検討した。Positive control として用いた H441 細胞以外の細胞株では SP-A の発現は認められなかった (図 1)。

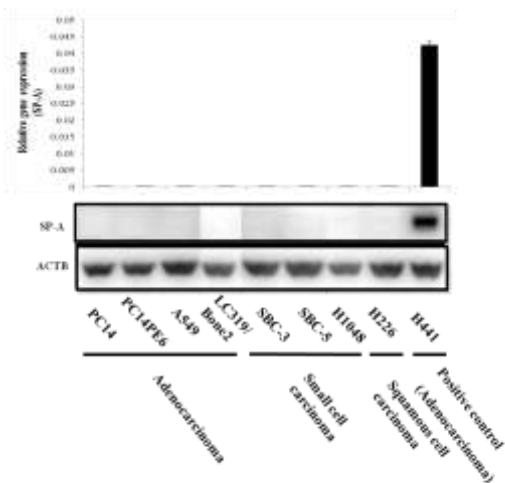


図1 各種ヒト肺がん細胞株におけるSP-A発現レベル
上段:RT-PCR 下段:Western Blot

(2) 上記細胞株の中から、マウスモデルにおいて肺転移および胸水産生をきたすことが判明している PC14PE6 細胞を選択し、レトロウイルスを用いた遺伝子導入法により SP-A 遺伝子を導入し強制発現株を作成した (図 2)。

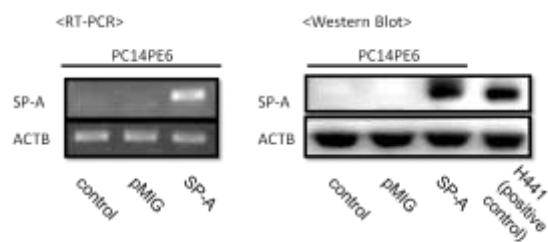


図2 SP-A強制発現株の作成

得られた強制発現株を PC14PE6/SP-A、コントロールとして vector 導入株を PC14PE6/pMIG とした。

(3) 得られた強制発現株を用いて、*in vitro* における細胞増殖能、遊走能に対する SP-A の効果を MTT 法およびダブルチャンバー法で検討した (図 3)。結果、SP-A 遺伝子導入による細胞増殖能および遊走能には変化が認められなかった。

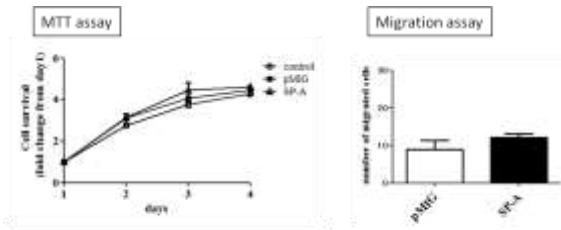


図3 SP-A遺伝子導入による細胞増殖 (MTT assay) および遊走能 (Migration assay) の変化

(4) ノードマウスを用いたヒト肺癌細胞株肺転移モデルを用いて、*in vivo*における肺癌肺転移および胸水産生に対する SP-A の関与を検討した。作成した強制発現株をノードマウスに経静脈的に摂取し (マウス 1 匹あたり 1×10^6 細胞)、これにより形成された肺転移や胸水産生の程度を、転移数や臓器重量を測定することでコントロール細胞 (ベクター導入株) と比較検討した (図 4)。結果、SP-A 強制発現株はコントロール (pMIG) と比較して有意に肺転移形成能および胸水産生能の低下が認められた。

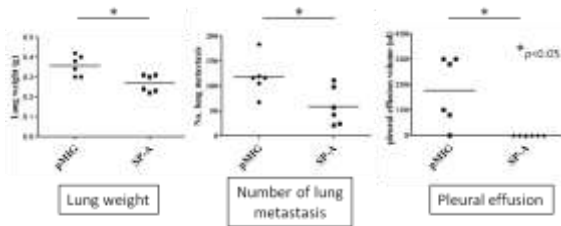


図4 *In vivo* における SP-A の肺転移形成および胸水産生に対する影響

(5) 次に、得られた肺転移巣を用いて凍結切片を作成し、免疫染色にて SP-A の肺癌進展・転移における分子生物学的役割を検討した。図 3 で示したように、SP-A による肺癌細胞への直接的影響は低いと考えられたため、宿主側の腫瘍微小環境、特に腫瘍進展に深く関与するとされている腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophages; TAMs) に注目し、抗 CD68 抗体を用いた免疫染色で TAMs の腫瘍内浸潤の程度を比較検討した (図 5)。結果、SP-A 強制発現株により形成された腫瘍では、コントロール (pMIG) と比較して有意に多数のマクロファージが浸潤していることが判明した。

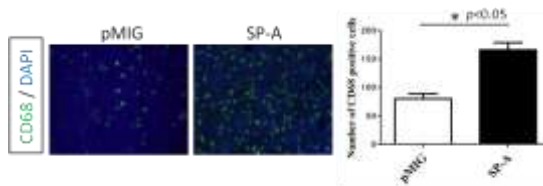


図5 SP-Aの腫瘍内浸潤マクロファージへの影響

(6) さらに TAMs の極性についても検討を行った。TAMs はその生物学的性質から M1 (抗腫瘍性マクロファージ) と M2 (腫瘍進展性マクロファージ) の 2 つの極性に分類され、これらの極性のバランスが腫瘍進展に大きく関わるとされている。これまでの本研究の結果から、SP-A 強制発現株は腫瘍形成能が抑制されており、また浸潤した TAMs 数が多いことから、我々は SP-A 強制発現株により形成された腫瘍内では抗腫瘍性マクロファージである M1 が増加していると仮定し、免疫染色を用いて確認した。具体的には M1 マクロファージを TNF- α /CD68 で、M2 マクロファージを MRC-1/CD68 で 2 重染色し、これらの腫瘍内におけるバランスを比較検討した (図 6)。結果、予想通り SP-A 強制発現株による腫瘍内では有意な M1 の増加と M2 の減少が認められた。

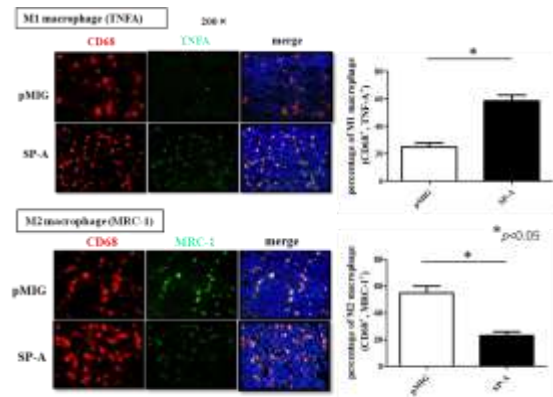


図6 腫瘍内における M1 および M2 マクロファージのバランス

(7) 上記免疫染色で得られた結果を確認するために、肺転移巣から RNA 抽出を行い RT-PCR に供することで SP-A が M1 誘導因子の発現を亢進させるか否かについて検討した (図 7)。結果、SP-A 強制発現株により形成された腫瘍では、INF- γ や CCL5 等の複数の M1 誘導因子の発現亢進が認められた。一方、M2 誘導因子については有意な増加は認められなかった。

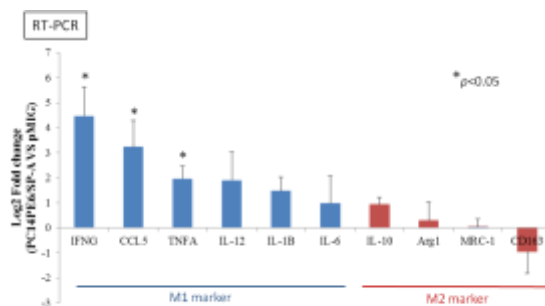


図7 肺転移巣内での M1/M2 マーカーの発現

以上の結果から、SP-Aは腫瘍内に浸潤したマクロファージの極性を抗腫瘍作用を有するM1へと誘導し、肺がん進展に抑制的に働くことが示唆された。今後は、さらにSP-Aの腫瘍微小環境に与える影響を検証し、その分子生物学的メカニズムを解明することで肺がん制御に向けた糸口を見つきたいと考えている。

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)

[雑誌論文] (計3件)

①Gabr AG, Goto H, Hanibuchi M, Ogawa H, Kuramoto T, Suzuki M, Saijo A, Kakiuchi S, Trung VT, Sakaguchi S, Moriya Y, Sone S, and Nishioka Y. Erlotinib prevents experimental metastases of human small cell lung cancer cells with no epidermal growth factor receptor expression. Clin Exp Metastasis. 2012 Mar;29(3):207-216. 査読有

② Goto H, Hanibuchi M, Sakaguchi S, Kanematsu T, Kakiuchi S, Tomimoto H, Azuma M, Tezuka T, Tada H, Miki Y, Nakamura T, Sone S, and Nishioka Y. Investigation of the outpatient chemotherapy for lung cancer patients in Tokushima University Hospital. J Med Invest. 2011 Aug;58(3-4):219-226. 査読有

③Ogino H, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Trung VT, Goto H, Ikuta K, Yamada T, Uehara H, Tsuruoka A, Uenaka T, Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yano S, Nishioka Y, and Sone S. E7080 suppresses hematogenous multiple organ metastases of lung cancer cells with nonmutated epidermal growth factor receptor. Mol Cancer Ther. 2011 Jul;10(7):1218-1228. 査読有

[学会発表] (計2件)

① 三橋 惇志、Surfactant protein A suppresses progression of human lung adenocarcinoma in nude mice via modulating host immune response. 第52回日本呼吸器学会学術講演会、2012.4.21、神戸コンベンションセンター (神戸市)

② 三橋 惇志、Surfactant protein A suppresses progression of human lung adenocarcinoma in an experimental lung metastasis model. American Thoracic

Society International Conference 2011、2011.5.17、コロラドコンベンションセンター (アメリカ合衆国デンバー)

[図書] (計1件)

後東久嗣、レスピレーションリサーチファンデーション、呼吸、2012、100

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後東 久嗣 (GOTO HISATSUGU)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師
研究者番号：00437641

(2) 研究協力者

三橋 惇志 (MITSUHASHI ATSUSHI)
徳島大学・大学院学生医科学教育部医学専攻2年生