

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月5日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659189

研究課題名（和文）微小乳頭癌における分子標的の同定と治療への応用

研究課題名（英文）Identification of molecular target and its therapeutic application for micropapillary adenocarcinoma

研究代表者 仁木利郎 (NIKI TOSHIRO)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90198424

研究成果の概要（和文）：微小乳頭癌の *in vitro* ならびに *in vivo* モデルの作製を行った。40種類の肺癌細胞株に対して低付着性培養皿上で長期浮遊培養を行い、24種の細胞において微小乳頭状の集塊形成が認められた。長期浮遊培養可能であった微小乳頭状集塊を形成する5種類の亜株について、NOD/SCID マウスの胸腔内に移植したところ、腫瘍形成能、脈管侵襲能あるいは浸潤・転移能の増強が認められた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we sought to generate *in vitro* and *in vivo* model of micropapillary adenocarcinoma by long-term culture on low-binding culture dish. Of the 40 lung adenocarcinoma cell lines, we observed micropapillary clusters in 24 cell lines. We injected 5 micropapillary variant sublines as well as its parental counterpart in the skin and thoracic cavity of NOD/SCID mice. Micropapillary variant showed increased tumorigenicity, lymphovascular invasion, or metastatic potential as compared to parental counterpart when injected into thoracic cavity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：人体病理

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理

キーワード：肺腺癌、

1. 研究開始当初の背景

微小乳頭癌は、乳癌、肺腺癌において近年導入された新しい組織亜型である。通常の乳頭腺癌と異なり、腫瘍細胞の小クラスター中に血管性の間質がなく、肺胞内あるいは間質中に浮遊しているように見える組織像が特徴とされる。微小乳頭癌成分を有する癌はリンパ管侵襲が強く予後不良であるが、微小乳頭癌の形態的基盤となる分子機構は未だ不明であり、有効な治療法は現在知られていない。

2. 研究の目的

本研究では、低接着性の培養皿上で長期培養することにより、微小乳頭癌の *in vitro* モデルならびに *in vivo* 転移モデルを作製し、次いで微小乳頭癌に対する分子標的の同定を目指す。

3. 研究の方法

これまでわれわれが解析してきた非小細胞癌細胞40株（肺腺癌を主体とするパネル）を用いた(Nakamura Y, Niki T, et al. Cancer Sci 2008; Matsubara D, Niki T, et al. Am J Pathol 2010; Matsubara D, Niki T, et al. J Thorac Oncol 2010)。これらの細胞株の遺

伝子発現プロファイル、コピー数などの解析はすでに解析しデータは取得されている40株のドライバー変異は、KRAS (n=11), EGFR (n=5), MET (n=3), HER2 (n=2), BRAF (n=2), EML4-ALK (n=1), Others (n=16)であり、肺腺癌の臨床検体での多様性をよく反映している。

これらの癌細胞を低接着培養皿に播種し2-4ヶ月培養した。細胞は適宜回収してセルブロックを作製し、HE染色、免疫染色を行った。5 x 10⁶の細胞を免疫不全マウス (NOD/SCID mouse)の皮下あるいは胸腔内に接種し、4-6週後に組織標本を作製した後、形成された腫瘍の形態、浸潤性を評価した。

4. 研究成果

(1) 浮遊培養細胞の形態的特徴

40株を非接着性の培養皿に播種すると3~10日でさまざまな形状の集塊形成が観察された。これらの集塊 (spheroid) を Bissellらの分類 (MoI Oncol 2007)を参考にし、round (n=15)、irregular round (n=12)、grape-like (n=13)と分類した (Fig. 1)。以前われわれは、肺腺癌の細胞株が、気管支上皮型 (n=23)、間葉系型 (n=17)に分類されることを報告してきた (Matsubara, Niki et al. Am J Pathol 2010)。気管支上皮型は気管支上皮の分化形質を有しているが、間葉系型では上皮の分化形質が失われ、ビメンチンの高発現など上皮間葉移行 (EMT, epithelial mesenchymal transition) の形質を示す。Round spheroid は上皮の形質を反映した形態として理解されるが、気管支上皮型はほぼすべての細胞が round spheroid を形成し、逆に grape-like spheroid を形成するものは、すべて間葉系型であった。気管支上皮型でただ1つ grape-like spheroid を形成するのは PC9 という細胞であるが、この細胞は α -catenin の欠失を有することが判明している (Shimoyama, Hirohashi, Takeichi et al. Cancer Res 1992; Cell 1992)。

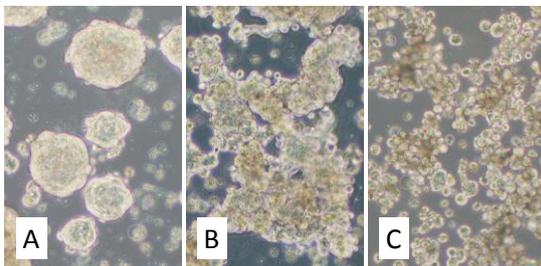


Fig. 1 浮遊培養でのスフェロイドの形態
A. round, B. irregular round, C. grape-like

(2) 長期浮遊培養による変化

40株全例について、非接着性の培養皿で2か月間培養を継続し、その間における形態変化を観察した。比較的早期から増殖を開始する株 (n=5)、一定の lag-time をおいた後、3週~8週の間には再増殖を示す株 (n=15) が認められた。比較的早期から増殖を開始する株はすべて grape-like spheroid を形成する細胞であった。

全培養期間を通じ、約半数あまり (n=24) の細胞において、微小乳頭集塊の形成がみられた。その内訳は、気管支上皮型由来 (n=15)、間葉系型由来 (n=9) であった。気管支上皮型由来のものが多いが、間葉系型の形質を示す細胞株でも一部の細胞は微小乳頭集塊を形成してくることがわかる。微小乳頭集塊の形成がみられた細胞の例を示す (Fig. 2)。

微小乳頭集塊を形成する細胞の多くは (n=20)、経過観察中、徐々に細胞間接着が低下し個細胞性になった細胞の出現もみられた (Fig. 2)。また細胞集塊に内部が空洞化し囊胞状を呈する集塊も観察された (n=8) (Fig. 3)。

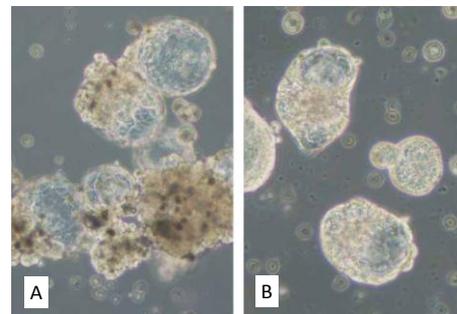
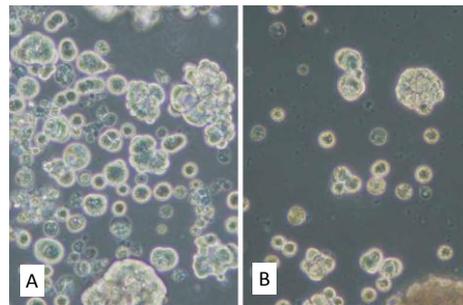


Fig. 2 浮遊培養でみられる微小乳頭集塊
A. LC-2/ad, B. H222

Fig. 3 浮遊培養でみられる空洞形成
A. RERF-LC-AD1, B. H2087

(3) セルブロック法による検討

位相差顕微鏡による観察結果をさらに検証するため、浮遊培養した細胞をコラーゲンゲルに播きこみ、セルブロックを作製し、ホルマリン固定、パラフィン包埋切片にて細胞集塊の形態を観察した。

微小乳頭集塊のみられた細胞 (Fig. 4)、微小乳頭集塊のなかに空洞形成のみられた細胞 (Fig. 5)の代表的な像を示す。細胞集塊の周囲には個細胞性の細胞もみられるが、同様の像は臨床検体での微小乳頭形態を示す肺腺癌組織でも認められた。

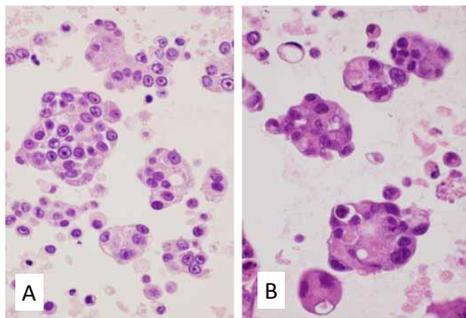


Fig. 4 微小乳頭集塊のセルブロック標本 A. HCC4006, B. H441 (HE染色)

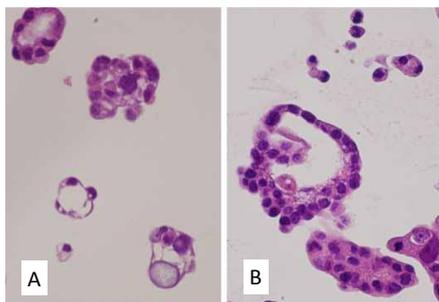


Fig. 5 空洞形成を示す集塊のセルブロック標本

A. LC-2/ad, B. RERF-LC-AD1 (HE染色)

個細胞性の細胞の出現は、細胞間の接着の低下、すなわち E-cadherin-catenin 系の失活を示唆する。そこでセルブロック法でえられた切片で E-cadherin と β -catenin の免疫染色をおこなったところ、形態的に細胞間の接着の低下した部分に一致して E-cadherin と β -catenin の低下が確認された (Fig. 6)。

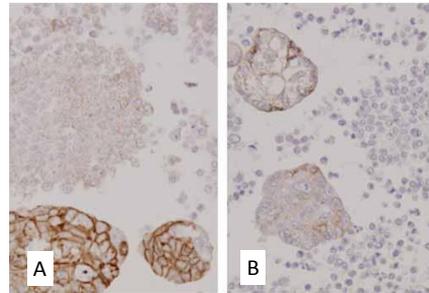


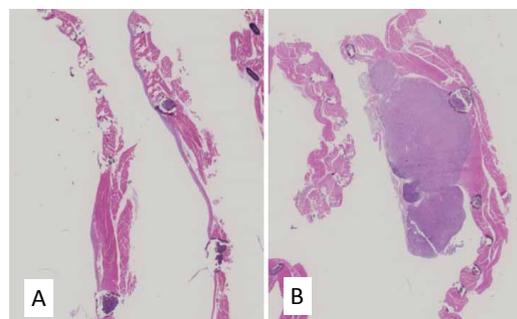
Fig. 6 長期の浮遊培養でみ

られた E-cadherin-catenin 系の発現低下
A. E-cadherin, B. β -catenin (HCC827)

(4) 免疫不全マウスへの接種実験

微小乳頭集塊を形成した細胞のなかから、浮遊状態で増殖能を獲得した亜株が 10 株あった。親株の末尾に“-FL” (FL: Float の略称) を付け、これらの亜株を呼ぶことにした。HCC4006 (EGFR mutant)、H441 (KRAS mutant)、H2009 (KRAS mutant)、L27 (MET amplified)、ABC1 (driver mutation, unknown) の 5 株由来の亜株を選び免疫不全マウスの皮下と胸腔内に接種した。それぞれの親株についても同様の接種を行い比較した。

当初の予想と反して、皮下に接種した場合、親株と亜株の間に明らかな違いはみられなかった。しかし、胸腔内に接種した場合、親株よりも大きな腫瘍を形成する細胞が 2 株 (H441-FL, L27-FL) みられた (Fig. 7)。さらに組織学的に腫瘍臓器を観察したところ、肺内にリンパ管侵襲、血管侵襲、あるいは微小な転移を形成するものが 3 株みられた



(HCC4006-FL, H441-FL, ABC1-FL) (Fig. 8, 9)。

Fig. 7 胸腔内移植でみられた親株と亜株の腫瘍形成能の違い

A. H441 (親株), B. H441-FL (浮遊系亜株)

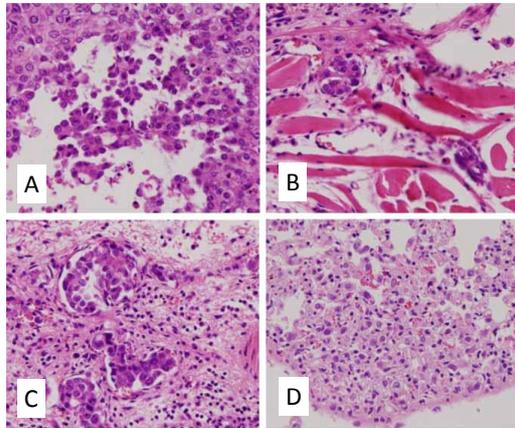


Fig. 8 胸腔内移植でみられた浮遊系亜株の形態と転移像 (ABC1-FL)

A. 胸壁での微小乳頭像, B. 胸壁でのリンパ管侵襲像, C. 肺内にみられたリンパ管侵襲像, D. 臓側胸膜にみられた播種像

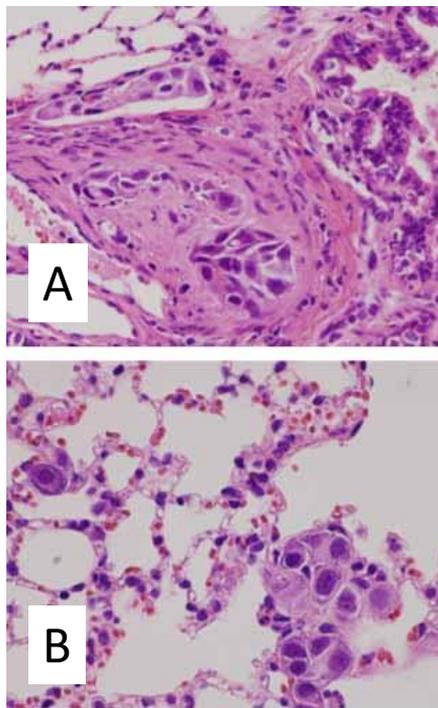


Fig. 9 胸腔内移植でみられた浮遊系亜株の形態

と転移像 (HCC4006-FL)

A. 肺内にみられた脈管侵襲像 (リンパ管および血管内に癌の集塊がみられる), B. 肺内にみられた微小転移像

今回示した組織像は、微小な脈管侵襲、転

移部であるが、興味あることに主腫瘍の部分ではすべて線維性間質に富んでおり、従来のPC9, H460などに比べてヒトの肺腺癌の組織像に類似していた。現時点で、HCC4006-FL (EGFR mutant), H441-FL (KRAS mutant), L27-FL (MET mutant)など、異なるドライバー変異を有し、かつヒトの肺腺癌に近い形態を示す xenograft のモデルが得られたことになるが、今後さらに、LC-2/ad (RET fusion), H2228 (ALK fusion)でも同様の手法でヒトの肺腺癌に近いモデルを作製したいと考えて実験を進めている。また得られた亜株と親株を遺伝子レベルで比較することにより、分子標的になるような遺伝子異常の同定を継続して行っている。

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5件)

- ① Matsubara D, Niki T (13th of 13). Lung Cancer with Loss of BRG1/BRM, shows Epithelial Mesenchymal Transition Phenotype and Distinct Histologic and Genetic Features. *Cancer Sci* 2013;104:266-273.
- ② Matsubara D, Niki T (14th of 14). Identification of CCDC6-RET Fusion in the Human Lung Adenocarcinoma Cell Line, LC-2/ad. *J Thorac Oncol*. 2012;7:1872-1876.
- ③ Matsubara D, Niki T. Epidermal growth factor receptor mutation and chemosensitivity. *J Thorac Oncol* 2012;4:771-772. (査読あり)
- ④ Terasaki H, Niki T (5th of 8). Lung Adenocarcinoma, Mixed Subtype: Histopathologic Basis for High-Resolution Computed Tomography Findings. *J Thorac Imaging* 2011; 26:74-81. (査読あり)
- ⑤ Goto A, Niki T (4th of 17). Human papillomavirus infection in lung and esophageal cancers: Analysis of 485 Asian cases. *J Med Virol*. 2011;83:1383-1390. (査読あり)

[学会発表] (計9件)

- ① Matsubara D, Niki T (5th of 5). Histopathologic and genetic features of lung adenocarcinomas with loss of chromatin remodeling factors, BRG-1 and BRM. Annual Meeting of American Association for Cancer Research (poster presentation), Chicago, 2012
- ② 仁木 利郎、松原 大祐、石川 俊平、

深山 正久：KRAS 変異，EMT 形質を有する肺腺癌細胞の薬剤感受性。第 53 回日本肺癌学会総会、岡山、2012 年 11 月 8 日-9 日

- ③ 松原 大祐、喜舎場由香、石川 俊平、村上 善則、油谷 浩幸、深山 正久、仁木 利郎：原発性肺腺癌におけるクロマチンリモデリング因子 BRG1 及び BRM の欠損と上皮間葉系転換との関連性について。第 53 回日本肺癌学会総会、岡山、2012 年 11 月 8 日-9 日
- ④ 喜舎場由香、松原大祐、仁木利郎：肺腺癌における Snail の発現についての免疫組織学的検討。第 101 回日本病理学会、京王プラザホテル、2012 年 4 月 26 日-28 日。
- ⑤ Matsubara D, Niki T (4th of 4). Expressions of bronchial epithelial markers correlate with morphology and genetic abnormalities in lung adenocarcinoma. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (poster presentation), Nagoya, 2011.
- ⑥ Niki T, Matsubara D, Ishikawa S, Fukayama M. Three dimensional culture reveals genetic-morphologic correlations that may be relevant to classification of lung adenocarcinomas. 14th World Conference of Lung Cancer (poster presentation), Amsterdam, 2011.
- ⑦ Matsubara D, Niki T (4th of 4). Lung adenocarcinomas show genetic-morphologic correlations in three dimensional culture. Annual Meeting of American Association for Cancer Research (poster presentation), Orlando, 2011.
- ⑧ 松原大祐、石川俊平、深山正久、仁木利郎。肺腺癌細胞株の遺伝子発現データに基づく分類と、3次元培養下の細胞形態、遺伝子異常の関連性について。第 100 回日本病理学会総会、東京、ポスター発表、2011 年 4 月 28-30 日。
- ⑨ 松原大祐、石川俊平、深山正久、仁木利郎。一般示説（病理）：肺腺癌症例の気管支上皮マーカーの発現に基づく分類：組織学的形態、遺伝子異常、EGFR, MET の活性化との関連。第 52 回日本肺癌学会総会、大阪、2011 年 11 月 3 日-4 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.jichi.ac.jp/pathol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仁木利郎 (NIKI TOSHIRO)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：90198424

(2) 研究分担者

松原大祐 (MATSUBARA DAISUKE)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：80415554