

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670178

研究課題名(和文)肺腺癌の系統的転移モデルの作製

研究課題名(英文)Systemic generation of metastatic models of lung 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR, KRAS, ALK, METなど、さまざまなドライバー変異を有する肺腺癌細胞を左心室内に接種し、系統的に肺癌転移モデルを作製した。また一部の細胞については、低接着培養条件下にて長期浮遊3次元培養することにより、浮遊状態で増殖し通常の培養条件では再接着する能力を有する亜株(FL株)を作製するとともに、FL株が親株よりも高い転移能を有することを明らかにした。さらに親株とFL株の包括的な遺伝子解析を行い、FL株において発現変動のある転移関連遺伝子、あるいはFL株で遺伝子増幅を示すゲノム領域を同定した。今回作成したさまざまな転移モデルは、転移形成の分子機構を探るうえで有効な手法と考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established a series of mouse models of lung cancer metastasis by intracardiac inoculation of lung adenocarcinoma cell lines harboring various driver mutations, such as EGFR, KRAS, ALK, and MET. We also generated subclones that has the ability to grow in suspended condition but reattach in ordinary culture, by long-term, 3-dimensional culture under low-bind culture conditions. These subclones, designated FL clones, exhibited highly metastatic potential as compared to parental cell lines. We further performed comprehensive genomic analysis of the cell lines (parental and FL cell lines) and identified metastasis-related genes that showed altered expression in FL cells vs. parental cells, and genomic regions amplified in FL cell lines. Thus, the metastatic models created in the present study would be a promising new resource to study the molecular mechanisms of lung cancer metastasis that develop under various genetic background.

研究分野：人体病理

キーワード：肺癌 転移

1. 研究開始当初の背景

分子標的薬あるいは新しい化学療法剤の登場により、肺腺癌の診断、治療は長足の進歩を遂げた。現在肺腺癌は、そのドライバー変異に基づいて有効な治療方針が決められるしかし、治療により一時的に腫瘍が縮小しても完治することはなく、癌の耐性獲得が極めて重要な問題となっている。現在、in vitro あるいは in vivo での効果に基づいたさまざまな耐性克服の方法が提案されているが、臨床試験において満足できる結果はでていない。その理由として、in vivo での効果の検証が皮下移植モデルによっていることが考えられる。薬剤の治療効果が微小環境に影響されることを考えるならば、耐性克服の検証も転移モデルで行う必要がある。しかし、残念ながら、肺腺癌の転移モデルは未だ極めて限られたものしかなく、実際の様々な肺腺癌を反映するような多様な転移モデルはない。

2. 研究の目的

本研究では、さまざまなドライバー変異を背景にもつ肺腺癌細胞を系統的に免疫不全マウスの左心室内に注入し、現実の肺腺癌に近い転移モデルを作製する。肺腺癌には上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異、KRAS 変異、未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) 融合遺伝子など様々なドライバー変異があり、それによって転移のメカニズムも異なることが予想される。そこで本研究では、肺腺癌の代表的ドライバー変異である EGFR, KRAS, ALK, MET, RET の変異株を用いて複数の転移モデルを作製する。

癌の転移のステップとして細胞・基質間の接着低下が重要であると考えられている。また組織形態学的に遊離した浮遊集塊を形成する肺癌は、転移しやすく予後不良であることも判明している。そこで一部の細胞では、長期間、低接着プレートでの培養により選択圧をかけ転移しやすい亜株づくり転移の分子機構について解析を行う。

このようなより現実に近いモデルの遺伝子解析により、転移や耐性克服に向けた解析が可能となり、臨床的な意義は極めて大きいと考える。

3. 研究の方法

細胞培養

実験に用いた肺癌細胞は、HCC4006 (EGFR 変異, ex19 del), H441 (KRAS 変異, G12V), H2009 (KRAS 変異, G12A), A549 (KRAS 変異, G12S), H2228 (ALK 転座), LC-2/ad (RET 転座), H1993 (MET 増幅), ABC-1 (NF1 変異) の 8 株である。細胞培養は 10% 仔牛血清を含む RPMI 1640 を培地に用い、37 °C、5%CO₂ の条件下で培養した。

マウス

実験動物には 8 週齢の NOD.CB17-Prkdcscid/J (NOD/SCID) マウスを用いた。

長期低接着 3 次元培養による亜株の作製

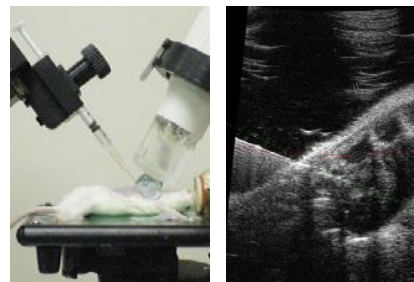
転移のステップとして細胞・基質間の接着低下が重要であると考えられていることから、長期浮遊 3 次元培養することにより高転移性の亜株の作製もあわせて試みた。具体的には、低付着性培養皿で長期間 (2-4 か月) 培養し、浮遊状態でも増殖する亜株を樹立した。低接着の条件下でも一定のペースで継代可能になったものを FL 株とし実験に用いた。

ルシフェラーゼ発現株の作成

蛍光ルシフェラーゼ cDNA を pMCSV-puro retroviral vector に挿入した pMCSV-luc (高崎健康福祉大学、村上孝教授より供与) を用いた。GP2-293 細胞に Lipofection 法にてトランスフェクションした後、15 µg/ml puromycin を含む選択培地で 2 か月ほど培養し、蛍光ルシフェラーゼを安定的に発現する細胞株 (Luc 株) を得た。

左心室内接種による転移モデルの作成

NOD/SCID マウスの左心室内に、0.2ml PBS で懸濁した Luc 株 (5 × 10⁵ 個) をエコー (Vevo770 high resolution US system) ガイド下に接種した (図 1)。接種終了 2 週間後から 1 週間の間隔で、1mg の D-luciferin (Biosynth 社) を腹腔内投与し、非侵襲的に IVISTM (Xenogen 社) で観察することにより、マウス生体内での転移の状況を確認した。8 週間後 (もしくは体重減少を認めた場合や死亡した場合は適宜) に解剖し、各臓器の肉眼的所見、ex vivo での化学発光、組織学的所



見を検討した。

図 1 : エコーガイド下での左心室内接種

4. 研究成果

系統的な転移モデルの作製

左心室内接種により、HCC4006 (EGFR 変異, ex19 del), H441 (KRAS 変異, G12V), A549 (KRAS 変異, G12S), H2228 (ALK 転座), LC-2/ad (RET 転座), H1993 (MET 増幅), ABC-1 (NF1 変異) の 7 株において転移モデルの作成が可能であった。転移は、骨、脳、副腎のような肺癌の転移好発部位に多くみられたほか、歯牙、卵巣、消化管への転移も一部の細胞では認められた。転移の例をいくつか示す (図 2)。

H2009 (KRAS 変異, G12A) については、明らかな転移を認めなかった。

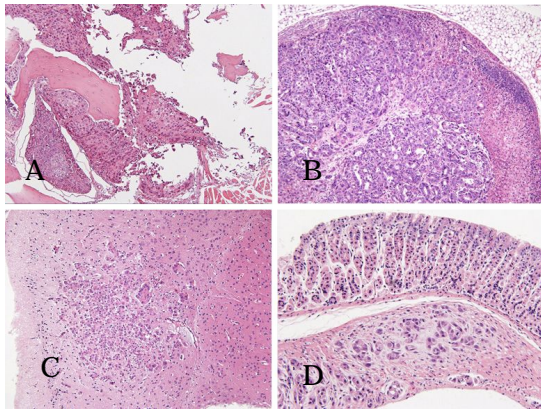


図 2 : A, 骨転移 (H1993); B, 副腎転移 (LC-2/ad); C, 脳転移 (ABC1); D, 胃壁転移 (A549).

高転移株の作製

H441, A549 については、長期浮遊 3 次元培養することにより、浮遊状態でも増殖可能な亜株 (FL 株) を作製することができた。FL 株は通常の培養条件下では再接着し、親株に比して紡錘形への形態変化を示した (図 3)。

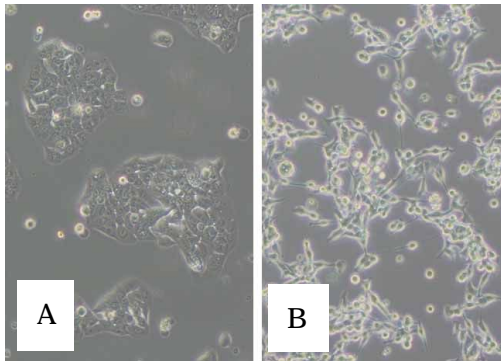


図 3 : A, H441; B, H441-FL

左心室内接種により、A549 は親株、FL 株共に複数臓器に転移を認めたと、FL 株では親株に比し、IVIS で計測した化学発光の光子数が高く、また転移形成までの時間が短い傾向にあった (図 4)。転移臓器数には明らかな差はみられなかった。

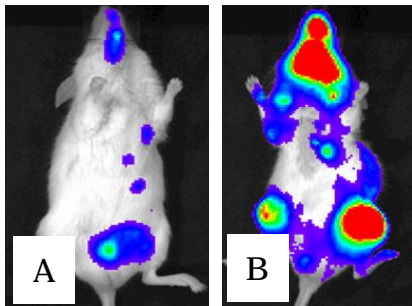


図 4 : A, A549; B, A549-FL

H441 についても親株、FL 株共に複数臓器に転移を認めた。いずれも副腎・卵巣に転移

を形成する傾向にあったが、FL 株では親株よりも転移臓器が多く、また FL 株でのみ脳転移を認めた。

以上、FL 株は親株よりも高い転移能を有していることが複数の細胞株で証明された。

包括的遺伝子解析

次いで、高転移形成の分子機構を探るため、包括的な遺伝子発現、コピー数解析を行い、FL 株の高転移能の原因となっている遺伝子の探索を行った。

1) 遺伝子発現解析 :

Agilent 社の expression array を用いた解析により、親株と FL 株の間で 3 倍以上の発現変動を示す遺伝子を選出した。FL 株で高発現を示す遺伝子のなかには、VEGF-A, MMP-9 などの既知の転移関連遺伝子のほか、新規の転移関連候補遺伝子があった。

次いで GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) を行った。GSEA とはあらかじめ作成された遺伝子セットが遺伝子発現データ中で有意に変動したかどうかを解析する手法である。GSEA 解の結果、FL 株で有意に発現変動を示す遺伝子セットとして、(1) EMT (epithelial-mesenchymal transition), (2) stress-inflammation, (3) NF- κ B, などが選出されてきた。

2) コピー数解析

Agilent 社の CGH マイクロアレイを用いたコピー数解析により、H441-FL で増幅しているゲノム領域を複数同定した。なかでも c-Myc を含む 8q22 領域が目目された。c-Myc は細胞増殖、転写、翻訳、代謝経路などを制御し、癌の発生、進展、転移への関与が考えられている。H441-FL における c-Myc の高発現は、タンパクレベルでもウエスタンブロット法により確認された。

シグナル伝達/転写経路とその阻害実験

遺伝子発現、コピー数解析より得られたデータより、FL 細胞で活性化しているシグナル経路、転写因子を Western blot にて解析した。その結果、(1) EMT については転写因子 Zeb1 を介する経路、(2) stress-inflammation については JNK/p38 の経路が活性化していることが確認された。

次いで、薬理的阻害剤、shRNA vector を用いたノックダウン実験を行い FL 細胞の増殖に与える効果を検証した。JQ1(+) は BRD4 ドメイン阻害剤であり c-Myc 遺伝子増幅を示す細胞の増殖阻害効果が現在注目されている。今回の解析においても、c-Myc の遺伝子増幅を示す H441-FL では、特に浮遊状態で JQ1(+) により効果的に増殖抑制されることが明らかとなった。

考察

さまざまなドライバー変異を有する肺腺

癌細胞株を用いた系統的な転移モデルの作成を行った。今回転移モデルに成功した細胞株のパネルは、主な肺腺癌のドライバー変異をほぼ網羅しており、多様な肺腺癌の転移機構の解明、治療抵抗性獲得の実験など応用範囲は広い。また長期低接着培養株による転移モデルは、接着低下に伴う転移形成の分子機構を探るうえで有効な手法と考えられた。

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9件)

- 1) Sakuma Y, Niki T (9th of 10). Prollyl isomerase Pin1 promotes survival in EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells with an epithelial-mesenchymal transition phenotype. *Lab Invest.* 2016;96:391-398.
- 2) Yoshimoto T, Niki T (7th of 7). Frequent loss of the expression of multiple subunits of the SWI/SNF complex in large cell carcinoma and pleomorphic carcinoma of the lung. *Pathol Int.* 2015;65:595-602.
- 3) Saito S, Niki T (13th of 13). The role of HGF/MET and FGF/FGFR in fibroblast-derived growth stimulation and lapatinib-resistance of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2015 (in press)
- 4) Matsubara D, Niki T (10th of 10). Immunohistochemical analysis of the expression of E-cadherin and ZEB1 in non-small cell lung cancer. *Pathol Int.* 2014;64:560-568.
- 5) Saito S, Niki T (11th of 11). Stromal fibroblasts are predictors of disease-related mortality in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2014;32:348-354.
- 6) Ibrahim R, Niki T (12th of 13). Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma and its significance in epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol.* 2014;45:1397-1405.
- 7) Ui T, Niki T (10th of 11). The HSP90 inhibitor 17-N-allylamino-17-demethoxy geldanamycin (17-AAG) synergizes with cisplatin and induces apoptosis in cisplatin-resistant esophageal squamous cell carcinoma cell lines via the Akt/XIAP pathway. *Oncol Rep.* 2014;31:619-624.
- 8) Sakuma Y, Niki T (12th of 13). Enhanced autophagy is required for survival in EGFR-independent EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells. *Lab Invest.* 2013;93:1137-1146.
- 9) 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.

[学会発表](計13件)

- 1) Yoshimoto T, Matsubara D, Niki T. Altered expressions of multiple subunits of the switch/sucrose non-fermenting (SWI/SNF) complex in Non-small cell lung cancer. AACR special meeting, Atlanta, September 24-27, 2015.
- 2) 松原大祐, 伊東剛, 田中一大, 石川俊平, 後藤悌, 中野智之, 土橋洋, 中島淳, 遠藤俊輔, 深山正久, 関戸好孝, 仁木利郎, 村上善則. 肺癌における YAP1 欠如と神経内分泌分化について. 第 74 回日本癌学会総会, 名古屋 2015 年 10 月 8 日-10 日.
- 3) 許淑真, 松原大祐, 森川鉄平, 中島淳, 深山正久, 仁木利郎, 村上善則. CADM1 陽性の高悪性度肺腺癌における RAPGEF2 の役割. 第 74 回日本癌学会総会, 名古屋, 2015 年 10 月 8 日-10 日.
- 4) Matsubara D, Ibrahim R, Osman W, Goto A, Morikawa T, Morita S, Ishikawa S, Aburatani H, Fukayama M, Niki T, Murakami Y. Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma and its significance in epithelial-mesenchymal transition. Annual Meeting of American Association for Cancer Research (poster presentation), San Diego, April 5-9, 2014.
- 5) Ui T, Morishima K, Saito S, Sakuma Y, Fujii H, Hosoya Y, Yasuda Y, Niki T. The HSP90 inhibitor 17-AAG improves chemoresistance of cisplatin-resistant esophageal squamous cell carcinoma cell lines. Annual Meeting of American Association for Cancer Research (poster presentation), San Diego, April 5-9, 2014.
- 6) 佐久間裕司, 仁木利郎. EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に内在する ZEB1 発現細胞の研究. 第 55 回日本肺癌学会総会, 京都, 2014 年 11 月 14 日-16 日.
- 7) 吉本多一郎, 松原大祐, 坂谷貴司, 福嶋敬宜, 仁木利郎. 非小細胞肺癌におけるクロマチンリモデリング因子 (BRG1, BRM, ARID1A, ARID1B, BAF47) の発現異常について. 第 73 回日本癌学会総会, 横浜, 2014 年 9 月 25 日-27 日
- 8) 松原大祐, 伊東剛, 田中一大, 森川鉄平, 中島淳, 仁木利郎. 肺腺癌における YAP1 (a Hippo signaling における転写因子)

の発現パターンと病理組織学的形態，予後との関連性について .第 73 回日本癌学会総会，横浜，2014 年 9 月 25 日-27 日 .

- 9) Ibrahim RA, Matsubara D, Osman W, Morikawa T, Morita S, Ishikawa S, Aburatani H, Fukayama M, Niki T, Murakami Y. Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma: correlation with pathologic features and prognosis. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (poster presentation), Yokohama, Oct 3-5, 2013.
- 10) Yoshimoto T, Niki T, Matsubara D. Molecular mechanisms for EMT in lung cancer; relationship with chromatin remodeling factors and mutation of EGFR. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (poster presentation), Yokohama, Oct 3-5, 2013.
- 11) 松原大祐、石川俊平、小原詩織、吉本多一郎、坂谷貴司、片岡寛章、村上善則、油谷浩幸、深山正久、仁木利郎. RET 融合遺伝子を有する肺腺癌細胞株の発見 . 第 102 回日本病理学会総会、札幌、2013 年 6 月 6 日-8 日 .
- 12) 吉本多一郎、松原大祐、佐久間裕司、仁木利郎. 肺癌における上皮間葉転換の分子機構：クロマチンリモデリング因子ならびに EGFR 変異との関連性 . 第 10 回日本病理学会カンファレンス 2013 六甲山 . 2013 年 8 月 2 日-3 日 .
- 13) 吉本多一郎、仁木利郎、松原大祐、佐久間裕司、遠藤俊輔、杉山幸比古. 末梢肺に発生した混合型乳頭状の 2 例 . 第 54 回日本肺癌学会総会、東京、2013 年 11 月 21 日-22 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔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
吉本多一郎 (YOSHIMOTO TAICHIRO)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：20634166

(3)連携研究者
()

研究者番号：