

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861248

研究課題名(和文) deltaNp63発現誘導による新規肺扁平上皮癌モデルの確立と癌発症機序の解明

研究課題名(英文) Establishment of novel lung SCC model using deltaNp63 inducible system

研究代表者

山野 莊太郎 (Yamano, Shotaro)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80614528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】本研究は、肺扁平上皮癌におけるdeltaNp63の役割を検討することを目的とした。
【研究結果】TET/onシステムを用いた肺上皮特異的にdeltaNp63蛋白の発現を誘導するマウスを開発したが、解析に十分なdeltaNp63蛋白の発現を誘導するマウスを作製することができなかった。一方、発がん物質で誘発したマウス肺扁平上皮癌においてdeltaNp63陽性癌細胞は、腫瘍辺縁部において、腫瘍関連マクロファージとニッチを形成し、CD44v及びリン酸化Stat3蛋白の発現、及びEGF-EGFRシグナルを介して増殖し、肺正常組織への浸潤を行っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：【Objective】In this study, we challenged the establishment of novel mice model of lung Squamous cell carcinoma (SCC) using lung epithelium specific deltaNp63 inducible system and evaluated the role of deltaNp63 positive cancer cells in the lung SCC of the peripheral type.
【Results】We could not succeed the establishment of novel mice model of lung SCC. Nevertheless, we clearly observed that deltaNp63 positive cancer cells were co-expressed CD44v, Ki67 and P-Stat3 proteins and tumor associated macrophages (TAMs) were increasing near these cells. These data indicated that TAMs might be needed for deltaNp63 positive cancer cells monoclonal expansions and the formation of the tumor microenvironment in lung SCC.

研究分野：実験病理学

キーワード：deltaNp63 TET/On lung

1. 研究開始当初の背景

近年ヒト末梢型肺扁平上皮癌が増加しており、病態発生機序の解明及び新規治療薬開発につながる肺扁平上皮癌モデル動物の開発が待たれている。そのためには、扁平上皮癌発生に必要な十分条件を明らかにすることが求められている。当大学にて原発性肺癌と診断された190症例についてdeltaNp63の免疫組織学的解析を行った所、分化度に関わらず扁平上皮癌症例の93%で発現が認められ、その他の症例においては発現を認めなかった。(図1)。

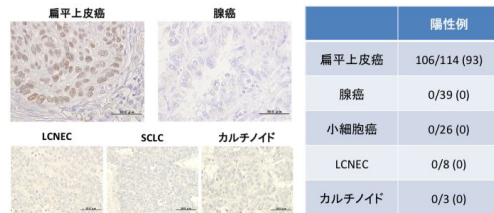


図1: ヒト肺癌におけるdeltaNp63染色結果

さらに、マウスと発がん物質であるN-nitroso-tris-chloroethylurea (NTCU)を用いて、肺扁平上皮癌の発生における早期過程を検討した結果、組織幹細胞として注目されている気管支肺胞幹細胞(BASC)の増生を認め、その中にdeltaNp63陽性BASCが存在することを明らかにした(図2)。

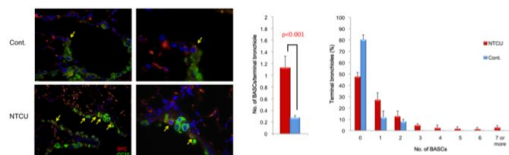


図2: マウス肺末梢において発がん過程早期にBASCの増生が認められる

p63の特徴として1、扁平上皮における分化因子として知られているだけでなく、2、扁平上皮組織内に存在する幹細胞・前駆細胞で発現していること、さらに3、癌抑制遺伝子として有名なp53の遺伝子ファミリーでもあり、癌における役割が注目されていることがあげられる。癌関連の報告として、p63は転写される際に2つの蛋白質群:TAフォーム(TAp63)とdeltaNフォーム(deltaNp63)に分けられ、前者は癌抑制遺伝子及び転移抑制遺伝子として報告があり、後者は癌遺伝子としての報告がなされており、2つの正反対の機能を持った蛋白質群を有していることが明らかになってきた。また、ヒト及びマウスの正常肺末梢部では、p63及びdeltaNp63陽性細胞は認められない。すなわち、deltaNp63こそが、扁平上皮癌発生に必要な扁平上皮への分化転換と癌化の両方に関わる因子である可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的はdeltaNp63蛋白を肺特異的に

に発現誘導可能なモデルマウス(iPDN63マウス)を作製して、肺上皮細胞におけるdeltaNp63発現の影響について検討することを目的とした。加えて、deltaNp63と肺扁平上皮癌発生について検討可能なマウスモデルをiPDN63マウスとKrasG12D conditional knockoutマウスを交配し、肺特異的KrasG12D-deltaNp63 inducible (KiPDN63)マウスを作製することにより、発がんに及ぼすdeltaNp63の影響を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 遺伝子改変マウス(iPDN63マウス)の作製

コンストラクトの配列: pTRE3G-ZsGreen1-Ires-deltaNp63 (配列1)、pTRE3G-deltaNp63-Ires-mCherry (配列2)のものを作成後、マウス作製に用いた。

マウス作製: 上記コンストラクトを用いてC57BL/6バックグラウンドのマウスにマイクロインジェクション法により遺伝子導入マウスを作製した。配列1及び配列2のコンストラクト導入マウスはそれぞれ93及び94匹が順調に育ち、PCR法にて、目的配列の有無を検討した。

iPDN63マウスの作製: 上記マウスと肺特異的プロモーターSPCの下流にrtTAを配列させたspc-rtTAマウス(Jackson laboratory, US)を交配させ、各種配列とspc-rtTAの両方の遺伝子を有するdouble transgenicマウスをiPDN63マウスとして、各種解析に興じた。

ドキシサイクリン投与: iPDN63マウスを用いて、目的遺伝子を発現誘導させるため、ドキシサイクリン(Dox)を2mg/mlの容量で飲水投与を行った。加えて、混餌投与(自由摂取)及び腹腔内投与(2mg/mouse, 週2回)も合わせて検討した。投与は1週間行った後解剖を行い、肺をサンプリング後、各種解析を行った。

2) N-nitroso-tris-chloroethylurea (NTCU) 誘発マウス肺扁平上皮癌サンプルを用いたdeltaNp63発現癌細胞における各種発現解析

これまでに行った動物実験材料のうち、NTCU誘発マウス肺扁平上皮癌サンプルを用いて癌幹細胞マーカーの一種であるCD44v及び細胞増殖能の指標であるKi67、及び本研究で着目しているdeltaNp63蛋白の発現を行い、各種検討を行った。

4. 研究成果

本研究より得られたiPDN63マウスを用いて、deltaNp63蛋白発現の予備検討試験を行った。

iPDN63 マウスに 1 週間、ドキシサイクリン (Dox) を飲水投与、混餌投与及び腹腔内投与した後、動物を剖検後、肺の病理組織学的解析を行った。deltaNp63 及び pan p63 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った結果、いずれの投与経路でも十分な deltaNp63 蛋白の発現が観察できなかった。これらの結果より、本マウスはターゲット遺伝子の挿入部位に

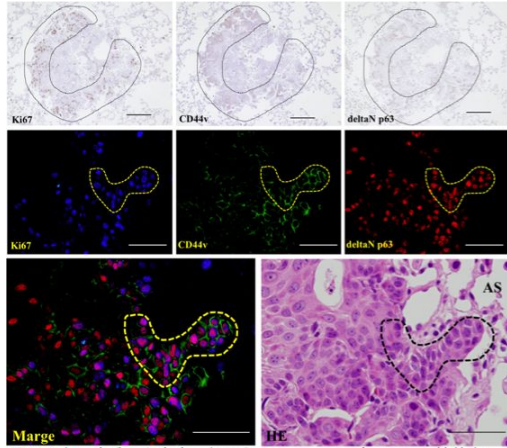


図3: マウス肺扁平上皮癌におけるKi67, CD44v及びdeltanp63抗体を用いた単染色及び3重染色結果

なんらかの問題が生じており、deltaNp63 蛋白発現を解析する上で十分なモデルでないと考えられた。現在、再度コンストラクトの配列を検討した後、トランスジェニックマウスの作製を行っている所である。

一方、NTCU 誘発マウス肺扁平上皮癌サンプルを用いて、腫瘍内における Ki67、CD44v 及び deltaNp63 の染色を行った所、いずれのマーカーも腫瘍の中心部と比較して辺縁部において高く発現する結果を認めた。そこで、腫瘍辺縁部においてこれら 3 つのマーカーの共発現を検討した結果、癌細胞の正常肺組織への浸潤部位に、これら 3 つのマーカー全てが発現する癌細胞が認められた。この結果より、肺扁平上皮癌では腫瘍中心部と比較して、

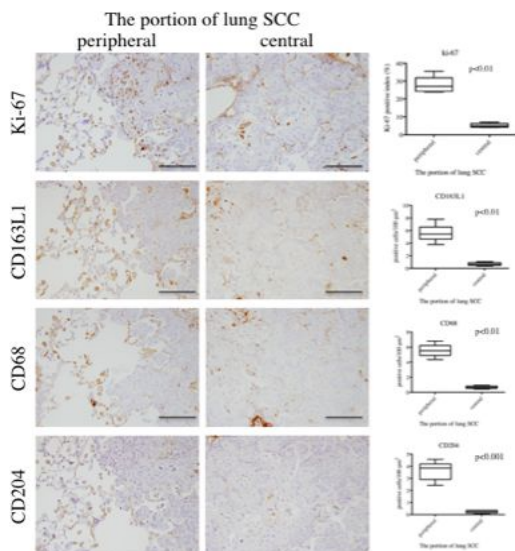


図4: 癌中心部及び末梢部におけるKi67、CD163L1、CD68及びCD204抗体を用いた免疫染色及び陽性細胞の形態計測

deltaNp63 陽性癌細胞が増加しており、deltaNp63 陽性癌細胞は、deltaNp63 陰性癌細胞と比較して、細胞増殖能及び CD44v 発現量が高いことが明らかとなった。

この結果より、肺扁平上皮癌の正常肺組織への浸潤において、deltaNp63 陽性癌細胞が非腫瘍細胞と腫瘍末梢部でニッチを形成している可能性を考え、腫瘍浸潤マクロファージに着目し、検討を進めた。

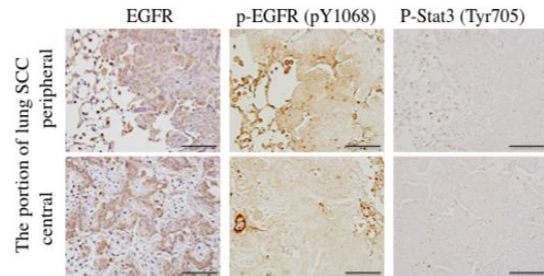


図5: 癌中心部及び末梢部におけるEGFR、p-EGFR及びP-Stat3抗体を用いた免疫染色結果

腫瘍浸潤マクロファージのマーカーとして、CD163L1、CD68 及び CD204 及び Ki67 を用いて腫瘍中心部及び辺縁部の染色を行い、陽性細胞の形態計測を行った結果、腫瘍中心部と比較して辺縁部で Ki67 陽性腫瘍細胞及び CD163L1、CD68、CD204 陽性マクロファージの有意な増加を認めた (図 4)。さらに、腫瘍辺縁部における癌の浸潤部位においてリン酸化 EGFR 及びリン酸化 Stat3 の発現が認められ (図 5)。以上の結果より、本研究より肺扁平上皮癌では肺正常組織への浸潤性増殖を行う際に、腫瘍末梢部において deltaNp63 陽性癌細胞を主体としたニッチが存在する可能性が示唆された。

慶應大 石本らにより CD44v 蛋白の機能として xCT と細胞膜でヘテロダイマーを形成後、GSH 形成に寄与し、細胞内 ROS をコントロールすることが報告されている (Cancer Cell. 2011 Mar 8;19(3):387-400.)。さらに、近年の報告より、LKB1 の不活性化による細胞内 ROS の増加が肺腺癌の扁平上皮への分化を制御している報告がなされ、ROS シグナルが p63 発現に重要であることが報告された (Cancer Cell 27, 698-711, May 11, 2015)。以上の報告と本研究成果より deltaNp63 陽性癌細胞は腫瘍辺縁部にてマクロファージとニッチを形成し、Stat3 を活性化することで、EGF-EGFR シグナルにより monoclonal expansion を起こしている可能性が示唆された。加えて、CD44v を発現することで細胞内 ROS を制御し、ストレス抵抗性となりニッチ形成に利用している可能性が考えられる。

本研究より、正常細胞における deltaNp63 発現の影響を評価することはできなかったが、deltaNp63 を発現する癌細胞における腫瘍内の機能の一端を検討できた。今後、トランスジェニックマウスの開発を継続して行い、deltaNp63 の正常細胞における役割を解明したいと考えている。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山野 莊太郎 (YAMANO, SHOTARO)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80614528