

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860268

研究課題名(和文)肺腺癌3次元モデルの樹立と間質浸潤促進因子の新規同定

研究課題名(英文) Establishment of model for lung adenocarcinoma in 3D and identification of promotional factor for stromal invasion

研究代表者

加藤 貴史 (KATO, Takashi)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：40573423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：不死化したヒト肺上皮細胞株HBE135E6E7細胞を肺組織由来ヒト線維芽細胞(MRC-9)とマトリゲル中で三次元培養し、細気管支/肺泡構造に類似した房状分枝構造を作出した。線維芽細胞ではHGFの発現が顕著に高いため、HGF中和抗体を加えると、モデル構造が抑制された。またチロシンリン酸化Metに関しては低分化型腺癌より高分化型腺癌で、より多く陽性症例が見出した。つまり、非浸潤性肺腺癌ではHGFが形態形成に関与している。さらに、肺組織特異的幹細胞であるBASCでのMetの発現は非常に高いことが分かった。そしてBASC、ATII細胞からATI細胞へと分化していくとMetの発現が減少していた。

研究成果の概要(英文)：Bronchial epithelial cells could differentiate into multiple lung cell type and develop multiple foci with well-differentiated histogenesis after transformed into neoplastic cells. We investigated morphogenic abilities of HBE135, immortalized human bronchial epithelial cells, in 3D cultures. In culture with lung fibroblast MRC-9 cells, HBE135 cells formed colonies with bronchioalveolar-like complex branching. MRC-9 cells highly express HGF, and an anti-HGF neutralizing antibody suppressed the branching formation. But HGF could not sufficiently compensate the morphogenic effects of MRC-9 cells, suggesting that HGF was necessary but insufficient for the branching formation. Furthermore, Met was phosphorylated in neoplastic bronchial epithelial cells from lung well-differentiated adenocarcinomas. Besides, Met was strongly expressed in BASCs, distal lung epithelial stem cells. In alveoli, we found higher expression of Met in primary alveolar type 2 (AT2) than in AT1 cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：HGF 肺胞上皮細胞 三次元培養 非浸潤

1. 研究開始当初の背景

(1)肺は発生段階で厳密に制御されている。肺胞再生は、肺組織中に存在する幹細胞の増殖、分化、形態形成により行われる。気管支上皮細胞の中には、幹細胞の特質を持ったものが存在し、様々な肺組織の構成細胞に分化していく。この制御システムが異常になると肺気腫や間質性肺炎を発症する。肺組織を再生するにあたり、正常の肺発生やその制御機構を理解することは、より有効な呼吸器疾患の治療法に繋がると考えている。

(2)最近の研究では、肺組織の幹細胞が気管支と肺胞の境界に存在すると考えられている。この幹細胞は、様々な細胞に分化することが知られている。また、三次元培養を用いる実験手法が確立されてきている。そこで、この幹細胞を用いて、三次元培養を行うことで形態形成機能の解析が活発になされている。

(3) HGF (肝細胞増殖因子)は、様々な組織の再生に関与しており、特に形態形成といった独特の機能を果たしている。この HGF の機能は、細胞増殖やアポトーシス抑制などに加えて、肺胞再生に多大な貢献をしていると考えられている。しかしながら、HGF が肺傷害時に肺胞/気管支構造にどのような形態形成機能を果たしているのかに関しては、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) 3次元培養

HBE135-E6/E7 (HBE135)細胞は、ヒト気管支上皮細胞は E6/E7 oncogene にて不死化した細胞で多能性の特性を示している。今回、申請者は三次元培養を用いて、HGF の形態形成機能を調べた。

(2)肺腺癌での HGF-Met signaling

さらに、申請者は HGF がどのような形態形成機能を果たしているか高分化型腺癌と低分化型腺癌での HGF 受容体である Met およびリン酸化 Met に対し免疫染色法を用いて解

析した。リン酸化 Met は、HGF が結合することでチロシンキナーゼにより、リン酸化される。このリン酸化 Met により、様々な機能を発揮する。従って、HGF-Met シグナルの活性化の指標と考えられる。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

HBE135 細胞を American Type Culture Collection より購入した。ヒト血管内皮細胞として human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) と human microvascular endothelial cells (HMVECs) は Lonza 社より購入した。ヒト血管内皮細胞は MCDB131 培養液に 5% 仔ウシ血清, 2 mM L-glutamine, and 20 ng/mL basic fibroblast growth factor (FGF)を加えたものを用いた。MRC-9 cells (ヒト肺線維芽細胞)と SF4-1 cells (ヒト皮膚線維芽細胞) は Dulbecco's modified Eagle's 培養液に 10% 仔ウシ血清を加えたものを用いた。

(2) 3次元培養

マトリゲルとして growth factor-reduced rBM を用いた。細胞を 100 or 50 μ L の液状のマトリゲルに混ぜ合わせ、8もしくは16ウェルチャンバー 37°C にて固相化した。その後、培養液を重層した。その後、培養液は3日ごとに入れ換えた。分枝状構造は球状構造とそれらを結ぶ枝状構造を兼ね備えるものと定義した。

(3) 免疫染色法

三次元培養構造物を氷冷 4% パラホルムアルデヒドで 4°C、30 分間固定した。その後 PBS で希釈した 0.3% Triton X-100 で 10 分間細胞膜を溶解し、細胞を 5% 正常ヤギ血清で 1 時間室温にてブロッキングを行った。細胞を一次抗体 anti-E-cadherin、anti-surfactant protein-C pro-peptide (pro-SP-C)、anti-vimentin で 4°C オーバーナイトで反応させた。PBS で洗浄後、細胞を二次抗体 Alexa 488-conjugated IgG (1:600) で反応させた。核

は propidium iodide (PI) で 30 分室温にて反応させた。HBE135 細胞を 9 日間 3 次元培養し、さらに 3 日間 10 μ M BrdU を添加した培養液にて 3 次元培養を行った。作製したコロニーを 4% paraformaldehyde で固定し、BrdU の取り込みを anti-BrdU antibody を用いた蛍光免疫染色にて行った。

(4) Western blot analysis

HBE細胞を buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, protease inhibitor cocktail, 2 mM Na_3VO_4 , and 50 mM NaF]にて溶解し、タンパクを抽出した。Anti-phospho-Met (1234/1235), anti-Met IgG, anti-phospho-ERK1/2 IgG, anti-ERK1/2 IgG, anti-phospho-AKT IgG, and anti-AKT IgG 抗体を用いてwestern blotを行った。

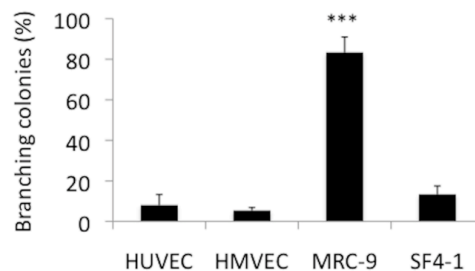
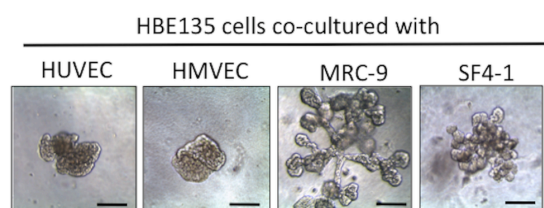
(5) ヒトの肺癌を用いた免疫染色

ヒト肺癌サンプル (混合型) は、近畿大学医学部付属病院で肺癌と診断された患者から外科手術にて取られたものを用いた。腫瘍サンプルは 10% ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋後、4- μ m の切片を作製した。切片は、Met および phospho-Met (Tyr1234/1235) にて免疫染色した。近畿大学倫理委員会の承認を得て今実験は行われた(24-071)。

4. 研究成果

(1) 間質細胞が気管支上皮細胞の分枝状構造に与える役割を検証する。

HBE135 細胞を単独で培養した場合、低濃度で培養した場合ではコロニーが形成されなかったが、高濃度で培養した場合、コロニーが形成された。しかしながら、複雑な分枝構造を持ったコロニーは形成されなかった。そこで、HUVEC (human umbilical vascular



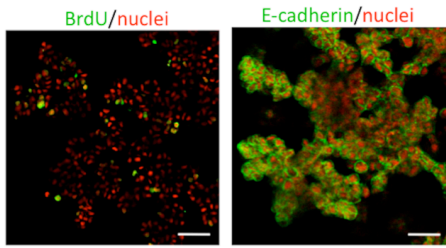
endothelial cells), HMVEC (human microvessel endothelial cells), 肺組織由来ヒト線維芽細胞 (MRC-9)、皮膚組織由来ヒト線維芽細胞 (SF4-1)と共培養させたところ、MRC-9 細胞と共培養させることで、HBE135 細胞が複雑な細気管支/肺泡構造に類似した房状分枝構造をもったコロニーを形成することが分かった。このとき、他の間質細胞では、MRC-9 と同様数のコロニーは形成されるが、複雑なコロニーは形成されなかった。

従って、MRC-9 細胞が何らかの形態形成機能を発揮していることが分かった。

(2) ヒト肺線維芽細胞との共培養による複雑な分枝構造を持つコロニーの特性を免疫染色にて解明する。

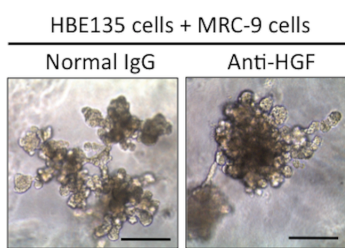
まず、コロニー形成過程を観察した。コロニーは培養 6 日目から観察され、培養 12 日目に分枝構造が観察される。さらに 20 日目には複雑な分枝構造を持ったコロニーが観察される。この形態形成機能を解明するにあたり、MRC-9 細胞から放出されるサイトカインに関し、注目した。そこで、HBE 細胞と MRC 細胞をマトリゲルにて分断し、培養を行ったところ、複雑な分枝構造を持つコロニーが形成された、従って、何らかのサイトカインにより形態形成機能が発揮されていると考えられる。

次に蛍光免疫染色にてこの複雑な分枝構造の特性を探った。まず、細胞増殖している箇所を解析した。その結果、BrdU-陽性細胞はコロニーの至る箇所に見出された。次に複雑なコロニーに対し、細胞マーカーを染色した。上皮細胞マーカーである E-cadherin は細胞膜にきれいに染色された。



(3) MRC-9細胞はHGFを特に高発現している。MRC-9細胞が発揮する形態形成機能を解析するため、間質細胞が放出する肺胞再生に関与するもので、どのようなサイトカインを高発現しているかをreal-time RT-PCR法にて解析した。FGF1やVEGF-A mRNAは、iSF4-1細胞の方がMRC-9細胞より高かった。またheparin-binding-EGF (HB-EGF) mRNAの発現はHUVECの方が高かった。しかし、HGFの発現はMRC-9細胞では他の間質細胞と比較して顕著に高かった。従って、HGFが複雑なMRC-9細胞の形態形成機能の発現に重要な役割を果たしていることが考えられる。

次にHGF-METシグナルがHBE135細胞の複雑な形態形成機能に必須の役割を果たし



ているかを解析するため、HGF中和抗体を3次元培養液に加えた。

HGF中和抗体は培養初日から加えた。コロニーの形成は抑制されなかったが、複雑な分枝構造は形成されなかった。従って、HGF-Met systemはHBE135細胞の3次元培養での複雑な形態形成機能に必須の役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、HGFが複雑な分枝構造発現に重要な機能を果たしているかを解析するため、培養液にHGFを加え、MRC-9細胞以外の様々な間質細胞との3次元共培養を行ったが、複雑な分枝構造は認められなかった。従って、MRC-9細胞はHGF放出以外に重要な機能を果たしていることが分かった。

(4) 肺腺癌の形態形成におけるHGFの役割

HGFによる肺胞形成機能が肺癌においても働いていることを確認するため、高分化型腺癌と低分化型腺癌にてHGF-Met signalが亢進しているかを解析した。高分化型と低分化型腺癌を40症例解析した。その結果、Metの発現はあまり違いが見られなかったが、HGF-Met signalが亢進していることを示すチロシンリン酸化Metに関しては高分化型腺癌で、より多く陽性症例を見出した。このことは、非浸潤性肺腺癌ではHGFが形態形成に関与していることが示唆される。

さらに、ラット正常の肺組織において、各細胞に関してMetの発現量を解析した。まずBADJ (bronchioalveolar duct junction)領域に存在する肺組織特異的幹細胞であるBASC (Bronchioalveolar stem cell)でのMetの発現は非常に高いことが分かった。そして、BASCから分化しているATII (alveolar epithelial type II)細胞、さらに分化したATI (alveolar epithelial type I)細胞に伴い、Metの発現が減少していくことが分かった。さらに、初代培養ラットATII細胞を三次元培養するとALC (alveolar-like cyst)が形成されるが、このときHGFを加えることでALCの形成がより亢進されることが分かった。これは、HGFがATII細胞に重要な機能を果たしていることが分かる。これらのことから、肺組織幹細胞であるBASCは、肺組織におけるHGFの重要な標的細胞であり、複雑な形態を形成する上でHGF-Metシグナルが重要な働きをしていることが明らかとなった。そして、BASCが分化するのに伴い、その受容体Metの発現を減少させていくことが明らかとなった。

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 2件)

① Takashi Kato, Kiyomasa Oka, Toshikazu Nakamura, Akihiko Ito Decreased expression of Met during differentiation in rat lung 2016 60, 2575 査読有り DOI: 10.4081/ejh.2016.2575

② Takashi Kato, Kiyomasa Oka, Toshikazu Nakamura, Akihiko Ito_Bronchioalveolar morphogenesis of human bronchial epithelial cells depending upon hepatocyte growth factor Journal of Cellular and Molecular Medicine 2015, 19, 2818-2826. 査読有り DOI: 10.1111/jcmm.12672

[学会発表] (計 2件)

① 加藤貴史、高橋英夫
肺上皮細胞では分化に伴いMetの発現が減少する (Decreased expression of Met in lung epithelial cells during differentiation) 日本薬理学会総会 横浜(パシフィコ横浜) 2016年3月9-11日

② 加藤貴史、高橋英夫、伊藤彰彦
肺胞再生の分子機構解明に向けた3次元培養モデルを構築する。 日本薬理学会関東部会 千葉(明海大学) 2015年7月4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 0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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 貴史 (KATO, Takashi)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号: 40573423

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: