

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09204

研究課題名(和文) 気管支擦過肺癌細胞の培養による肺癌診断と治療法の探索

研究課題名(英文) Cell culture and diagnosis of lung cancer using bronchial brush specimens

研究代表者

菊地 英毅 (Kikuchi, Eiki)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：60463741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：77例の気管支擦過検体、2例の胸水、1例の剖検肺の計80検体を用いて細胞培養を行い、うち53例(66.3%)において、細胞培養および継代が可能であった。培養できない細胞はほとんどが細菌のコンタミネーションによるものであり、下気道感染からの細菌の混入と考えられた。培養された細胞のEGFRおよびKRAS遺伝子のシーケンスを行ったところ、全てにおいてヒト遺伝子配列を認め、また8例中1例においてKRAS変異を認めたことから、培養された細胞はヒト由来細胞であり、肺がん細胞を含んでいると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cell culture was performed using a total of 80 specimens of 77 cases of bronchial brushing specimen, 2 cases of pleural effusion and 1 autopsy lung, and cell culture and passage were possible in 53 of them (66.3%). Most of the cells that could not be cultured were due to bacterial contamination, probably by bacteria from lower respiratory tract. The EGFR and human KRAS gene sequence showed that all of the 53 cultured cells have human genes, and the KRAS mutation was observed in one of 8 cases.

研究分野：肺癌

キーワード：細胞培養 肺癌

## 1. 研究開始当初の背景

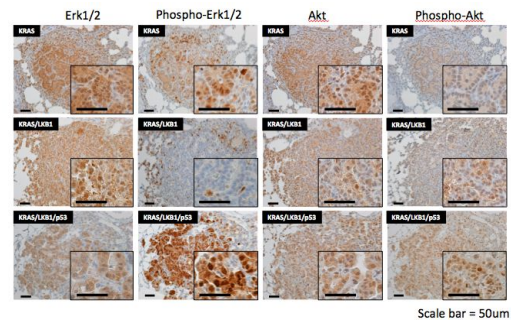
非小細胞肺癌に対する殺細胞性化学療法の奏効率は、初回治療で3割前後と十分な効果が得られていないが、NEJ group から2010年にNew England Journal of Medicineに報告された、EGFR 遺伝子変異を有する未治療非小細胞肺癌患者に対するGefitinib 治療群と標準化学療法群の無作為化比較試験において、Gefitinib 治療群が74.5%と有意に高い奏効率と無増悪生存期間延長が示された。すなわち、化学療法を行う前の段階で腫瘍細胞を採取し、非小細胞肺癌という診断だけでなく、腫瘍細胞がもっている特性を検査することで、その患者に対する最も適切な治療を提供しうる、いわゆるオーダーメイド治療が進んできたということの意味する。

また、ALK 融合遺伝子は肺腺癌の5%程度にみられ、ALK 阻害薬のCrizotinibは、標準二次化学療法と比較して、良好な成績が報告された。今日まで多くの非小細胞肺癌でドライバーがん遺伝子が認められると報告され、それらの遺伝子を標的とした分子標的治療の開発が進行中である。つまり、日常診療において、肺癌の病理診断のみならず、治療方針決定のための各種遺伝子検査をおこなうための高品質なDNA・RNA採取が必要となってきたが、肺癌の半数以上は手術適応のない進行期であり、その検体は少量の経気管支生検検体や針生検検体に限られ、十分な検体を採取することは容易ではない。

癌細胞の生物学的特性、薬剤感受性、薬剤耐性機序の探索のため、培養細胞株を用いた研究が多用されている。しかし、癌細胞株の樹立は成功率が低く、近年の報告でも外科的切除検体179例中、培養細胞株が樹立できたのは8例(4.5%)のみであったと報告されている(Acta Pharmacol Sin 2011)。このセレクションバイアスのため、培養細胞株が肺癌の生物学的特性の全てを正確に反映しているかどうかは不明であり、また細胞株の樹立には長い時間がかかる。近年、ROCK 阻害薬および放射線照射線維芽細胞を用いることで、少数の細胞を短期間で培養増殖できることが報告された(Am J Pathol 2012)。この方法を用いることで、DNA・RNA採取やセレクションバイアスの少ない生きた癌細胞を用いた研究が容易になると考えられるが、この方法で得られた細胞が肺癌診断に使用できるかどうか、細胞の生物学的特性に変化がないかどうかを多数の臨床検体を用いて検討した報告はほとんどない。

また、KRAS 遺伝子変異は肺癌のドライバーがん遺伝子としては、EGFR と並び高頻度にみられる。細胞あるいは遺伝子改変マウスモデルでの検討では、KRAS 変異陽性肺癌に対し、MEK 阻害薬/PI3K 阻害薬、BET プロモドメイン阻害薬、Wee1 阻害薬などに抗腫瘍効果があるとされる。しかし、臨床試験で

は、MEK 阻害薬と殺細胞性抗癌剤の併用効果が証明されたものの、その差は大きくなく、分子標的治療が大きな成功をおさめているとは言いがたい。Kras<sup>G12D</sup>をもつ遺伝子改変マウスに誘導した肺癌、Kras<sup>G12D</sup>/LKB1<sup>fl/fl</sup>マウス肺癌、Kras<sup>G12D</sup>/LKB1<sup>fl/fl</sup>/p53<sup>fl/fl</sup>マウス肺癌を用いた検索では、Kras 下流のphospho-Erk、phospho-Akt の発現は大きく異なっており、KRAS 変異陽性肺癌は共存する癌抑制遺伝子の欠損によって癌細胞の性質が異なり、このことが各種分子標的治療薬への感受性が異なる一因となっている可能性がある。



KRAS 変異陽性肺癌は、併存する癌抑制遺伝子によって治療戦略を替える必要があるかもしれない。しかし、このことをヒト検体で検討した報告はほとんどない。

気管支擦過細胞の培養のためには、気管支鏡で病変から確実に細胞を採取できることが前提となり、気管支鏡での高い病変到達率が求められる。我々は2cm以下の小型病変に対して、ガイドシース併用気管支腔内超音波断層法(EBUS-GS)およびバーチャル気管支鏡を用いることで80%程度の診断率を出しており、この技術を用いて気管支擦過細胞を得て肺癌細胞の培養方法が確立され、それががん遺伝子診断のみならず、薬剤感受性や癌細胞の生物学的特徴の同定に使用できることが証明されれば、肺癌の真のオーダーメイド治療の確立につながる。

## 2. 研究の目的

近年、肺癌の診断および治療方針決定に、さまざまな遺伝子変異の検索が必須となりつつあるが、手術適応のない進行期肺癌においては、検体の採取は気管支鏡検査や針生検により得られる少量の検体に限られ、DNAやRNA採取のための良質の十分な検体を得ることはしばしば困難である。本研究は、ROCK 阻害薬および放射線照射線維芽細胞を用いて、肺癌患者より得られた少量の気管支擦過細胞を培養増殖させ、この培養細胞を遺伝子変異検索に用いることの妥当性を検討することが目的である。そして、得られた培養細胞のうち、KRAS 変異陽性細胞に対する薬剤感受性と併存する遺伝子変異の発現の検討を行い、KRAS 変異陽性肺癌に対する

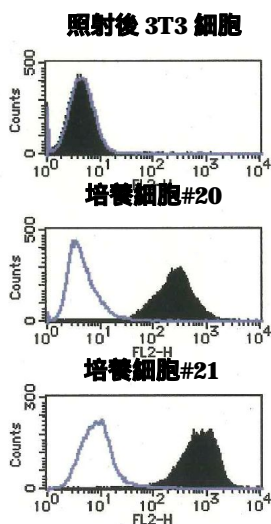
治療戦略を探索する。

### 3. 研究の方法

ROCK 阻害薬および放射線照射線維芽細胞を用いて、気管支擦過肺癌細胞あるいは胸水、剖検肺などの肺癌細胞を培養し、至適条件を決定する。また、得られた細胞をクロノジェニックアッセイ、免疫不全マウスへの皮下移植により癌細胞であることを確認し、さらにドライバー癌遺伝子やタンパク発現パターンについて、経気管支生検検体、外科的切除検体との比較を行い、本方法で得られた細胞を肺癌の診断に使用することの妥当性を検討する。そして、得られた培養細胞のうち、KRAS 変異陽性細胞に対する薬剤感受性と併存する遺伝子変異の発現の検討を行い、KRAS 変異陽性肺癌に対する治療戦略を探索する。

### 4. 研究成果

77 例の気管支擦過検体、2 例の胸水、1 例の剖検肺の計 80 検体を用いて細胞培養を行い、うち 53 例 (66.3%) において、細胞が培養され、継代可能であった。培養できない細胞はほとんどが細菌のコンタミネーションによるものであり、下気道感染からの細菌の混入と考えられた。培養には 30Gy の放射線照射をしたマウス由来 3T3 細胞を用い、培養液には DMEM/F-12 および 5% FBS、ROCK 阻害薬として 10 $\mu$ mol/L Y-27632 を使用した。得られた培養細胞を用いてフローサイトメトリーにてヒト Epcam の発現を確認したところ、共培養する照射後 3T3 線維芽細胞の Epcam 発現は 1% 以下であったが、肺癌擦過細胞を培養増殖させて得られた細胞は 97-99% が Epcam 陽性であり、ヒト上皮系細胞が得られたことが確認された。



ただし、培養可能であった 53 例は放射線

照射 3T3 細胞および ROCK 阻害薬の存在下では長期継代が可能であったが、非存在下では全例において細胞の膨化・老化をおこして徐々に増殖速度が落ち、長期の継代は不能であった。

また、得られた培養細胞を免疫不全マウスに皮下注射し、腫瘍形成能を確認したところ、10 例中 10 例で腫瘍が形成された。得られた細胞の EGFR および KRAS 遺伝子のシーケンスを行ったところ、全てにおいてヒト遺伝子配列を認め、腫瘍はマウス 3T3 細胞や免疫不全マウス由来ではなく、ヒト由来細胞であることが確認された。また 8 例中 1 例において KRAS 遺伝子変異を認めた。このことから培養される細胞には肺癌細胞が存在していると考えられた。

しかし、遺伝子変異が検出される培養細胞を繰り返し継代すると遺伝子変異が消失した。これは、培養細胞に正常気管支上皮細胞と腫瘍細胞の両者が混在しているためと考えられた。培養された細胞から癌細胞のみを分離する目的で、20 例の培養細胞を用い、またさまざまな培養条件にて、限界希釈法あるいは形態的に癌細胞と考えられるコロニーをピックアップしてサブクローニングを繰り返し行った。しかし、培養を繰り返すと癌細胞と考えられる細胞は減少し、長期に培養される細胞は正常気管支上皮細胞であった。その原因として、検体は少量の癌細胞と大多数の正常細胞が含まれており、本方法では癌細胞とともに多数の正常細胞も培養されること、そしておそらく正常気管支上皮細胞の方が癌細胞に比較して増殖速度が速い可能性が考えられた。

次に、KRAS 変異陽性細胞に対する薬剤感受性と併存する遺伝子変異の発現についての検討を行うため、得られた正常気管支上皮細胞の不死化および変異 KRAS 遺伝子導入による腫瘍細胞作成を試みた。ヒト CDK4 および hTERT をレトロウイルスベクターに組み込み、ROCK 阻害薬および放射線照射 3T3 細胞の存在下で培養された正常気管支上皮細胞に遺伝子導入し、さらに変異 KRAS を遺伝子導入した。この方法によって KRAS 遺伝子変異をもつがん細胞を作成しようと試みたが、ROCK 阻害薬非依存性細胞を作成することができず、またこの細胞を用いて MEK 阻害薬 AZD6244、PI3K 阻害薬 BEZ235、BET プロモドメイン阻害薬 JQ-1、Wee1 阻害薬 MK1775 に対する薬剤感受性を MTT アッセイ法にて検討したが、有意な薬剤感受性の結果が得られなかった。

### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

菊地 英毅 (KIKUCHI, Eiki)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号：60463741

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし