

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460441

研究課題名(和文) 樹立した微乳頭肺腺癌細胞株を用いた種々の腫瘍特異的マーカー獲得戦略

研究課題名(英文) Acquisition strategy of tumor-specific markers using established micropapillary pattern pulmonary adenocarcinoma cell line

研究代表者

佐藤 雄一 (Sato, Yuichi)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：30178793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：高悪性である微乳頭構造を示す肺腺癌を特徴づける因子の解明は不明瞭のままである。申請者は微乳頭構造を取る肺腺癌由来の細胞株を樹立した。この研究では、樹立した細胞株の特徴を明らかにすること、この細胞と種々のプロテオーム解析技術を駆使して、この腫瘍を特徴付けるマーカー候補タンパク質の獲得を目指した研究を展開した。この細胞の特徴や獲得したマーカー候補タンパク質について述べる。

研究成果の概要(英文)：The factors conferring the increased malignancy on lung adenocarcinoma with micropapillary component (MPPAC) remain to be elucidated. I established cell line named as a KU-MPPAC derived from the micropapillary pattern adenocarcinoma of the lung. I investigate the property of this cell line in detail, and aimed at the acquisition of novel biomarkers for MPPAC using by the several proteomic techniques. We describe the characteristics of this cell line and obtained biomarker candidate proteins for MPPAC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：微乳頭肺腺癌 樹立細胞株 二次元電気泳動 自己抗体 セクレトーム解析 可移植性腫瘍 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

最近、微乳頭構造 (micropapillary pattern; MPP) を呈する腫瘍は肺癌、膀胱癌、乳癌唾腺癌、卵巣癌等で報告され、共通して高度の脈管侵襲やリンパ節転移があり予後不良であり、MPP は形態学的予後不良の指標で、MPP を含んだ腫瘍は独立した臨床病理学的単位であるとの報告がある。しかし、MPPAC の高い脈管侵襲能や転移能を規定する因子は依然として不明のままである。

2. 研究の目的

申請者は MPPAC 構造を取る AC 患者から MPPAC 由来細胞株を樹立した (KU-MPPAC 細胞と命名)。この細胞株の特徴を明らかにすること、様々な手法を駆使してこの細胞株を用いた MPPAC に対する腫瘍マーカー候補タンパク質の獲得を行うことや SCID マウスへの移植性腫瘍の樹立をも目指した研究を展開する。また、この細胞を用いた KU-MPPAC 細胞の iPS 細胞化も行う。同様に、MPPAC 組織や患者血清を用いた腫瘍マーカー候補タンパク質の獲得を目指した研究も合わせて展開する。

3. 研究の方法

(1) 細胞株の樹立とその特徴の解析: 10% FCS 加 RPMI 1640 培地で樹立した細胞株をさらに、ハイブリドマ用に開発された無血清培地である H-SFM 培地や無タンパク質培地である PFHM-11 培地で継代可能な細胞株を樹立する。

(2) 二次元電気泳動法による検討: MPP 細胞株と既知の肺腺癌細胞株からタンパク質を抽出し、両者を二次元電気泳動法で比較するため、低分子量タンパク質の解析を目的として Tricine-PAGE を行った。さらに、実際の MPPAC 組織を用いた二次元電気泳動による腫瘍マーカー候補タンパク質の検出を行った。

(3) セクレトーム解析による検討: 無タンパク培地で培養している KU-MPPAC 細胞の上清をアセトン沈殿し精製したタンパク質サンプルを Tricine-PAGE で解析した。

(4) 自己抗体解析: MPPAC 細胞株の元となった治療前の患者血清を有しており、同一患者の血清と MPPAC 細胞株、もしくは non-MPPAC 由来の細胞株である A549 と LC2/ad 細胞からタンパク質を抽出し、等量混合した試料を二次元に展開し、MPPAC 患者 3 名のプール血清、non-MPPAC 患者 3 名のプール血清それぞれを一次抗体として自己抗体が認識する抗原タンパク質を解析した。

(5) マウス移植腫瘍の樹立: この細胞株がマウスへ移植された場合、MPP を呈するかどうかは重要であり、MPP を呈した場合は、この腫瘍の転移・浸潤の解析モデルにもなる可能性がある。

(6) KU-MPPAC 細胞の iPS 化: この細胞の予後不良の原因を探る目的で、山中 4 因子導入による iPS 化を行う。

4. 研究成果

(1) 細胞株の樹立とその特徴の解析:

KU-MPPAC 細胞は 10%FCS 加 RPMI1640 培地でシート状増殖をせず、小胞巣状に少数の細胞が接着し、その上に細胞が重層して増殖する様式を取る。重層した細胞は小胞巣状で浮遊状態になり増殖する。このような増殖様式は、通常の腺癌細胞とは異なり、実際の MPPAC で見られるものに類似している。上皮由来であることは、免疫染色で pan-keratin や E-cadherin が陽性であること、また腺癌のマーカーである MUC5B や RACK-1, TTF-1 も陽性であった。この時点で、世界で初めて MPPAC 細胞由来の細胞株を樹立し、高悪性であるこの腫瘍の特徴を明らかにするための有用な細胞株であるとして出願した (特願 2015-052548、平成 27 年 3 月 16 日出願)。

細胞の倍加時間は約 30 時間であり、染色体検査の結果、染色体数は 46 本、47 本、48 本のものが混在している核型不安定性の細胞株であり、1 番、2 番、10 番、22 番染色体のトリソミーや様々な染色体異常があることが分かった。TAKARA バイオ株式会社に依頼し KU-MPPAC 細胞と非 MPPAC 細胞として A549 細胞の Gene Chip Expression Array 解析を行った。その結果、様々な遺伝子の発現に相違が認められたが、幹細胞や神経内分泌マーカーの発現 (SOX2, KLF4, NCAM1, ASCL1) が KU-MPPAC 細胞で著しく高いことが分かった。また、TTF-1 や EPICAM の発現も高いことも分かった。IPA Pass way analysis により A549 細胞に比して KU-MPPAC 細胞での遺伝子発現の解析では P53 タンパク質に関連する遺伝子の発現が有意に最も多く過剰発現しており (29 の遺伝子の発現が上昇, p 値 = 1.45-E28) このシグナル系列の異常が KU-MPPAC 細胞の特徴であることが分かった。

(2) 二次元電気泳動法による検討:

Tricine-PAGE による低分子量タンパク質の発現の相違を検討した結果、KU-MPPAC 細胞では PRDX2,4,6, ESTD, PSA1, RPS27A, QPRT, SODC, MIF, PA1B2, PHB, CHD1, PCTPP1, GSTP1 の 14 個のタンパク質が同定された。多くが酸化ストレスに関与するタンパク質群であった。

(3) セクレトーム解析による検討: 低分子量タンパク質を対象とした分泌タンパク質の二次元電気泳動による解析 (セクレトーム解析) では 25 個とのタンパク質が同定された。その中でタンパク質の局在が extra-cellular と表記されているものは、MIF, SOD1, LCN15, SCG2, BOLA2, NME1 の 6 個が見出された。同定されたタンパク質の IPA Pass way analysis により、P53 タンパ

ク質に関連する遺伝子の発現が有意に最も多く過剰発現しており、分泌タンパク質の解析でも P53 タンパク質のシグナル系列の異常が KU-MPPAC 細胞の特徴であることが分かった。

(4) 自己抗体解析 : KU-MPPAC 細胞を二次元電気泳動で展開し、この細胞株の基となった患者の血清を一次抗体として用いて、患者の自己抗体を利用した腫瘍マーカーの検出を行った。その結果、HSP70, PD1A4, SND1, EEF2, DDX3X, HNRNPL, ATIC, G6PD, CK18, OAT, GOT1, COPS4, TALDO1, PSME3, NADPH, HNRNPB1, ENO1, PTBP1, SRP72, TKT の 20 個の自己抗体が認めるタンパク質が同定された。

また、MPPAC や non-MPPAC 患者のプール血清を用いた 2DE-IB 法の結果より、non-MPPAC 患者血清に比して MPPAC 患者血清で 1.5 倍以上シグナル値が高かった自己抗体は 40 個、MPPAD 患者血清に比して non-MPPAC で 1.5 倍以上高かったものは 21 個、計 61 個が検出され、うち 45 個 (42 種) を同定した。同定された抗原タンパク質のうち作製可能であった合成タンパク質 40 種に対して、16 例ずつの MPPAC, non-MPPAC 患者血清を用いた Dot Blot 法を行った。測定結果から ROC 解析を行ったところ、AUC 0.6 を示す自己抗体は 14 種であった。AC 組織を HSPB1 抗体で免疫染色を行った結果、MPPAC では発現が低いが non-MPPAC では発現が高く、特に明かな乳頭状増殖を示す腺癌での発現が高かった。AUC が高値を示した HSPB1 について免疫染色法を行った結果、non-MPPAC では腫瘍細胞に強発現する傾向にあったが、MPPAC においては全体的に染色性が弱く、発現が低い傾向にあった。

(5) マウス移植腫瘍の樹立 : 樹立した KU-MPPAC 細胞を SCID マウスの皮下に移植することでこの細胞の固形腫瘍を樹立することが出来た。また、この腫瘍塊を新たな SCID マウスの皮下に移植することで継代可能であることも確認した。また、SCID マウス腫瘍をホルマリンで固定し、HE 染色したところ、臨床材料で見られる構造に類似した MPP 様構造を取っていることを確認した。MPPAC のモデル動物として治療実験等に適用可能な動物実験系が樹立できた。この腫瘍組織は培養細胞と同様に pan-keratin や E-cadherin, TTF-1, hASH-1, SYP, CGA 等の発現が維持されており、さらに細胞では失われていた MUC5B や N-CAM の発現も認められた。様々な実験に有用な可移植性腫瘍の樹立を行うことが出来た。

(6) KU-MPPAC 細胞の iPS 化 : 作製した細胞は KU-MPPAC4F と命名した。この細胞は免疫プロット法により導入した 4 因子の発現があることを確認している。樹立した細胞を SCID マウスに移植したところ、親株である KU-MPPAC 細胞と同様に形態を取っていたが、免疫染色の結果、iPS 細胞の特徴であ

る SOX2, OCT3/4, KLF4, c-MYC の発現が亢進していた。さらに、Nestin, ABCG2, PDPN, CD47, ALDH1A1, TROY などの幹細胞マーカーの発現が亢進していた。

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 10 件)

Ryuge S, Sato Y, Nagashio R, et al. Prognostic significance of nestin expression in patients with resected non-small cell lung cancer treated with platinum-based adjuvant chemotherapy relationship between nestin expression and epithelial to mesenchymal transition related markers. *PLoS One* 30: e0173886, 2017 (12 名中 2 番目) 査読あり

[10.1371/journal.pone.0173886](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173886)

Igawa S, Ryuge S, Sato Y, et al. Impact of EGFR-tyrosine kinase inhibitors on postoperative recurrent non-small-cell lung cancer harboring EGFR mutation. *Oncol Res Treat* 40(1-2): 7-13, 2017 (14 名中 13 番目) 査読あり [10.1159/000455147](https://doi.org/10.1159/000455147)

Igawa S, Sato Y, Ishihara M, et al. EGFR mutation genotype impact on the efficacy of pemetrexed in patients with non-squamous non-small cell lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 17(7): 3249-3253, 2016 (11 名中 2 番目) 査読あり

[10.14456/apjcp.2016.83/APJCP.2016.17.7.3249](https://doi.org/10.14456/apjcp.2016.83/APJCP.2016.17.7.3249)

Katono K, Sato Y, Jiang SX, et al. Clinicopathological significance of S100A10 expression in lung adenocarcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev* 17(1): 289-294, 2015 (10 名中 2 番目) 査読あり [10.7314/APJCP.2016.17.1.289](https://doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.1.289)

Yanagita K, Nagashio R, Sato Y, et al. Serum anti-Gal-3 autoantibody is a predictive marker of the efficacy of platinum-based chemotherapy against pulmonary adenocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 16(17): 7959-7965, 2015 (13 名中 13 番目) 査読あり [10.7314/APJCP.2015.16.17.7959](https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.17.7959)

Saito K, Kobayashi M, Sato Y, et al. S100A16 is a prognostic marker for lung adenocarcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev* 16(16): 7039-7044, 2015 (12 名中 12 番目) 査読あり [10.7314/APJCP.2015.16.16.7039](https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.16.7039)

Kobayashi M, Nagashio R, Sato Y, et al. Calnexin is a novel sero-diagnostic marker for lung cancer. *Lung Cancer* 90: 342-345, 2015 (14 名中 14 番目) 査読あり [10.1016/j.lungcan.2015.08.015](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.08.015)

Nagashio R, Ueda J, Sato Y, et al. Diagnostic significance of MUC5B and

TTF-1 expression in resected non-small cell lung cancer. *Sci Rep* 5: 8649, 2015 (13 名中 13 番目) 査読あり [10.1038/srep08649](https://doi.org/10.1038/srep08649)

Nakashima H, Jiang SX, Sato Y, et al. Prevent and up-regulated expression in micropapillary components of lung adenocarcinomas and its adverse prognostic significance. *Pathol Int* 65(4): 183-192, 2015 (12 名中 3 番目) 査読あり [10.1111/pin.12257](https://doi.org/10.1111/pin.12257)

Kobayashi M, Nagashio R, Sato Y, et al. Acquisition of useful sero-diagnostic autoantibodies using the same patients' sera and tumor tissues. *Biomed Res* 35(2): 133-143, 2014 (12 名中 12 番目) 査読あり [10.2220/biomedres.35.133](https://doi.org/10.2220/biomedres.35.133)

〔学会発表〕(計 7 件)

佐藤雄一・招待講演 抗体を利用した腫瘍マーカー候補タンパク質の獲得．第 14 回北里疾患プロテオーム研究会．2017.03.24 (東京都港区、北里大学白金キャンパス)

佐藤雄一・児玉賞受賞記念講演 自己抗体を利用した腫瘍マーカー候補タンパク質の獲得．第 67 回日本電気泳動学会総会．2016.08.27 (北海道釧路市、釧路市観光国際交流センター)

佐藤雄一・自己抗体を利用した腫瘍マーカー候補タンパク質の獲得．第 66 回日本電気泳動学会総会．2015.09.05 (東京都大田区、東京工科大学蒲田キャンパス)

蔣 世旭、中島裕康、佐藤雄一、他．Microdissection に基づいた DNA アレイによる肺腺癌微小乳頭成分遺伝子発現の解析．第 104 回日本病理学会総会．2015.04.30 (愛知県名古屋市、名古屋国際会議場)

佐藤雄一・二次元電気泳動を基盤とした自己抗体解析とエバネセント波を利用した検査への応用 第 37 回日本分子生物学会年会．2014.11.26 (神奈川県横浜市、パンフィコ横浜)

佐藤雄一、長塩 亮、小林 信、他．ランダム免疫法により樹立した肺癌に対する単クローン性抗体の有用性について．第 60 回日本病理学会秋期特別総会 2014.11.20 (沖縄県浦添市、浦添市産業振興センター)

佐藤雄一、長塩 亮、小林 信、他．S1-21 自己抗体が認識する抗原タンパク質の検出法の開発．第 65 回日本電気泳動学会総会．2014.10.25 (神奈川県横浜市、横浜情報文化センター)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：早期診断用肺癌診断薬及びその利用
発明者：佐藤雄一、小林 信、他

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2015-113641 号

出願年月日：平成 27 年 06 月 04 日

国内外の別：国内

名称：ヒト微乳頭肺腺癌細胞株及びその利用

発明者：佐藤雄一、鉢村和男、他

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2015-052548 号

出願年月日：平成 27 年 03 月 16 日

国内外の別：国内

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

<http://kerid-web.kitasato-u.ac.jp/scripts/websearch/index.htm?lang=ja>

6．研究組織

(1)研究代表者

佐藤 雄一 (SATO Yuichi)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：30178793