

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09216

研究課題名(和文) 治療標的検索のための肺がん細胞におけるメカニカルストレスの解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanical stress in lung cancer cells for therapeutic target search

研究代表者

近藤 征史 (Kondo, Masashi)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：00378077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞は、周囲からの物理的な力に対して特異的な反応を有することが予想されている。肺がん細胞株にストレッチ刺激や基質硬度的変化などの物理刺激を与えて、細胞増殖や分子発現への影響を検討した。基質硬度的低下により、PD-L1の発現は低下し、細胞増殖は抑制された。薬理的な実験より、アクチン依存的な機序であった。腫瘍の基質の硬度などの物理的な微少環境が腫瘍免疫の制御にも関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells have a specific response to the physical force from the surroundings. Physical stimuli such as stretch stimulation and changes in matrix stiffness were applied to lung cancer cell lines and its effect on cell proliferation and molecular expression was examined. As the matrix stiffness decreased, expression of PD-L1 decreased and cell proliferation was suppressed. From pharmacological experiments, it was due to an actin-dependent mechanism. It was suggested that the physical microenvironment of the tumor such as matrix stiffness, is also involved in the regulation of tumor immunity.

研究分野：呼吸器

キーワード：肺癌

1. 研究開始当初の背景

肺がん治療は、分子標的薬の開発などにより、著しく進歩しているが、進行肺がんにおいて未だ根治できる可能性は低く、新たな可能な治療標的を見出し、新たな肺がんの治療戦略を創出する必要があると考えた。本研究では、従来実施してきた分子生物学的な手法に加えて、共同研究者が開発してきたメカニカルストレスの実験手法を肺がん細胞に応用することを考えた。それにより、正常細胞と違う特異な肺がん細胞の反応性を解明し、さらに、がん細胞特有の脆弱性を見出し、新たな治療の基盤の開発を目的とした。

共同研究者は、気管支喘息や肺傷害の病態解明のために、気道平滑筋、肺血管内皮細胞、肺線維芽細胞におけるストレッチ刺激により、 Ca^{2+} の細胞内流入、細胞骨格の変化、ATPの放出を検討し、メカニカルストレスの生理的な意義を解明してきた。

がん組織は浸潤・転移過程で、種々の物理的な力(メカニカルストレス)にさらされ、細胞間でbiophysical signalをやりとりしている。正常細胞と違い、そのようなストレス下においても、浸潤や転移を生じるには、がん細胞特有の細胞応答の存在が予想された。我々は、ストレッチ刺激により、がん細胞においても、ストレッチ刺激により、細胞の増殖能などが変化する可能性あると考えた。また、がん細胞は、足場非依存の環境下で生存・増殖は可能であるが、コラーゲン、ラミンなどの細胞外基質の増加により癌組織は固く、がん細胞の増殖は、基質の弾性度に左右される可能性がある。がん細胞は、その周囲の基質の弾性から影響を受ける可能性があると考えられた。

以上のごとく、肺がん細胞においもメカニカルストレスが、細胞内および細胞間の情報伝達に重要な役割を担い、その解明が新たな治療標的に役立つと考えた。

2. 研究の目的

がん細胞は、周囲からの物理的な力に対して特異的な反応性を有すると推測される。本研究では、がん細胞に対する物理的な力(メカニカルストレス)の解析により、がんの進展・転移のメカニズムの理解を深め、それを阻止する新たな治療戦略の立案を目的とする。がん細胞は、浸潤や転移する際に、多様なメカニカルストレスに曝される。このため、がん細胞は、これらのストレスを克服する能力を有すると考えられる。また、がん細胞は、周囲にコラーゲンなどの細胞外基質が富み、癌は組織全体としては固く、がん細胞の増殖、進展には、基質の弾性に左右される可能性がある。これらの物理的な力の肺がん細胞の増殖、浸潤、転移に与える作用を解明する。

3. 研究の方法

1) ストレッチ刺激に対する肺がん細胞への影響

ファイブロネクチンをコートしたシリコンチャンバーに肺癌細胞株を培養し(30000個/2 cm × 2 cmチャンバー)、細胞伸展装置(OST-150; Strex社、大阪)を用いて、ストレッチ刺激(細胞伸展)を与える。刺激後の細胞増殖能を検討した。

細胞株は、NCI-H1299、A549を用いた。刺激後(30往復/分、2時間)、3日後、5日後に細胞数をカウントした。

2) 基質の硬度が肺がん細胞に与える影響

培養dish表面の硬度をハイドロゲルにより調整できる Petrisoft (Matrigen社 CA)を用いて、種々の硬度条件(0.5kPa、2kPa、50kPa、通常の培養; plastic)で培養をした。顕微鏡下にて、細胞数をカウントし、形態変化を観察した。

3) 基質硬度による PD-L1 の発現の制御

・細胞株

HCC827, NCI-H1975, and A549を用いた。

・細胞増殖能

顕微鏡下で、目視にて細胞数をカウントした。

・ウェスタンブロット法

細胞株より、ライセートを作成して、5~20% linear gradient running gel (Wako, Osaka, Japan)を用いて、SDS-PAGE法で、たんぱく質を分離した。nitrocellulose membranesにtransferして、PD-L1(dilution 1:1000, #13684; Cell Signaling Technology, Danvers, MA)と rabbit polyclonal anti-actin (dilution 1:10000, A2103; Sigma-Aldrich)でPD-L1の発現を検討した。

・免疫染色法

4% formaldehyde and 0.2% Triton X-100を含むPBSにてfixとpermeabilizeをおこなった。ウェスタンブロットと同様な a rabbit monoclonal anti-PD-L1 antibody (dilution 1:500, #13684; Cell Signaling Technology)を用いた。

Filamentous actin (F-actin)と細胞核は、rhodamine phalloidin (dilution 1:1000, R415; Thermo Fisher Scientific)と4,6-diamino-2-phenylindole(DAPI)(dilution 1:1000, D523; Dojin, Kumamoto, Japan)にて染色した。

・RNA干渉

PD-L1遺伝子に対する short interfering RNAs (siRNAs) s26547, s26548, s26549; Sigma-Aldrich)と control siRNA (#983657; Thermo Fisher Scientific)を使用した。細胞への導入は RNAiMAX reagent (#13778150; Thermo Fisher Scientific)を用いて、マニュアルに従い、実施した。

細胞数は、WST-1 Assay Kit (Roche, Basel, Switzerland)を用いて測定した。

4. 研究成果

1) ストレッチ刺激の影響

種々のストレッチ刺激の条件を検討したが、肺癌細胞で短期間のストレッチ刺激の有無により、増殖能の違いは検出できなかった。また、抗がん剤(ゲムシタピン)の投与を行うものも、ストレッチ刺激の有無で細胞増殖能に影響は生じなかった。

2) 基質の硬度の影響

不死化肺上皮細胞株(HBEC), Kras を遺伝子導入した不死化肺上皮細胞株(HBEC 3KT KRA), 中皮腫細胞株(MESO1), 肺癌細胞株(NCI-H145, A549, NCI-H460)を弾性度の違う基質で培養して、5日後に細胞増殖、細胞検体を観察した。

HBEC, HBEC 3KTKRAS, 中皮系の MESO1 は軟らかい基質でも、増殖は保たれていた。NCI-H1975 や A549 は、0.5kPa では、胞体が丸くなり、増殖が抑制されました。一方、NCI-H460 では、抑制は認められなかった。(図1、2)

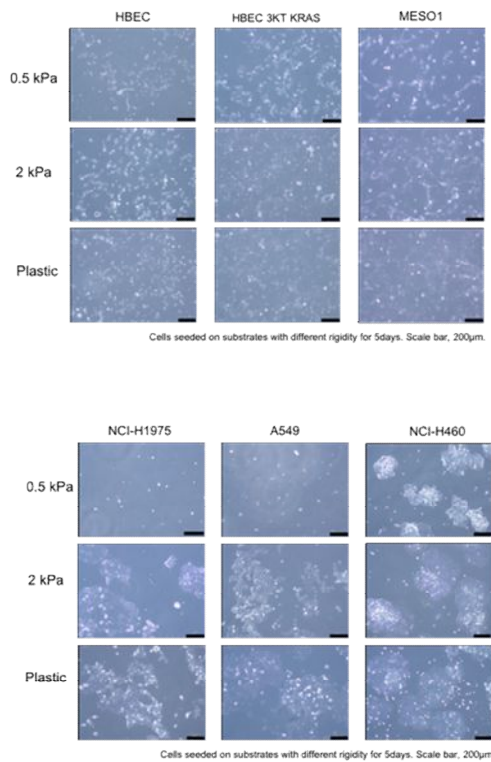


図1 細胞株の基質硬度依存的な増殖と形態変化

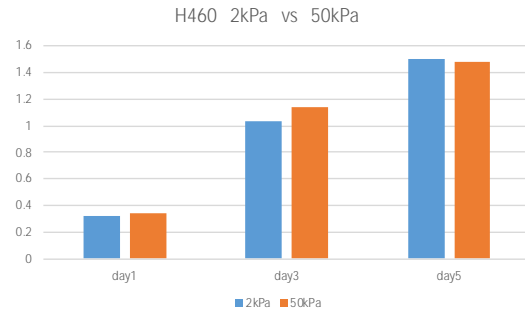
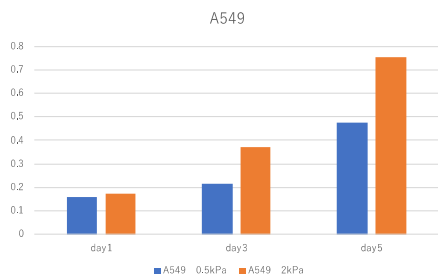


図2 細胞株の増殖 (A549 と H460)

A549 は、基質硬度依存的に増殖抑制されるが H460 は増殖抑制が生じない。

3) 基質硬度による PD-L1 の発現の制御

1) および 2) の条件で、腫瘍免疫において重要な分子である PD-L1 の発現が、物理的な刺激により変化することを見出した。

肺癌細胞株 HCC827, H1975, A549 における通常の plastic dishes における PD-L1 の発現を検討した。3 細胞株ともに、IFN- γ (100 ng/ml) により、発現が上昇した。発現が最も強い細胞株 HCC827 を用いて、基質硬度を低下させる (25, 2kPa) と、PD-L1 の発現が低下した (ウエスタンブロット法 図3、免疫染色法)。

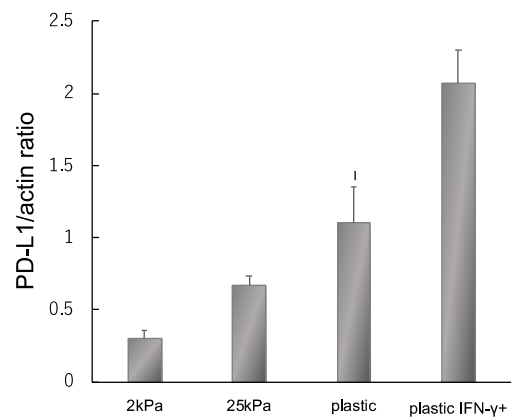


図3 PD-L1 発現が、基質硬度の低下により、減少することを示す(ウエスタンブロット法)

基質硬度を低下させる (2kPa) と、細胞増殖が低下して、細胞の形態が丸くなった (図4)。

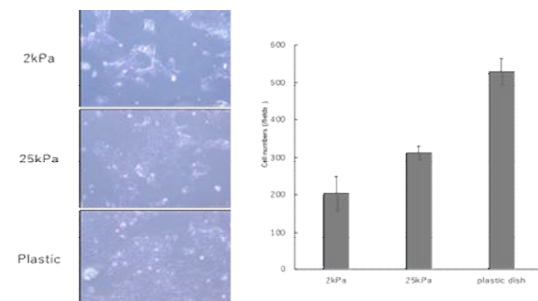


図4 基質硬度による細胞形態および細胞増殖に対する影響

染色法にて、細胞株 HCC827 における PD-L1 発現量、F-actin 量を 2 kPa gels、25 kPa gels、plastic dish で検討すると、PD-L1 と F-actin ストレスファイバーは、2 kPa gels で減少していた。また、細胞を浮遊状態にすると PD-L1 発現量は著明に減少したが、IFN- γ 投与により回復した。

また、PDL1 の RNA 干渉により、PD-L1 の発現を減少させると、F-actin 形成は保持されていた。一方、F-actin の重合阻害剤である cytochalasin D を投与すると PD-L1 の発現が有意に低下した。以上より、基質硬度により PD-L1 の発現制御は、F-actin を介している可能性が示唆された。さらに、RNA 干渉により、PDL1 分子の発現を低下させると、細胞増殖も抑制された。

以上より、物理学的な力が、肺がん細胞の増殖や腫瘍免疫にも関与していることが示唆された。

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 4 件)

(1) Miyazawa A, Ito S, Asano S, Tanaka I, Sato M, Kondo M, Hasegawa Y. Regulation of PD-L1 expression by matrix stiffness in lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 495:2344-9. 2018 DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.12.115 (査読有)

(2) Kakumu T, Sato M, Goto D, Kato T, Yogo N, Hase T, Morise M, Fukui T, Yokoi K, Sekido Y, Girard L, Minna JD, Byers LA, Heymach JV, Coombes KR, Kondo M, Hasegawa Y. Identification of proteasomal catalytic subunit PSMA6 as a therapeutic target for lung cancer. *Cancer science* 108:732-43. 2017 DOI:10.1111/cas.13185. (査読有)

(3) Asano, S, Ito, S, Takahashi, K, Furuya, K, Kondo, M, Sokabe, M, Hasegawa, Y. Matrix stiffness regulates migration of human lung fibroblasts. *Physiological Reports* 9:e13281. 2017 DOI: 10.14814/phy2.13281 (査読有)

(4) Hida T, Nokihara H, Kondo M, Kim Y, Azuma K, Seto T, Takiguchi Y, Nishio M, Yoshioka H, Imamura F, Hotta K, Watanabe S, Goto K, Satouchi M, Kozuki T, Shukuya T, Nakagawa K, Mitsudomi T, Yamamoto N, Asakawa T, Asabe R, Tanaka T, Tamura T. Randomised phase 3 trial of alectinib

versus crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer. *Lancet* 309:29-39. 2017 DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30565-2 (査読有)

[学会発表](計 1 件)

Kato T, Sato M, Kondo M, Goto , Kato T, Kakumu T, Yogo N, Hase, Morise M, Fukui T, Girard L, Minna JD, Hasegawa Y Cytochrome c oxidase subunit 5a (COX5A) is identified as a potential therapeutic target for lung cancer with high therapeutic index through a pooled shRNA screen アメリカ癌学会 2016

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 征史 (Kondo Masashi)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号: 00378077

(2) 研究分担者

佐藤光夫 (Sato Mitsuo)
名古屋大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 70467281

伊藤 理 (Ito Satoru)

愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 60378073

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

宮澤 亜矢子 (Miyazawa Ayako)