

令和元年6月19日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19086

研究課題名(和文)がん産生ケモカインリガンドを起点とした肺癌の生物学的特性の解明

研究課題名(英文)Biological elucidation of lung cancer originating from cancer cell producing chemokine ligand

研究代表者

梅田 茂明(Umeda, Shigeaki)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：30644439

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)：ケモカインリガンドとレセプターの一つであるCXCL7とCXCR2での発現を検討した。リアルタイムPCRを用いたCXCL7の検討では、腺癌や小細胞癌ではmRNAの発現が認められたが、扁平上皮癌や正常の気道上皮や間質細胞では発現が認められなかった。ヒト肺癌切除検体を用いた免疫染色では低分化腺癌で発現の亢進が認められた。リアルタイムPCRを用いたCXCR2の検討では、扁平上皮癌細胞株でmRNAの発現亢進が認められた。免疫染色では肺癌細胞はCXCR2の発現は弱いか微量であった。癌細胞の発現するCXCL7が悪性化に関わり、癌細胞周囲のCXCR2陽性炎症細胞へ働きかける可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CXCL7の発現は高分化な癌細胞で弱く、低分化な癌細胞で発現が強く見られた。このことは癌細胞の悪性度が増す中で、癌細胞の生存にとって有効な環境を作るものである可能性が示唆された。CXCR2の発現は癌細胞で確認できなかった。CXCL7の発現態度と合わせて考えるとCXCL7の作用ターゲットは癌細胞自身に働きかけるものではなく、癌細胞の周囲への炎症細胞へ作用する可能性が示唆された。癌細胞自身のCXCL7への発現や癌細胞周囲の炎症細胞でのCXCR2の発現を抑えることは、癌の免疫療法を開発する上で重要な基礎データとなりうる。

研究成果の概要(英文)：Expression of a chemokine ligand, CXCL7 and a chemokine receptor, CXCR2 in lung cancer was examined. The real time PCR analysis revealed the mRNA of CXCL7 was reduced in adenocarcinoma and small cell carcinoma. However, squamous cell carcinoma, normal airway cells and stromal cells had no CXCL7 expression. The mRNA of CXCR2 was overexpressed in squamous cell carcinoma. Immunohistochemistry detected weak CXCR2 expression in lung cancer cells.

研究分野：人体病理

キーワード：ケモカインリガンド ケモカインレセプター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

当該研究室では、これまでに変異型 *KRAS* 遺伝子を不死化気道上皮細胞に導入した *in vitro* 実験モデルのマイクロアレイ解析からがん遺伝子によって発現誘導された分子を抽出し、それら分子の肺癌における発生や進展に関わる機序を報告してきた。このマイクロアレイ解析では、コントロール群と比較して変異型 *KRAS* 遺伝子導入群で複数のケモカインリガンド (PPBP/CXCL7, CCL3, CXCL2) の発現亢進が認められた。リアルタイム PCR 解析により CXCL7 はヒト気道上皮細胞株やヒト線維芽細胞株に mRNA の発現がないこと、幾つかのヒト肺癌細胞株で高発現があることが明らかとなった。肺癌手術検体を用いた免疫染色ではがん細胞に強発現する CXCL7 を局在化した(図 1)。この図写真に示すように CXCL7 陽性肺癌は充実性増殖の構造形態を示す低分化腺癌や低分化扁平上皮癌のような分化度の低い癌で多いことが判明した。また、同一標本内でもがん細胞の CXCL7 発現がより強い部分では周囲に炎症細胞がより多く集簇していた。

ケモカインとは G タンパク質共役受容体を介して細胞間の相互反応を媒介するサイトカインの一つで、1987 年の Yoshimura らによる IL-8 /CXCL8 の報告から現在までに 50 種類以上のケモカインと 20 種類以上のケモカインレセプターが同定されている。CXCL7 は CXC ケモカインファミリーに属していて、血小板に由来し増殖因子として働く。ケモカインの役割が白血球の遊走という炎症における基本的な機能から、腫瘍の血管新生、播種や転移に拡大していく中で、がんにおける CXCL7 の存在も徐々に報告されてきている。肺癌においては、癌患者の末梢血を用いたマスベクトトロメトリーによって CXCL7 が候補分子の中から同定され、その血清値が肺癌の進行と相関することが ELISA 法によって証明され、新規バイオマーカーとしての役割が期待されている(J. Yee et al., *Journal of Clinical Oncology* 2009)。最近のマウス肺癌細胞モデルを用いた Unver らの実験では、CXCL7 陽性のマウス癌細胞は CXCL7 陰性癌細胞と比較して発育が早いことが示されている(N. Unver et al., *Cytokine* 2015)。ヒト肺癌組織標本を用いた CXCL7 の免疫染色の研究報告はこれまでになく、本研究が初めてである。

CXCL7 は CXCR2 を特異的受容体として認識し、その作用を引き起こすと言われてきた。CXCR2 は主として好中球やマクロファージ、腫瘍細胞に発現している。上記 Unver らの研究では CXCL7 陽性癌細胞が CXCR2 とは独立してマクロファージの遊走を促すと報告している。我々の肺癌臨床検体を用いた CXCR2 免疫染色の予備実験からは CXCL7 陽性癌細胞には CXCR2 の発現はなく、オートクラインのシグナル伝達様式は否定的であった。CXCL7 陽性肺癌でがん細胞周囲の炎症細胞に CXCR2 が多く染まる症例も幾つかあったが、CXCL7 陽性癌細胞周囲に CXCR2 の発現のない炎症細胞が集簇する症例もあり、パラクラインの伝達様式や未知の受容体を介した機序も示唆される(図 2)。

以上の背景から、肺癌において CXCL7 は、がん周囲の炎症細胞を含む微小環境と協調しつつ悪性度の高い癌を規定する因子である可能性が十分にある。

2. 研究の目的

申請者は肺癌細胞にケモカインリガンドの一つである CXCL7 の発現があることを発見した。がんにおけるケモカインの役割については、がん細胞に発現するケモカイン受容体や炎症細胞の分泌するケモカインリガンドががんの微小環境に及ぼす影響についての報告は蓄積されてきているが、がん細胞自身の産生するケモカインリガンドに着目した報告はまだ少ない。本課題では、CXCL7 陽性肺癌の悪性度を規定し、CXCL7 の発現調節機構の解明やがん細胞における CXCL7 の機能解析、さらには CXCL7 結合蛋白の同定を通して、ケモカイン産生肺癌のがんとしての性質とがんを取り巻く微小環境の分子基盤の一端を明らかにする。

3. 研究の方法

神奈川県立循環器呼吸器病センターにおいて切除された肺癌手術例のうち、研究利用の同意が得られたヒト肺癌の症例については、パラフィン包埋標本が保管されている症例が 1000 例以上あり、手術時の臨床所見や臨床経過、病理学的項目についての情報はデータベース化されている。CXCL7 陽性肺癌を免疫染色により抽出し、そのがんの組織型や分化度、病期、脈管侵襲、リンパ節転移、他臓器転移、病期との相関、EGFR, KRAS, ALK を含むドライバー遺伝子異常との関係を検討する。抗 CXCL7 抗体としては R&D Systems 社のマウスモノクローナル抗体を用い、ヒト正常骨髄の巨核球を陽性コントロールとして免疫染色を行う。この抗体を用いた予備実験の染色では、血清にも含まれるケモカインの免疫染色一般で見られがちな背景の染色は抑えられていて特異性は高く、陽性と陰性の部位が明瞭なコントラストを形成している。

4. 研究成果

ケモカインリガンドとレセプターの一つである CXCL7 と CXCR2 での発現を検討した。リアルタイム PCR を用いた CXCL7 の検討では、腺癌や小細胞癌では mRNA の発現が認められたが、扁平上皮癌や正常の気道上皮や間質細胞では発現が認められなかった。ヒト肺癌切除検体を用いた免疫染色では低分化腺癌で発現の亢進が認められた。リアルタイム PCR を用いた CXCR2 の検討では、扁平上皮癌細胞株で mRNA の発現亢進が認められた。免疫染色では肺癌細胞は CXCR2 の発現は弱いか微量であった。癌細胞の発現する CXCL7 が悪性化に関わり、癌細胞周囲の CXCR2 陽性炎症細胞へ働きかける可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

1. Aiko N, Sekine A, Umeda S, Katano T, Matama G, Isomoto K, Otoshi R and Ogura T. The Spontaneous Regression of Grade 3 Methotrexate-related Lymphomatoid Granulomatosis: A Case Report and Literature Review. Intern Med 2018; (査読あり)
2. Umeda S, Okudela K, Kojima Y, Mitsui H, Tateishi Y, Suzuki T, Saito Y, Matsumura M, Arai H and Tajiri M. Loss of IL-24 expression facilitates invasion in lung adenocarcinoma. Int J Clin Exp Pathol 2017; 10: 173-185. (査読あり)
3. Yamakawa H, Sekine A, Kato T, Yamanaka Y, Hagiwara E, Umeda S and Ogura T. A case of severe arthralgia with malignant mesothelioma-associated hypertrophic osteoarthropathy. Clin Case Rep 2016; 4: 1057-1060. (査読あり)
4. Matsuo N, Sekine A, Kato T, Hosoda C, Ito H, Baba T, Umeda S, Iwasawa T, Okudela K and Ogura T. Promising Effect of Crizotinib on Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)-Positive Non-Small Cell Lung Cancer in an Elderly Patient with a Poor Performance Status: A Case Report and Literature Review. Intern Med 2016; 55: 507-509. (査読あり)
5. Arai Y, Chiba Y, Umeda S, Ohara Y, Iwai T, Komatsu M, Yabuki K, Sano D and Oridate N. Reduction surgery using a combination of a stereolithographic model and navigation system for ossifying fibroma with secondary central giant cell granuloma. Auris, nasus, larynx 2016; 43: 207-211. (査読あり)
6. Arai H, Tajiri M, Kaneko S, Kushida Y, Ando K, Tachibana T, Umeda S, Okudela K, Komatsu S and Masuda M. Two surgical cases of thymic MALT lymphoma associated with multiple lung cysts: possible association with Sjogren's syndrome. Gen Thorac Cardiovasc Surg 2016; (査読あり)
7. 新堀 萌香, 中井川 昇, 横溝 由美子, 笠原 亮, 佐藤 元己, 蓮見 壽史, 林 成彦, 槇山 和秀, 近藤 慶一, 梅田 茂明 and 矢尾 正祐. 嫌色素性腎細胞癌を合併した黄色肉芽腫性腎盂腎炎の一例. 日本泌尿器科学会雑誌 2017; 108: 154-157. (査読あり)
8. 金子 太一, 佐藤 高光, 栗田 裕介, 岩崎 暁人, 加藤 真吾, 香川 幸一, 細野 邦広, 梅田 茂明, 遠藤 格, 中島 淳 and 窪田 賢輔. 腓尾部 epidermoid cyst に合併し偶発的に検出された微小浸潤膵管癌の1例. 膵臓 2017; 32: 168-177. (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

1. Shigeaki Umeda, Koji Okudela, Yoko Tateishi, Mai Matsumura, Kenichi Ohashi. The Role of IL-24 in Lung Adenocarcinoma. United States & Canadian Academy of Pathology Annual Meeting. San Antonio, 2017, Mar.
2. SIMPLE 染色法とデジタル病理学的検査を用いたマルチプレックス免疫組織化学的検査 (Multiplex immunohistochemistry using SIMPLE staining method and digital pathology)(英語)
Author : 梅田 茂明(横浜市立大学 医学部病態病理学), 片岡 俊朗, 松村 舞依, 小池 千尋, 奥寺 康司, 日比谷 孝志, 立石 陽子, 三井 秀昭, 大橋 健一
Source : 日本病理学会会誌(0300-9181)107 巻1号 Page401(2018.04)
3. 肺腺がんにおいて IL-24 の発現損失は浸潤を促進する (Loss of IL-24 expression facilitates invasion in lung adenocarcinoma)(英語)
Author : 梅田 茂明(横浜市立大学 医学部病態病理学), 奥寺 康司, 小島 陽子, 三井 秀昭, 立石 陽子, 鈴木 健久, 松村 舞依, 斎藤 悠一, 大橋 健一
Source : 日本病理学会会誌(0300-9181)106 巻1号 Page330(2017.03)
4. 肺生検のホルマリン固定液に残存した微小組織回収法とその有用性
Author : 本田 恵美(神奈川県立循環器呼吸器病センター 検査), 太田良 美沙, 難波 郁子, 梅田 茂明, 奥寺 康司, 大橋 健一, 亀田 陽一
Source : 日本病理学会会誌(0300-9181)106 巻1号 Page372(2017.03)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。