

令和元年5月21日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16063

研究課題名(和文)喫煙誘導マウスモデルにおける肺がん発生機序

研究課題名(英文)Mechanism of lung tumorigenesis in smoke exposure mouse model.

研究代表者

中鉢 正太郎 (Chubachi, Shotaro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：90464867

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)：喫煙による発癌と気腫発生の双方に関わる機序は未解明であり、肺癌と肺気腫の両病態を同時に評価可能な動物モデルは存在しなかった。我々は、A/Jマウスに対して発癌誘導物質であるNNKを投与後にタバコ煙曝露を間歇的に行い、喫煙誘導性に肺癌と肺気腫が生じるモデルを作製した。間歇曝露群では、3か月間の連続曝露群に比し、肺腺癌の形成が促進し、肺気腫も進行した。さらに、間歇タバコ煙曝露により形成された肺腺癌では、癌内部と周囲にM2マクロファージが局在していた。本研究結果は気腫を背景肺とした肺癌の予防薬・治療の検討に有用な動物モデルを供するものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、肺がん発現に至るまでの経時的な遺伝子変化、慢性炎症、酸化ストレスを評価可能なことである。また連続喫煙群と、禁煙群の肺に与える影響の差を明らかにできることである。肺がんの発症予防は臨床的に非常に重要な分野であり、ヒトを対象にしたphase 試験も複数行われている。しかしこうした臨床研究で効果の確立したChemopreventionの薬剤は未だないのが現状である。本研究の結果により、肺癌のchemopreventionの薬剤開発のためのpreclinical modelの提唱、chemopreventionが有効である対象の選択、マーカーの探索の開発につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms involved in smoke-induced tumorigenesis and emphysema are not fully understood, attributable to a lack of appropriate animal models. Here, we optimized a model of intermittent cigarette smoke induced lung cancer and emphysema in A/J mice treated with NNK, a potent carcinogen. Intermittent CS exposure increased the severity of emphysema and resulted in a higher incidence of adenocarcinomas. Furthermore, intermittent CS exposure elicited a marked increase in M2-polarized macrophages within and near the developed tumors. This model is also suitable for screening putative chemo-preventive agents, and serves as a therapeutic intervention that mimics progressive human lung cancer with emphysema in smokers.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：COPD 肺気腫 肺癌 マウス

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

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌は慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の重要な併存症であり、COPD 患者の死因の 5-38% を占める。肺気腫・肺癌の両者に共通する病態は不明であり、適切な治療薬・予防薬は確立していない。そのため動物モデルを用いた発癌機序の解明・治療薬や予防薬の効果の検討が必要とされている。喫煙は肺癌発症リスクであり、pack - years が指標となる。しかし個人の禁煙歴と発癌の関係は明らかではない。マウスでは長期間連続喫煙曝露のみで肺癌は発生しにくいと報告されている<sup>1</sup>。

### 2. 研究の目的

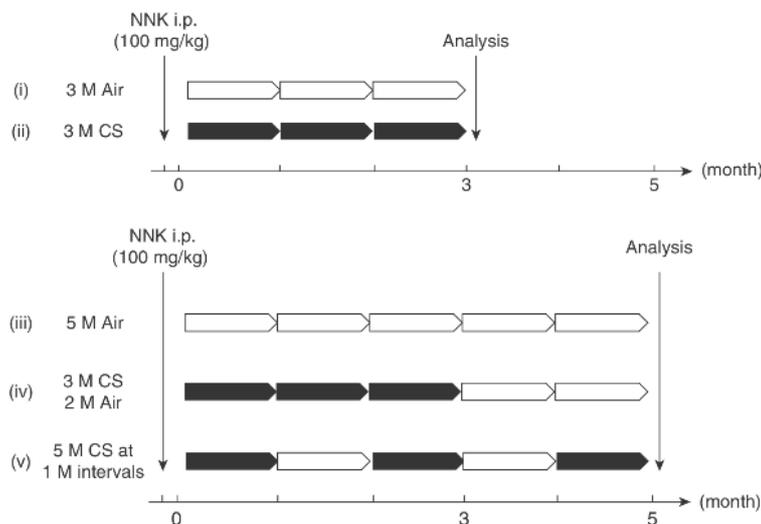
喫煙誘導肺気腫・肺癌マウスモデルを確立することを目標に検討を行った。具体的には種々の喫煙プロトコルによる喫煙曝露をも行い、肺気腫の程度、肺腫瘍や肺癌の形成、さらに炎症プロファイルの相違、腫瘍関連マクロファージに特に焦点を当てて検討を行った。

### 3. 研究の方法

A / ♂ 雄性マウス (7-10 週令) に 4 - (methylnitrosamino) - 1 - (3 - pyridyl) - 1 - butanone 100 mg / kg を腹腔内投与後主流煙の経鼻的喫煙曝露を行った (1 時間 / 日, 5 日間 / 週)。ヶ月間連続喫煙群 (3M CS、3M CS 2M Air)、喫煙と禁煙を 1 ヶ月ずつ交互に繰り返し総喫煙期間を 3 ヶ月とした間歌喫煙群 (5MCS at 1M intervals)、空気曝露群 (3M Air、5M Air) を比較した (図 1)。パラフィン固定肺の連続切片を用い、肺胞腔系・腫瘍性病変の個数と長径を測定し、SPC、CC10、Lectin、Arig1 の免疫染色を行った。また気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取し、炎症細胞の比較を施行した。

肺腫瘍の大きさの経時評価のため、マイクロ CT を施行し経時的な肺腫瘍径の比較を行った。

図 1



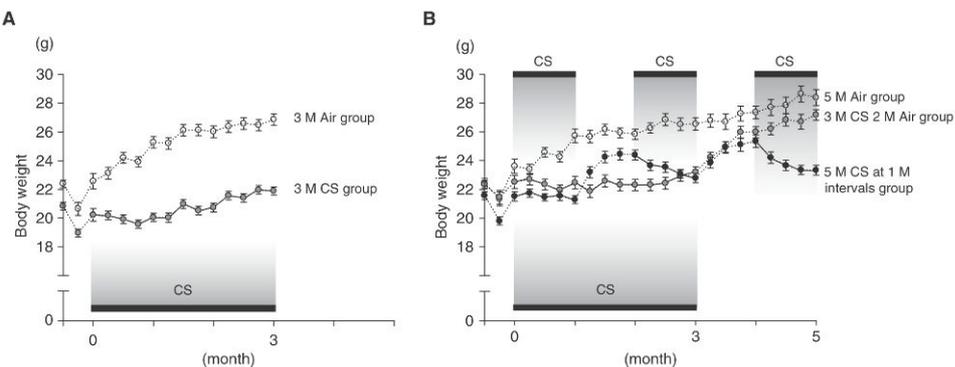
### 4. 研究成果

#### < 研究結果 >

#### (1) 喫煙の体重増加に対する作用

連続喫煙群は空気曝露群で見られた体重の増加が抑制された。しかし、その後の 2 ヶ月の喫煙中断により体重は空気曝露群に近い体重まで回復をした。一方間歌得喫煙群においては、喫煙施行中の体重増加は乏しかったが、喫煙中断をすると回復するという人間の喫煙、禁煙中の体重推移を模倣した経過をたどった (図 2)。

図 2

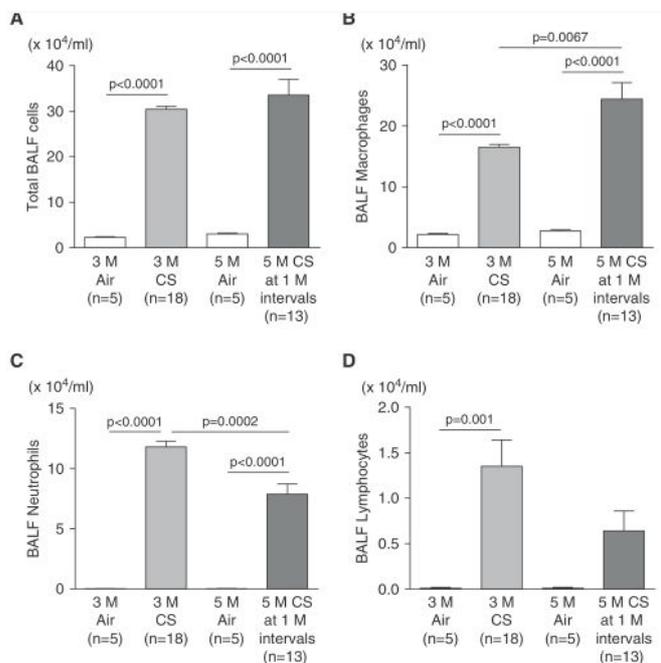


#### (2) 喫煙の肺炎症に対する作用

気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞は連続喫煙群、間歌喫煙群ともに高度であったが、

マクロファージ数は間歇喫煙曝露群の方が連続喫煙群と比して多く認めた (図3)。

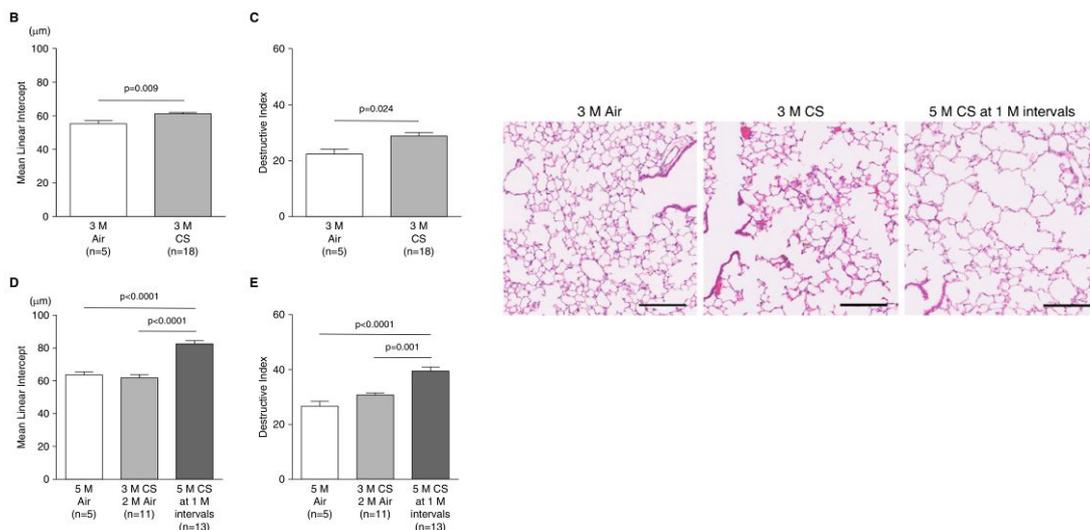
図3



### (3) 間歇喫煙の気腫増強効果

空気曝露群と比較して連続喫煙群では平均肺胞径 (Mean Linear Intercept)、肺胞破壊指数 (Destructive index) が高値、つまり肺の気腫化を認めた。さらに間歇喫煙群では、連続喫煙群に比べ両指標が高値であった (図4)。

図4

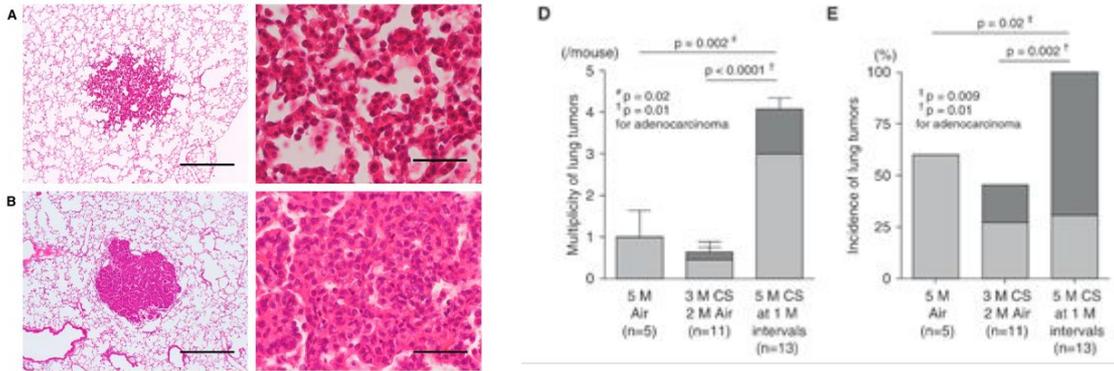


### (4) 間歇喫煙の肺腫瘍増強効果

間歇喫煙曝露により図5のような肺腫瘍が発生した (A: 腺腫、B: 腺癌)。

間歇喫煙群では、連続喫煙群に比べ肺腫瘍発生個数及び肺癌発生個数が多かった (図5、濃いグレー: 腺癌、薄いグレー: 腺腫)。

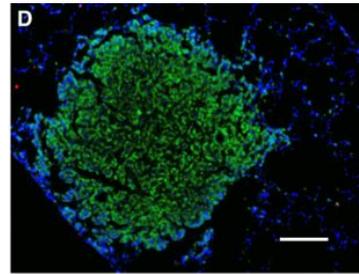
図 5



(5) 肺腺癌の分子学的特徴

間歇喫煙曝露で生じた肺腺癌の腫瘍細胞は surfactant protein C (SPC) 陽性かつ Clara cell 10 - kDa protein 陰性で II 型肺胞上皮起源と考えられた (図 6、緑 ; SPC)。

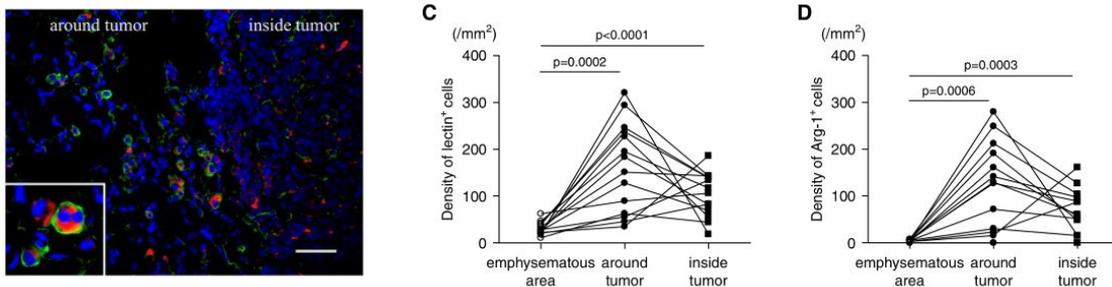
図 6



(6) 肺腺癌への M2 マクロファージの集積

BALF にて間歇喫煙群にてマクロファージの増加を認めていたため、腫瘍関連マクロファージである M2 マクロファージを免疫染色にて評価を行った。その結果、肺腺癌周囲には M2 マクロファージの高度の浸潤を認めた (図 7 ; 緑 : lectin、赤 : arg1)。

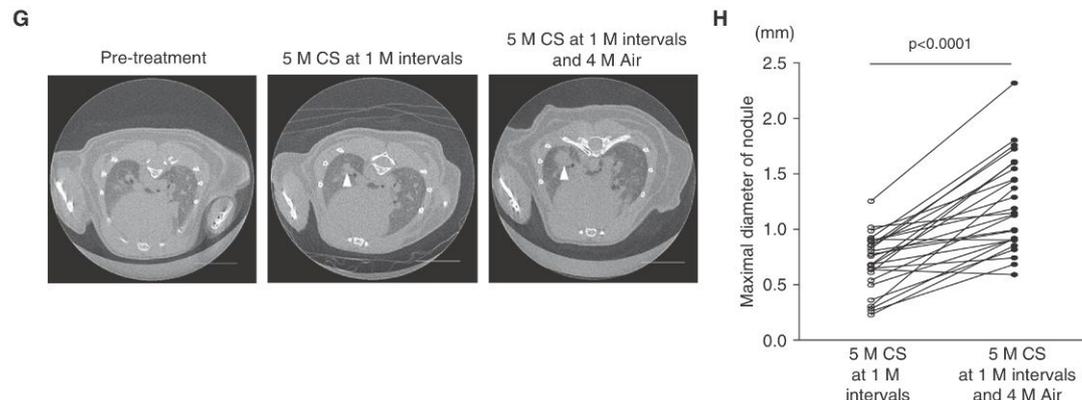
図 7



(7) 肺腫瘍のマイクロ CT を用いた経時変化の検討

間歇喫煙曝露プロトコールを 5 ヶ月終了後に、経過観察を行い肺腫瘍径の計測を行った。間歇喫煙により形成された肺腫瘍は、その後経過観察のみで増大をしており (図 8) 臨床的にも意味がある喫煙誘導肺気腫・肺癌モデルであると考えられた。

図 8



< 考察 >

喫煙曝露プロトコールを調整することで、喫煙曝露総量は変えることなく肺気腫・肺癌を高率に発生するマウスモデルを確立した。腫瘍は II 型肺胞上皮細胞が起源とも考えられるが、ヒ

ト肺癌では CC10 の欠失が確認されており<sup>2</sup> SPC-CC10 共陽性細胞が CC10 を欠失している可能性も考えられる。

COPD の病態としてマクロファージを主体とした炎症の関与は多く報告されているが、近年癌化及び癌の進行に M2 マクロファージの関与が確認されている<sup>3</sup>。M2 マクロファージの浸潤と予後の関連も多くの癌で報告されており<sup>4</sup>、本研究モデルの肺癌への M2 マクロファージの結果は先行研究と矛盾しない結果である。

連続喫煙で肺気腫がマウスにおいてもヒトと同様に生じることは多く報告されているが、間歇喫煙群の方がさらに肺気腫が高度であったことは驚くべきことであり、肺腫瘍と同じ動向を示したことは両者に共通した病態があると推察される結果である。

COPD に合併する肺癌の病態は複雑であると推察されており<sup>5</sup>、本研究の結果である間歇喫煙曝露が連続喫煙曝露よりも肺腫瘍特に肺腺癌を多く発生させた理由に関しては不明である。本研究により明らかにされた喫煙誘導肺気腫・肺癌モデルは世界に初めての気腫と肺癌の両者を評価できるモデルであり、今後の COPD の病態解明、COPD に合併する肺癌の発症機序や治療薬の開発に有用であると考えている。

#### <参考文献>

1. Witschi H, Oreffo VI, Pinkerton KE. Six-month exposure of strain A/J mice to cigarette sidestream smoke: cell kinetics and lung tumor data. *Fundam Appl Toxicol.* 1995;26(1):32-40.
2. Linnoila RI, Szabo E, DeMayo F, Witschi H, Sabourin C, Malkinson A. The role of CC10 in pulmonary carcinogenesis: from a marker to tumor suppression. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;923:249-67.
3. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 2009;86(5):1065-73. PMID: 19741157.
4. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol.* 2002;196(3):254-65.
5. Houghton AM. Mechanistic links between COPD and lung cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(4):233-45.

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Kameyama N, Chubachi S, Hegab AE, Yasuda H, Kagawa S, Tsutsumi A, Fukunaga K, Shimoda M, Kanai Y, Soejima K, Betsuyaku T. Intermittent Exposure to Cigarette Smoke Increases Lung Tumors and the Severity of Emphysema More than Continuous Exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018 Aug;59(2):179-188. doi: 10.1165/rcmb.2017-03750C. (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 亀山直史, 中鉢正太郎, 入江秀大, 堤 昭宏, 安田浩之, 川田一郎, Ahmed E. Hegab, 別役智子. マウスにおける間歇喫煙曝露が肺腫瘍発生に与える影響. 2017 年. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会.
2. N. Kameyama, S. Chubachi, H. Irie, A. Tsutsumi, H. Yasuda, I. Kawada, A.E.M. Hegab, M. Shimoda, T. Betsuyaku. The Influence of Intermittent Smoking Exposure on Lung Tumorigenesis in a Murine Model. *ATS 2017 International Conference.*

〔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

研究協力者氏名 : 亀山 直史

ローマ字氏名 : Kaymeyama, Naofumi

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。