

令和元年5月20日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16607

研究課題名(和文)肺異型腺腫様過形成、腺癌の発癌メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of carcinogenic mechanism of lung atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma

研究代表者

木村 賢二(Kimura, Kenji)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50795325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：異型腺腫様過形成(AAH)は前浸潤病変として分類され、浸潤癌へ進展していくとされる。近年、EGF/RasシグナルとWntシグナルの下流に存在し、肺癌の増殖や遊走能に関わると報告があるArl4cという分子に注目した。正常ヒト微小気管支上皮細胞(SAEC)へKrasG12Vと共にArl4cを導入すると、リン酸化のERKのシグナルが亢進しその増殖能を上げる結果を得た。さらに肺切除標本のAAHを有する症例に対してArl4c抗体で免疫染色を行うと79%の症例でAAH部に発現を認めた。以上から、肺腺癌発生過程であるAAHの病態には、既知のKras変異に加えArl4cも関与している可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺腺癌の前癌病変(AAH)で特異的に発現し、癌化の過程に直接的に関わる遺伝子変異は明らかにされていない。AAH発生の機序を解明して、肺腺癌発症の機序を明確化することは今後の治療薬開発などにおいても重要である。申請者は、肺腺癌の癌化に関わる遺伝子変異を明らかにし、新たな肺癌治療を考案することを目的に研究を開始した。今回、AAHの病態を反映した細胞実験と臨床検体を用いた実験の両面からAAHの病態にArl4c分子が関与している可能性を示したのは初めてのことである。このことは、新たな肺癌治療を考案するのみならず肺癌予防医学にも多大な貢献が期待できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Atypical adenomatous hyperplasia (AAH) is classified as a precancerous lesion and is thought to progress to an invasive cancer. We focused on Arl4c, which is downstream of EGF / Ras and Wnt signals and has been reported to be involved in the growth and migration ability of lung cancer. Mutated KRAS (KrasG12V) and/or Arl4c were introduced into the normal human small airway epithelial cell (SAEC). Cell proliferation of SAEC expressing KrasG12V and Arl4c was remarkably higher than that of SAEC expressing control. Phosphorylation of ERK1/2 was also upregulated in SAEC/KrasG12V/Arl4c. Furthermore, using the specimens resected from patients, Arl4c expression was immunohistochemically examined in AAH. The positive rate of Arl4c was high (79%). From the above, in addition to mutated KRAS, Arl4c also may be involved in the pathogenesis of AAH, which is a process of lung adenocarcinoma development.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 発癌 肺異型腺腫様過形成

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

1. 研究開始当初の背景

異型腺腫様過形成(AAH; Atypical Adenomatous Hyperplasia)は、軽度から中等度の異型度を示す細胞が正常肺胞上皮細胞を置換するように増殖する病変である。肺腺癌は、前浸潤性病変である AAH から進展・発育すると考えられている。AAH は、CT 画像では円形～楕円形の均一なすりガラス影(GGO)を呈することが特徴であり、微小浸潤・浸潤腺癌と混在することも多い。実際に、肺腺癌切除標本の詳細な検討では、その 23.2～29.3%に、AAH と AIS や微小浸潤・浸潤腺癌の混在を認めている。さらに、GGO を呈する AAH やそれと混在する腺癌は、多発することや手術切除後も再発しやすいことが知られており、その治療には薬物療法なども含めて色々と試されているが、しばしば難渋することも多い。これまでに、AAH では p53 遺伝子のヘテロ接合性消失や変異、KRAS(Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)や EGFR(Epidermal growth factor receptor)遺伝子変異を有することが報告されている。一方で、AAH で特異的に発現し、癌化の過程に直接的に関わる遺伝子変異は明らかにされていない。当教室では、正常ヒト微小気管支上皮細胞(HSAEC; human small airway epithelial cell)に hTERT(telomere 延長)、CDK4(pRB pathway 抑制)、Dominant negative form(DN)of p53 を遺伝子導入することで、不死化および癌幹細胞様細胞(SAEC-Triple)が誘導されることに注目した[1]。SAEC-Triple にさまざまな癌遺伝子を導入することで、腺癌、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌へ形質転換を起こし、また動物接種実験ではヒト肺癌と同等な腫瘍を形成することが判明している。しかし、腺癌に関連するとされる EGFR 変異や EML4-ALK 融合遺伝子導入に関する報告はない。また今回、手術標本の解析で、正常組織には発現がなく AAH や腺癌病変で高発現する低分子量 G 蛋白質 ADP-ribosylation factor (ARF)-like 4c(Arl4c)に注目した。Arl4c は、胎生期の上皮管腔組織形成に関与するとされ、Wnt/ β -カテニンシグナルと EGF/Ras シグナルが同時協調的に活性化する。Wnt/ β -カテニンシグナルと EGF/Ras シグナルの異常活性化は肺腺癌の発癌および悪性化に密接に関与することが知られている。そこで、これらの肺腺癌に関連する遺伝子を導入することにより生じる現象を観察し、AAH 発生の機序を明らかにすることを目的として、本研究を計画した。

2. 研究の目的

AAH は、肺胞 II 型上皮細胞あるいは細気管支線毛上皮細胞(クララ細胞)類似の細胞からなる腫瘍であり、肺末梢の限局性病変である。新しい IASLC/ATS/ERS 腺癌分類では、AAH とともに前浸潤病変として分類され、微小浸潤腺癌、浸潤癌へ進展していくと考えられている。したがって、AAH 発生の機序を解明することは、肺腺癌発症の機序を明確化し、新たな肺癌治療を考案するだけでなく肺癌予防医学にも多大な貢献が期待できる。本研究は、「肺腺癌の癌化に関わる遺伝子変異を明らかにし、新たな肺癌治療を考案すること」を目的とした。現在まで報告されている肺腺癌に関連する遺伝子を、正常ヒト微小気管支上皮細胞へ導入することによって生じる現象を観察し、AAH 発生の機序を明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト正常気道上皮細胞へ肺腺癌関連遺伝子導入し培養細胞実験での前癌病変もしくは癌化細胞モデルの細胞を確立する：HSAEC に hTERT, p53 dominant negative form, CDK4 を導入した細胞(SAEC-Triple)や SAEC-Triple 細胞へ、EGFR 変異遺伝子、KRAS 変異遺伝子、Arl4c 遺伝子を導入した。

癌化および異形成に関わる遺伝子により変化する機能変化や蛋白発現の解析： で作成した細胞の表現型について、癌幹細胞様形質、上皮間葉移行(EMT)関連機能や蛋白発現をコントロール細胞と比較して解析した。

生体内での腫瘍形成能の評価： で作成した細胞株が造腫瘍能を生体内で有するかを評価するため、免疫不全マウスの皮下へ接種し、腫瘍形成の有無を観察した。

ヒト臨床検体での検証： 切除標本を用いて、前癌病変からの関連が強いと考えられた Arl4c の抗体を用いて免疫染色を行い、その陽性率と臨床病理学的背景との関連について解析を行う。

4. 研究成果

4-1: ヒト正常気道上皮細胞(SAEC)へ hTERT, p53 dominant negative form, CDK4 を導入して不死化した細胞株(SAEC-Triple)を樹立した。さらに、この細胞へ EGFR 変異(exon19:del:746-450)遺伝子、KRAS 変異(G12V)遺伝子、Arl4c 遺伝子をウイルスベクターで遺伝子導入した後、薬剤 selection を行い、それぞれの遺伝子を安定発現する細胞株(SAEC-delEGFR, SAEC-KRASG12V, SAEC-Arl4c)を樹立した。導入した遺伝子のタンパクが安定発現しているかの評価は、Western-blotting 法により確認できた。

4-2: 4-1 で作成した各種細胞株を用いて、基本的な細胞生物学的解析を行った。まずは正常細胞から異形成および癌化への形質転換を示す指標として増殖能を評価した。2次元培養下での増殖アッセイでは、培地中の growth factor を入れずに培養を行うと、SAEC-delEGFR, SAEC-KRAS, SAEC-Arl4c とともにコントロール細胞と比較して増殖能の亢進を認めた。さらに、SAEC-Arl4c へ KRAS 変異(G12V)遺伝子を導入(SAEC-KRAS/Arl4c)すると、KRAS 変異遺伝子および Arl4c 遺伝子単独導入した細胞と比較して、より増殖能の亢進を認めた。次に、細胞形態において、各種遺伝子導入した細胞株はコントロール細胞株と比較すると紡錘形

である細胞が多いことに注目し、悪性転化の一つの指標でもある上皮間葉移行(EMT)のマーカーを評価することとした。一般的に、EMT が培養細胞で起こっている場合、上皮系マーカーである E-cadherin の発現は減少し、間葉系マーカーである N-cadherin が増加する。今回は定量 PCR や western-blotting を用いてこれらの EMT マーカーの評価を行ったところ、SAEC-EGFR、SAEC-KRAS、SAEC-Arl4c、SAEC-KRAS/Arl4c では、コントロール細胞と比較して E-cadherin が発現減少し N-cadherin の発現が増加した。ここでも KRAS 変異遺伝子および Arl4c 遺伝子単独導入した細胞と比較して、これらの遺伝子を共発現させた細胞では E-cadherin や N-cadherin の変化は顕著に認める結果であった。細胞増殖や EMT に関与する各種のシグナル伝達経路の活性化について検討した。EGFR や KRAS の下流の細胞内シグナル伝達系(MAPK,PI3K-Akt など)について、western-blotting で評価したところ、コントロール細胞と比較して、SAEC-EGFR、SAEC-KRAS、SAEC-Arl4c、SAEC-KRAS/Arl4c では、ERK のリン酸化が亢進していることが分かった。しかしながら、これらの中でのリン酸化亢進の程度に差は認めなかった。さらに、ERK の上流にある MEK のシグナルを阻害剤(MEK 阻害剤)で処理して遮断すると、SAEC-EGFR、SAEC-KRAS、SAEC-Arl4c、SAEC-KRAS/Arl4c で N-cadherin の発現が低下した。以上から、上記で述べた各種遺伝子導入後の細胞では、導入した遺伝子によりリン酸化 ERK が亢進して、そのことが細胞増殖能を増加させ、さらに EMT 様変化に関わることが示された。さらに、ヒト正常気道細胞の増殖能亢進や EMT 変化に、肺癌のドライバー遺伝子として知られている EGFR 変異や KRAS 変異だけでなく、新規肺癌関連遺伝子として今回われわれが注目した Arl4c においても認められたことはこれまでに報告がない。一方で、この Arl4c と KRAS 変異との共発現における相乗効果についてのシグナル変化などの詳細なメカニズムについては、今回の実験系では示すことができなかった。これについては今後の課題であると考えている。

4-3: 4-1 や 4-2 で示したとおり増殖能亢進や EMT 変化を認めた細胞を用いて、生体内での造腫瘍能を評価するため、免疫不全マウスの皮下にこれらの細胞を接種し腫瘍を形成するかを観察した。この実験では、増殖能亢進や EMT 変化が大きく認められた SAEC-KRAS/Arl4c を用いて行った。この細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に 2×10^6 個懸濁し皮下に接種した。これはマウスへの皮下接種実験で一般的に用いられる細胞懸濁の方法であるが、この方法では接種後 8 週間まで観察したが腫瘍の形成は認めなかった。さらに、Matrigel®で細胞を懸濁することや、接種する細胞数を 1×10^7 個まで増やすなどの条件で同様の実験を行ったが、腫瘍形成は認めなかった。以上より今回の実験系では、ヒト正常気道細胞に KRAS 変異と Arl4c を共発現させても、生体内での造腫瘍能は認めなかった。

4-4: 4-2 での結果から、Arl4c が肺癌発生の初期の段階で、特に前癌病変である AAH へ関与している可能性が考えられたので、それを臨床検体において検証した。肺切除標本を用いて免疫染色を行った。2010 年～2018 年に当科で手術を施行した肺切除症例の中から AAH を含む 28 例を抽出して Arl4c 抗体を用いて免疫染色を施行した。Arl4c の染色は、AAH 病変部の細胞質に染色される一方で正常部の肺胞上皮には染色されなかった。その陽性率は 79%と高率であり、Arl4c は AAH の段階で特異的に発現する可能性が示唆された。一方、Arl4c 陽性群と陰性群の間で、年齢、性別、多発病変の有無、AAH と肺癌の混在の有無の項目で臨床病理学的背景の違いを解析したが統計学的に有意な差を認める項目はなかった。

以上より、肺腺癌発生過程である AAH の病態には、既知の遺伝子変異に加え Arl4c が重要な役割を果たす可能性があると考えられた。

【参考文献】

1) Sasai K, Sukezane T, Yanagita E, Nakagawa H, Hotta A, Itoh T, Akagi T. Oncogene-mediated human lung epithelial cell transformation produces adenocarcinoma phenotypes in vivo. *Cancer Res.* 2011 Apr 1;71(7):2541-9

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 木村賢二、神崎隆、狩野孝、大瀬尚子、舟木壮一郎、南正人、新谷康 肺癌における Arl4c の機能解析 第 71 回日本胸部外科学会定期学術集会 2018 年 10 月 5 日 東京

(2) Kenji Kimura, Shinji Matsumoto, Yasushi Shintani, Akira Kikuchi. Analysis of Arl4c during the carcinogenesis of lung adenocarcinoma. 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 29 日 大阪

〔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。