

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09132

研究課題名（和文）大腸癌肺転移における肺サーファクタント蛋白d

研究課題名（英文）The impact of surfactant protein d on pulmonary metastasis of colorectal cancer

研究代表者

鶴田 雅士（TSURUTA, Masashi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師（非常勤）

研究者番号：00348666

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、大腸癌肺転移における肺内サーファクタント蛋白d（SP-D）の役割を明らかにした。まず、大腸癌培養細胞は、SP-Dがあると、その増殖が抑えられることを明らかにした。次に、SP-Dのないノックマウスでは、通常のマウスと比較して肺転移が起こりやすいことも明らかにした。また、新しく肺転移が起こりやすい細胞を作ると、SP-Dが存在していても、増殖の抑制が起こりにくいことを明らかとなった。つまり、肺にあるSP-Dは大腸癌肺転移を抑えるのに重要な働きをしており、これを用いた新規の治療法が開発されれば、大腸癌肺転移に有効であることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌は比較的治療成績が良好であるが、遠隔転移を有するような進行癌においてはやはり良好とは言えず、遠隔転移の予防、治療は治療成績向上につながる。大腸癌の好発転移部位は肺や肝臓だが、その特異的な転移形成のメカニズムは明らかではない。本研究では大腸癌肺転移形成に肺内環境、特に肺のみに多く存在し、その免疫や構造維持に関与するSP-Dが重要であることを初めて明らかにした。すなわち、肺内のSP-Dは大腸癌肺転移の抑制に重要な働きをしており、この低下が肺転移形成の増悪に寄与している可能性が示唆される。今後このSP-Dをターゲットした様々な治療法が開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to clarify the impact of pulmonary surfactant protein d (SP-D). First, we demonstrated that the proliferation of cultured colon cancer cells was suppressed with SP-D. Second, SP-D knockout mouse, which does not have SP-D in the lung, showed to bear more pulmonary metastases compared to normal mouse. Third, novel cultured colon cancer cells, which likely showed pulmonary metastases, were higher resistant against SP-D compared to original ones. Collectively, SP-D could be possibly suppress pulmonary metastasis of colon cancer, and a novel treatment relating with SP-D is expected.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌肺転移 肺内サーファクタント蛋白d

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は日本人の悪性腫瘍の罹患率、死亡率の上位を未だ占めており、種々の化学療法の開発が進むものの切除不能進行再発大腸癌の予後は依然として不良である。肝転移と同様に肺転移も重要な予後規定因子であり、その転移のメカニズムを理解することは、将来的に肺転移の予防や治療につながりひいては予後改善にも貢献することが期待できると考えられる。

Surfactant protein-D (SP-D) は、肺胞型上皮細胞で産生されるC型レクチンのコレクチンサブグループに属する分子量43kDaのコラーゲン様構造を持つ糖蛋白であり、肺の恒常性を保つだけでなく、LPSなどの細菌に対する一次免疫応答に関与している。最近では、SP-DはEGFシグナリングの抑制を介して肺腺癌細胞の浸潤、転移能を抑制することが明らかとされた(Hasegawa Y et al, Oncogene 2015)。さらに臨床研究でもその関連性が報告された(Umeda Y et al, Oncogene 2017)。そこで、われわれは、自施設での臨床データの検証により、喫煙が大腸癌の肺転移の強いリスク因子であることが明らかとなったことから(Yahagi M, Tsuruta M et al, Colorectal Dis 2017)、SP-Dが原発肺癌だけではなく、大腸癌肺転移においてもその発生および増悪に何らかの影響を与えているという仮説を立てた。すなわち、**肺内のSP-DがEGFRシグナルを抑制し、大腸癌肺転移の形成や増悪を促進するという仮説**であり、これを明らかにすることは、大腸癌肺転移に対する新たな治療法の確立につながると期待できる。

2. 研究の目的

本研究は端的には「肺転移はなぜ起こるのか？」あるいは「ほかの臓器、例えば肝臓への転移や腹膜播種との違いは何か」といった学術的な問いを明らかにすることを目的としている。そもそも転移は癌そのものの性質に加え、「場」の影響が大きい。つまり臓器特異的な転移のメカニズムを理解するうえでは、転移臓器の「場」の癌免疫を理解することは非常に重要と考えられる。腸も肺もどちらも外界に直接接する臓器であることから同様の免疫機構がみられることが明らかとなりつつあり、その相同性および連動性が腸肺軸という概念が近年注目されている。しかし、肝臓や腹膜播種などは消化器分野に属するものの、肺は呼吸器の領域であり、肺と腸どちらの分野も専門とする研究者はほとんどいないために、研究が進んでいないという現状である。われわれは、大腸癌の基礎研究を専門としているが、以前より、カナダはバンクーバーにあるUniversity of British ColumbiaのSin教授が主宰する呼吸器の研究室との交流が強く、その影響からこの腸肺軸に着目していた。つまり、大腸癌肺転移形成には、「場」である肺の特性を理解し、かつその背景にあると推測される腸肺軸を明らかにすることを根幹としている。本研究の目的は、肺内の免疫応答において重要なSP-Dが、肺癌発生に関与している可能性に着眼し、大腸癌の肺転移形成および増悪に肺内のSP-Dがどのような役割を担っているかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) **大腸癌細胞に対するSP-Dの抑制作用を明らかにする**。報告された肺腺癌細胞株を用いた研究と同様の実験を大腸癌細胞株を用いて行う。具体的には教室が保有する大腸癌細胞株HCT116とCMT93(マウスの大腸癌細胞株)のEGFRの発現をPCRおよびウェスタンブロット法により確認する。この細胞を用いてSP-D投与による転移、増殖能の変化をscratch assayあるいはinvasion assayを用いて評価する。

(2) **肺転移モデルマウスを用いた肺転移形成におけるSP-Dの影響について検証する**。マウスの大腸癌細胞株であるCMT93をSP-Dノックアウトマウスの尾静脈より注入し肺転移を形成させ、

その程度をコントロールマウス (C57BL/6) と比較する。

(3) 肺転移を起こしやすい細胞は、肺内の環境すなわち SP-D 高濃度存在下においても、細胞増殖や転移、浸潤能が高いことを証明する。まずは、肺転移を起こしやすい肺転移細胞の樹立を行う。具体的には、マウス大腸癌細胞株である CMT93 を野生型の C57BL/6 マウスに尾静脈に注入し、肺転移を作り、その肺転移巣より癌細胞を single separation し、継代を繰り返して細胞株の樹立を行う。この好肺転移細胞と通常の細胞の増殖および転移能を SP-D 暴露下に比較し、好肺転移細胞が SP-D が高濃度に存在する肺においても細胞増殖や転移、浸潤が親株である CMT93 に比べて抑制されないことを確認する。

4. 研究成果

(1) SP-D は大腸癌細胞の増殖浸潤を抑制する

Scratch assay の結果、SP-D 蛋白はマウス大腸癌細胞 CMT-93 の増殖能を抑制することが明らかとなった (図 1)。また、同様に、細胞増殖能も抑制することが明らかとなった (図 2)。また、ヒト大腸癌細胞株である HCT116 でも同様の効果が認められることも確認された。

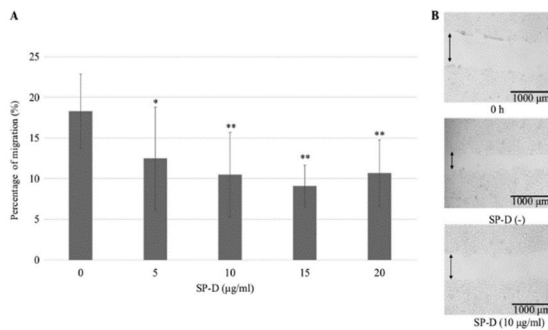


図 1 CMT-93 の増殖能と SP-D

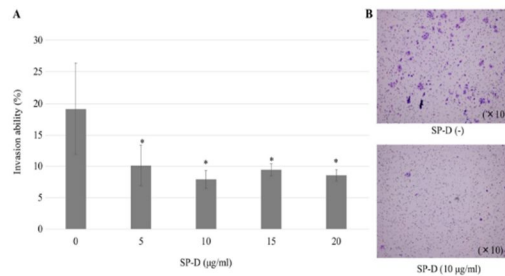


図 2 CMT-93 の浸潤能と SP-D

(2) 肺転移モデルマウスを用いた肺転移形成の検証でも SP-D は肺転移抑制に働く。

大腸癌細胞をマウス尾静脈に注入する肺転移モデルマウスを用いて、SP-D ノックアウトマウスにおける肺転移形成能を小動物用のマイクロ CT および病理学的に評価した。結果 (表 1) どちらの方法でも有意差をもって、SP-D ノックアウトマウスのほうが、コントロールマウスと比べて肺転移を起こしたマウスの数が少ないことが明らかとなり、仮説の通り、肺内の SP-D が大腸癌肺転移抑制に働いていることに矛盾しない結果であった。

表 1 SP-D ノックアウトマウスと野生マウスの尾静注肺転移の比較

Method	SP-D KO mice, n=24 (%)	C57BL/6 mice, n=23 (%)	P-value
CT scan	11 (45.8)	4 (17.4)	0.037
Pathological examination	15 (62.5)	5 (21.7)	0.005

(3) 肺転移を起こしやすい細胞 (CMT-93) は、肺内の環境すなわち SP-D 高濃度存在下におい

でも、細胞増殖や転移、浸潤能が高い可能性がある。

CMT-93 を尾静脈に注入して形成された肺転移巣から Single separation 法により、好肺転移大腸癌細胞株 CMT-93PM(1), (2) を樹立した。これらの細胞と親株の増殖能を Scratch assay により比較検討した(図3) 結果、親株に比較して新しく樹立した好肺転移細胞株である CMT-93PM(1), (2) はいずれも高い増殖能を有することが明らかとなった。

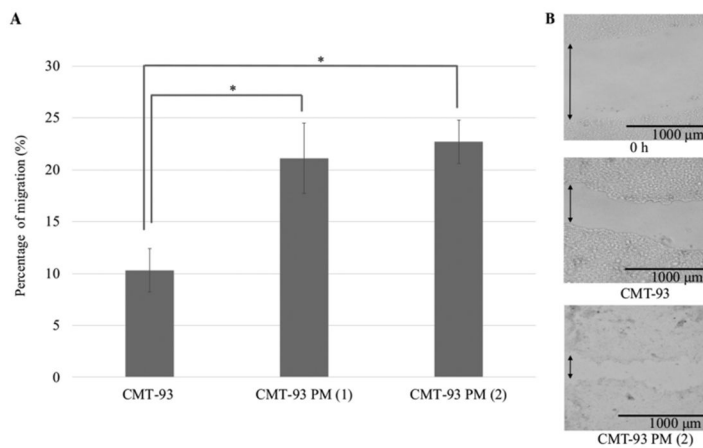


図3 Scratch assay による CMT-93 と CMT-93 の増殖能の比較

さらに SP-D に対する抵抗性を確認するために、SP-D 暴露下での invasion assay を行った(図4)。結果、CMT-93 は SP-D の暴露により浸潤能は抑制されるのに対して、新たに樹立した好肺転移細胞株である CMT-93PM(1) では、抑制されるものその程度は軽度であり、さらに CMT-93PM(2) はむしろ SP-D 存在下で浸潤能が増悪するという結果であった。これらより、肺転移には SP-D に対する耐性が必要であることが示唆された。により比較検討した。

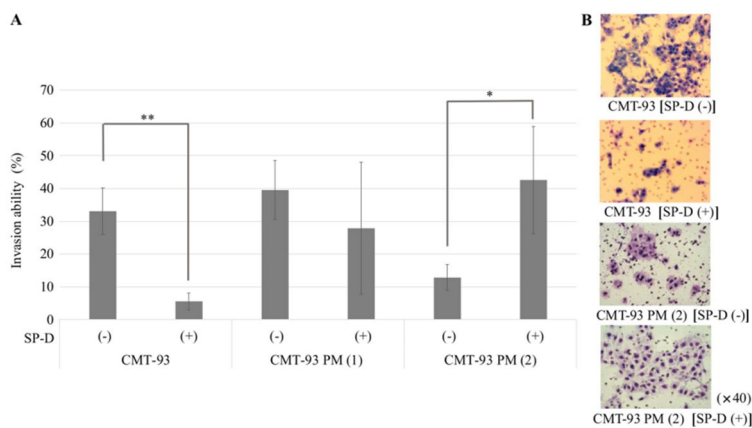


図4 Invasion assay による CMT-93 と CMT-93 の SP-D 暴露による浸潤能の変化の比較

(4) まとめと今後の展望

当初の予定の計画の多くが実施され、ほぼ仮説通りの結果が得られている。これらの結果から導き出せるのは、やはり大腸癌肺転移の形成に対して、肺内の免疫応答に重要な SP-D が抑制的な影響を与えているという可能性である。実際、喫煙者は、肺内の SP-D が漏出低下しており、肺転移のリスクが高いことも矛盾しない。今後、この SP-D を key とした大腸癌肺転移に対する予防や治療方法の開発に向けてさらに研究を進めていくことを考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tajima Yuki, Tsuruta Masashi, Hasegawa Hirotooshi, Okabayashi Koji, Ishida Takashi, Yahagi Masashi, Makino Akitsugu, Koishikawa Kaoru?, Akimoto Shingo, Sin Don, Kitagawa Yuko	4. 巻 20
2. 論文標題 Association of surfactant protein D with pulmonary metastases from colon cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.12185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------