

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09284

研究課題名(和文) 癌細胞株と3次元in vitroモデルを応用した浸潤における候補遺伝子の解明

研究課題名(英文) Investigation of the potential candidate gene in cancer cell invasion using cancer cell lines and 3-D in vitro model

研究代表者

土井 健史(Doi, Takefumi)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70814490

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)：癌の浸潤は癌が周囲組織へ進展する時や遠隔転移する時に非常に重要な機構であり、癌が生命に関わる大きな要因の一つとなる。我々は先行研究で癌の浸潤能を評価する手法として2層化コラーゲンゲル半球法を開発し、これを癌細胞株に適用して細胞株を浸潤能の有無で分類することができた。肺腺癌細胞株・悪性胸膜中皮腫細胞株を用いて浸潤能の高い細胞株を選別した上で発現が亢進している遺伝子を検索したところ、BEX1が著明に発現亢進していることが判明し、BEX1の抑制により癌細胞の浸潤能と細胞増殖能が抑制されることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌が浸潤・転移する際には多段階のプロセスを経ることが知られており、我々が開発した浸潤能評価のための2層化コラーゲンゲル半球法は、特に癌が周囲組織・間質へ浸潤する様子を観察・評価するのに優れていた。今回用いた肺腺癌・悪性胸膜中皮腫細胞株が周囲組織に浸潤する際、外に向かって樹状突起を伸ばして浸潤する様子が見られ、BEX1を抑制することで樹状突起が形成されず浸潤ができなくなることが観察できた。この結果、BEX1は癌が樹状突起を伸ばして周囲に浸潤するのに深く関与し、浸潤のメカニズムに関わる有用な遺伝子であると考えられる。BEX1の働きを抑制する薬剤の開発は新たな分子標的薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Invasion has a significant role in cancer progression and metastasis.

Previously, we assessed the invasive ability of cancer cells using an easy to prepare double layered collagen gel hemisphere (DL-CGH) method by which cancer cell invasion can be easily visualized. The present study examined multiple lung adenocarcinoma and malignant pleural mesothelioma (MPM) cell lines using the DL-CGH method and identified inherently invasive cell lines. Next, by comparing gene expression between invasive and noninvasive cells by cDNA microarray, the potential candidate gene brain-expressed x-linked protein 1 (Bex1) was identified to be involved in cancer invasion, as it was highly expressed in the invasive cell lines. Downregulation of Bex1 suppressed the invasion and proliferation of the invasive tumor cell lines. The findings of the present study suggested that Bex1 may promote metastasis in vivo and could be a potential oncogene and molecular therapeutic target in lung adenocarcinoma and MPM.

研究分野：呼吸器外科学分野

キーワード：BEX1 肺腺癌 悪性胸膜中皮腫 浸潤能 細胞増殖能 DL-CGH

### 1. 研究開始当初の背景

原発性肺癌は発見時にすでにリンパ節転移や他臓器への遠隔転移を伴っていることが多く予後不良な癌である。悪性胸膜中皮腫(malignant pleural mesothelioma;MPM)は浸潤傾向が非常に強いので局所進行が早く、極めて予後不良な癌と言える。

肺癌や MPM に限らず、癌の浸潤・転移は癌が生命を脅かす原因として重要である。これまでも癌の浸潤・転移に関する研究は数多く行われており、それにはいくつもの段階を経る必要があるとわかっている。その段階とは、原発巣での増殖、周囲組織(間質)への浸潤、血管やリンパ管内への侵入と管内での移動、さまざまな臓器での定着、その転移先の臓器での血管やリンパ管からの脱出、転移巣での再増殖、という流れであり、この過程を経て癌の浸潤・転移が完成する。そして癌は転移先の臓器で無秩序に増殖することでその臓器の機能低下・喪失を引き起こすため、結果として命に関わることとなる。

上記のプロセスより、癌がほかの臓器へ転移するには周囲組織への浸潤という過程を経る必要がある。「浸潤」とは癌の周囲臓器への直接浸潤・遠隔転移に共通するメカニズムであり、浸潤機構の解明が癌の浸潤・転移を抑制するために必須であると考えられる。また、浸潤能の強さが癌の悪性を反映しており、浸潤の抑制が癌の進行を制御することに効果的な可能性がある。

我々は癌浸潤能を評価する手法として 3 次元 *in vitro* モデルの 2 層化コラーゲンゲル半球(double-layered collagen gel hemisphere;DL-CGH)法を開発し、先行研究にて MPM 細胞株の中に浸潤能を示すものと示さないものがあることが判明した(Takata M, et al. Cell commun adhes, 14:157-67, 2007)。

### 2. 研究の目的

肺癌・MPM と呼吸器外科領域の中でも重要な悪性疾患である。肺癌は他臓器の癌と比べて遠隔転移を起こしやすいが、遠隔転移を起こすには癌が基底膜を破って周囲組織・間質へ浸潤し、血管・リンパ管といった脈管へ侵入する必要がある。また、MPM は周囲組織への直接浸潤能が非常に強い。肺癌・MPM とともに、腫瘍の「浸潤」という過程が悪性を高める因子として共通して重要といえる。癌の遠隔転移や直接浸潤を防ぐには「浸潤」のメカニズムを解明する必要がある。そこで今回、我々は肺腺癌と MPM の細胞株を用いて独自に考案・開発した DL-CGH 法を応用し、複数の癌種での浸潤能・浸潤形式を比較検討することで、癌細胞の浸潤により深く関与している候補遺伝子を検索することを試みた。

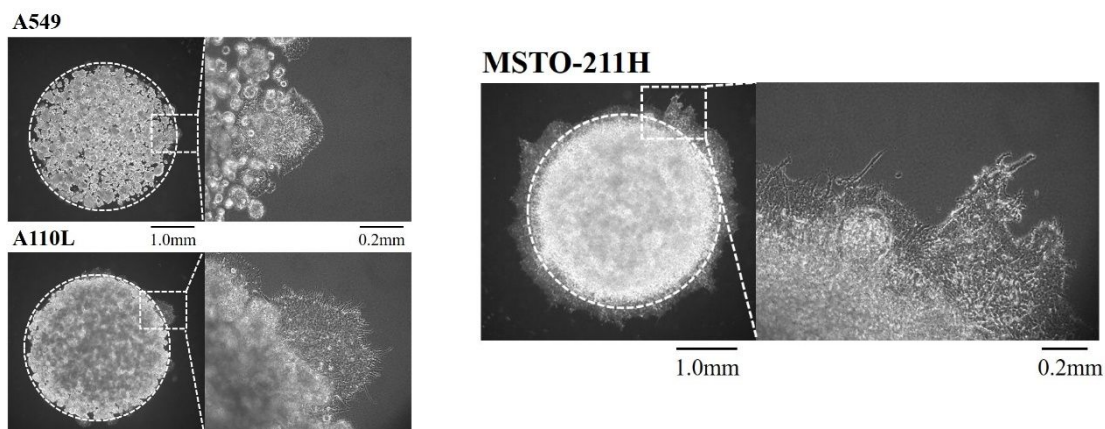
### 3. 研究の方法

肺腺癌・MPM の細胞株をそれぞれ複数用いて DL-CGH 法を行い、浸潤能の違いを比較検討した。浸潤能の有無で細胞株を分類・選別し、cDNA マイクロアレイ法にて浸潤能の有無による遺伝子発現の違いを網羅的に調べた。その中で浸潤能の高い細胞株で共通して発現亢進している遺伝子に標的を絞った。

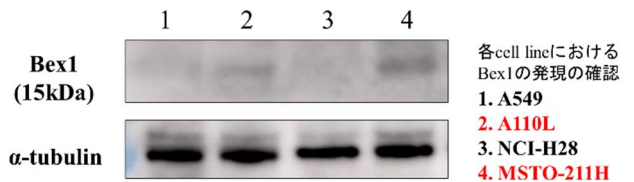
選別した遺伝子に対して、western blotting によりタンパク質発現の状態を確認した。その上で RNA 干渉法によりその遺伝子の発現を抑制して肺腺癌・MPM 細胞株の浸潤能や増殖能がどう変化するかを評価した。

### 4. 研究成果

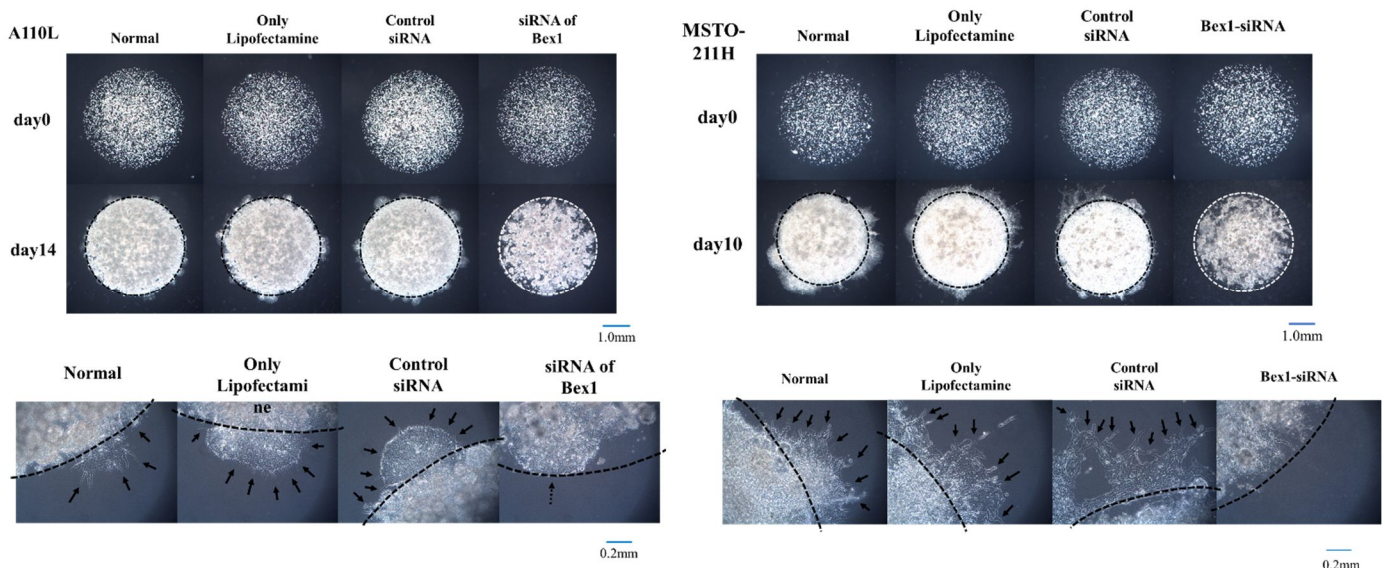
DL-CGH 法を用いた浸潤能の検討において、肺腺癌細胞株の A549・A110L、そして MPM 細胞株の NCI-H28・MSTO-211H がそれぞれ浸潤能のないもの・あるものとして選別できた。浸潤傾向を示す細胞株である A110L と MSTO-211H は下図のように、DL-CGH 法での強拡大の観察により樹状突起を伸ばして周囲へ浸潤する様子が確認できた。



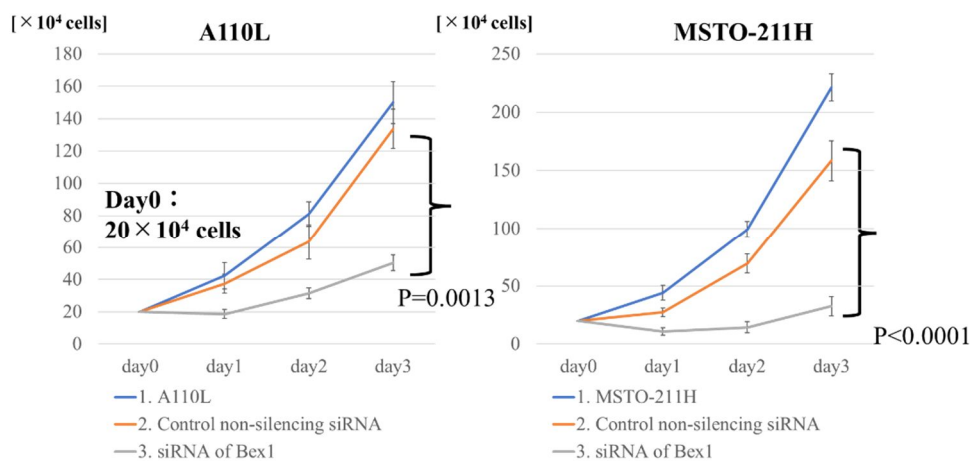
肺腺癌・MPM のそれぞれの細胞株間の遺伝子発現の違いを cDNA マイクロアレイ法により網羅的に調べ、A110L・MSTO-211H に共通して発現が特に強く亢進している遺伝子を絞り込んだ結果、Bex1 という遺伝子が選別できた。Bex1 について、上記で選別した細胞株において Western blotting によるタンパク質発現を確認したところ、浸潤能の高かった A110L と MSTO-211H にて発現が亢進している様子が確認できた。



選別した Bex1 について A110L・MSTO-211H に対して RNA 干渉法による Bex1 の発現抑制を行い DL-CGH 法による浸潤能の評価を行ったところ、外殻に樹状突起を伸ばして浸潤する細胞がほぼ見られなくなり浸潤能が抑制されたことが確認できた。



また、DL-CGH 法の内殻における細胞密度が減少している様子も観察できたため、Bex1 の抑制により細胞増殖が抑制されている可能性もあると考え、A110L と MSTO-211H について Bex1 の抑制下での細胞増殖能の評価も行ったところ、Bex1 の発現抑制により A110L・MSTO-211H ともに細胞増殖能も有意に低下することが示された。



DL-CGH 法を肺腺癌・MPM 細胞株に応用した検討を行い、浸潤能の高い細胞株で Bex1 の発現が亢進していることを突き止めた。今回の研究で DL-CGH 法により細胞株を浸潤能の有無により分類できることを示した上で、DL-CGH 法は細胞の浸潤の様子を観察できるだけでなく浸潤能の有無により細胞株をスクリーニングする技術としても有用であることが分かった。

Bex1 は brain expressed X-linked (Bex) ファミリーの中の 1 つで、主に神経発生に関与することが知られている。それ以外に p75 neurotrophin receptor を介して cell cycle の制御にも関わっている。過去の研究で乳癌や神経内分泌腫瘍で Bex1 の発現が亢進していることが報告されているが、原発性肺癌や MPM で Bex1 との関連性を報告した研究は見られない。

今回の研究結果から、肺腺癌・MPM 細胞株において浸潤能の高い細胞で Bex1 の発現が亢進し、Bex1 の発現抑制により樹状突起形成が抑制されることで周囲組織への浸潤能が低下し、さらに

細胞増殖能も抑制されることが示された。

これらの研究結果より、Bex1 は癌細胞の浸潤能のみならず増殖能に深く関与する重要な遺伝子であり、原発性肺癌や MPM における分子標的薬の候補となる可能性が示唆された。

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 Doi Takefumi, Ogawa Hiroyuki, Tanaka Yugo, Hayashi Yoshitake, Maniwa Yoshimasa	4. 巻 20
2. 論文標題 <em>Bex1</em> significantly contributes to the proliferation and invasiveness of malignant tumor cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.12226	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土井 健史
2. 発表標題 3次元 in vitroモデルを用いた癌浸潤能の評価で得られた候補遺伝子としてのBex1の可能性
3. 学会等名 第36回 日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	眞庭 謙昌 (Maniwa Yoshimasa) (50362778)	神戸大学・医学研究科・教授  (14501)	

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
---------	---------