

令和 4 年 9 月 3 日現在

機関番号：82307

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09300

研究課題名(和文) 肺癌における血行性転移機序の解明と新規アジュバント治療の開発

研究課題名(英文) Investigation of the hematogenous metastasis mechanism in human lung cancer and development of new adjuvant therapy.

研究代表者

伊部 崇史 (Ibe, Takashi)

独立行政法人国立病院機構高崎総合医療センター(臨床研究部)・臨床研究部・呼吸器外科 医長

研究者番号：80826264

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、我々が樹立した肺腺癌高転移株PC14HMを用いて、親株との比較解析により、Vimentin遺伝子(以下、VIM)を介した血行性転移の機序を解明することを目的としている。これまでに、VIMのノックダウン、強制発現させた細胞株を樹立しており、それらによる細胞レベル、マウスレベルでの検証実験を行った。また、次世代シーケンスを用いたCAGE法により網羅的に変動遺伝子の解析を行っており、これらの結果を詳細に解析する。最終的にはVIMの転写活性の原因となる遺伝子群を同定するとともに、CAGE解析により得られた知見に基づいて分子生物学的手法を用いて検証実験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

- 1) ヒト肺癌高転移細胞株と動物実験モデルを用いて、肺癌におけるVIMの血行性転移機序への関与を解明し、さらにVIMの受容体として作用している可能性があるinsulin growth factor 1 receptor (IGF1R)と、VIMとの関連を明らかにする。
- 2) 抗IGF1R治療により肺腺癌の血行性転移を制御できるかを検証し、肺癌術後に対する新規アジュバント療法の基礎を確立する。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the mechanism of hematogenous metastasis mediated by the Vimentin gene (VIM) by comparative analysis with the parent strain using the lung adenocarcinoma high metastasis strain PC14HM established by us. . . So far, we have established cell lines in which VIM was knocked down and forcibly expressed, and we conducted verification experiments using them at the cell level and mouse level. In addition, we are comprehensively analyzing variable genes by the CAGE method using next-generation sequencing, and we will analyze these results in detail. Finally, we identified the genes responsible for the transcriptional activity of VIM, and conducted verification experiments using molecular biological techniques based on the findings obtained by CAGE analysis.

研究分野：腫瘍学

キーワード：肺癌 転移 Vimentin 次世代シーケンス解析

1. 研究開始当初の背景

肺癌は予後不良な癌の一つとされるが、その進展のうち血行性転移は機序が解明されておらず、このため抑制する手立ても存在しない。我々は、高頻度に全身転移をきたすヒト肺腺癌細胞株を樹立し、これを用いて肺癌血行性転移の研究を進めてきた。

その結果、高頻度転移株の血行性転移には細胞骨格である vimentin (VIM) の発現が重要であり、これを抑制することで遊走能や浸潤能、さらには上皮間葉転換化や癌幹細胞化がコントロールできることを見出した。さらに、insulin growth factor 1 receptor (IGF1R) が、VIM の受容体として作用している可能性を見出した。

生体内で最も豊富に存在する細胞内構造蛋白でありながら、これまで VIM の詳細な細胞生理機能や病的過程での役割は未解明であった。しかし近年、アストロサイトやマクロファージから VIM が分泌されている、という報告がなされた。2013 年脊髄損傷したマウスの損傷部位に、VIM を分泌するアストロサイトが増加すると、軸索の伸展ならびに運動機能改善が促進することが報告された。さらに、アストロサイトから細胞外へ分泌された VIM が、神経細胞に作用して軸索を伸展させること、その際、IGF1R が VIM の受容体として機能していることが報告されている。

IGF1R は、これまでに癌の増殖や進展に関わることが分かっており、特に乳癌では強度に過剰発現し、細胞の生存を向上させる抗アポトーシス剤として機能する。多くの場合、IGF1R 過剰発現の抗アポトーシス作用によって、癌細胞が化学療法剤や放射線治療の細胞毒性に抵抗性を示す。最近では EMT 化や癌幹細胞化にも重要な役割を担っていることも報告されている。

今回我々が見出した、VIM が持つ血行性転移に関与する機能と、IGF1R の持つ機能がほぼ一致することと、さらに VIM が IGF1R のリガンドとして作用している可能性がある、という 2 つの事実は偶然の一致とは考えにくい。これら 2 つの事実が結び付けば、これまで肺癌を含めた固形癌に対して著明な効果を上げられずに、実臨床へ応用されなかった多くの抗 IGF1R 治療薬が、肺腺癌に対して VIM をバイオマーカーとして行う血行性転移抑制のための新規のアジュバント治療薬として再利用できる可能性があると考えている。

2. 研究の目的

本研究は、我々が樹立した肺腺癌高転移株 PC14HM を用いて、VIM を介した血行性転移の機序を解明することを目的とした。さらに、肺腺癌に抗 IGF1R 治療薬を用いて血行性転移を抑制する、新規のアジュバント療法を開発することをあわせて目的とした。

3. 研究の方法

ヒト肺腺癌高転移細胞株と動物実験モデルを用いて、肺癌における VIM の血行性転移機序への関与を解明し、さらに IGF1R と VIM との関連を明らかにする。

・ PC14HM と PC14 親株における VIM 発現量等を蛋白レベル (Western blot 法) で測定し、各能力 (遊走能、浸潤能、増殖能、EMT 化、幹細胞化) との関連を評価する。

Recombinant の VIM や IGF、抗 IGF1R 中和抗体を投与した際の各転移能の変化を比較解析

・ VIM をノックダウンした PC14HM、および VIM を強制発現させた PC14 親株をマウスに尾静脈投与し、VIM の発現により全身血行性転移がどのように変化するかを検証する。

・ VIM のノックダウン、強制発現による変動遺伝子発現を RNA シークエンスおよび CAGE 法で網羅的に解析 (薬効メカニズムの検証、解明) する。

4. 研究成果

我々は、これまでにヌードマウスを用いて樹立した血行性転移を高頻度にきたすヒト肺腺癌細胞株を用いた研究を進めている。細胞外小胞 (EV) の一つのサブグループであるエクソソームは、細胞間における遺伝情報に機能することが示されている。エクソソームはすべての種類の細胞から放出されるが、特に癌細胞においては、正常細胞よりも豊富に放出される。エクソソームに包含される物質は、起源となる細胞からのタンパク質と遺伝物質 (mRNA、DNA、miRNA) で構成されている。

本課題では、我々が持つ高転移細胞株と肺癌術後再発モデルを利用して、vimentin を介した血行性転移機序の解明と、肺癌術後血行性転移の抑制を目的とした new strategy adjuvant therapy の開発を目的として実験を行い、高転移細胞株の血行性転移には、vimentin の発現と

分泌の重要性を明らかにするべく研究を行った。ヒト肺がん血清に由来するエクソソームと、高転移性細胞と非転移性細胞の両者が、レシピエントのヒト気管支上皮細胞 (HBEC) に及ぼす影響を調べ、高転移性肺癌細胞および肺癌後期血清に由来するエクソソームが、HBEC においてピメンチン発現、および上皮間葉転換 (EMT) を誘導することを発見した。転移性の高い癌細胞および後期肺癌血清に由来するエクソソームは、非癌性のレシピエント細胞において遊走、浸潤および増殖を誘導する。我々の結果は、癌由来のエクソソームがレシピエント細胞における EMT の潜在的なメディエーターである可能性を示唆する結果である。

また、頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) において、癌関連線維芽細胞 (CAF) は上皮間葉転換、血管新生、および免疫抑制を促進し、腫瘍の進行を促すことが知られている。我々は、頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) における CAF の主要な調節因子を特定し、CAF における AKT アイソフォームの1つである AKT3 が CAF 微小環境の免疫抑制に関連することを明らかにした。HNSCC 標本から得られた CAF と正常線維芽細胞の NGS 解析により、免疫機能に関連する発現変動遺伝子 (DEG) を 13 個特定し、CAF の潜在的な調節因子として AKT3 を同定した。AKT3 陽性 CAF の腫瘍への浸潤は、免疫抑制性サイトカイン遺伝子の発現を抑制し、T 細胞抑制と腫瘍形成促進性マクロファージ誘導を阻害することを明らかにした。HNSCC 患者の予後不良と正の相関が認められることを明らかにした。これらの結果は、AKT3 が HNSCC の CAF 活性と免疫抑制微小環境を評価するための潜在的なバイオマーカーであり、CAF の腫瘍促進機能を阻害する治療標的であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yan F, Li J, Milosevic J, Petroni R, Liu S, Shi Z, Yuan S, Reynaga JM, Qi Y, Rico J, Yu S, Liu Y, Rokudai S, Palmisiano N, Meyer SE, Sung PJ, Wan L, Lan F, Garcia BA, Stanger BZ, Sykes DB, Blanco MA.	4. 巻 12(3)
2. 論文標題 KAT6A and ENL form an epigenetic transcriptional control module to drive critical leukemogenic gene-expression programs.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Discov.	6. 最初と最後の頁 792-811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2159-8290.CD-20-1459	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wang H, Li B, Asha K, Pangilinan R, Thuraisamy A, Chopra H, Rokudai S, Prives C, Yu Y, Zhu Y.	4. 巻 297(5)
2. 論文標題 The ion channel TRPM7 regulates zinc depletion-induced MDMX degradation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 101292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takahashi H, Rokudai S, Kawabata-Iwakawa R, Sakakura K, Oyama T, Nishiyama M, Chikamatsu K	4. 巻 112(6)
2. 論文標題 AKT3 is a key regulator of head and neck squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2325-2334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14911	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi H, Rokudai S, Kawabata-Iwakawa R, Sakakura K, Oyama T, Nishiyama M, Chikamatsu K	4. 巻 13(6)
2. 論文標題 AKT3 is a novel regulator of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 1233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13061233	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bilguun EO, Kaira K, Kawabata-Iwakawa R, Rokudai S, Shimizu K, Yokobori T, Oyama T, Shirabe K, Nishiyama M	4. 巻 20(1)
2. 論文標題 Distinctive roles of syntaxin binding protein 4 and its action target, TP63, in lung squamous cell carcinoma: A theranostic study for the precision medicine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer.	6. 最初と最後の頁 935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21203/rs.3.re-39783/V2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohtaki Y, Shimizu K, Kawabata-Iwakawa R, Gombodorj N, Altan B, Rokudai S, Yamane A, Kaira K, Yokobori T, Nagashima T, Obayashi K, Nakazawa S, Iijima M, Kosaka T, Yajima T, Mogi A, Kuwano H, Shirabe K, Nishiyama M	4. 巻 10(13)
2. 論文標題 Carbonic anhydrase 9 expression is associated with poor prognosis, tumor proliferation, and radiosensitivity of thymic carcinomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 1306-1319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26657	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 六代 範; 解良 恭一; 田中 大暉; 堀込 瑛介; 藤枝 みちる; 大高 行博; 飯嶋 岬; 熊倉 裕二; 清水 公裕; 小山 徹也; 田村 遵一; 調 憲
2. 発表標題 肺扁平上皮がんにおける新規バイオマーカーと分子治療標的
3. 学会等名 第57回 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 六代 範, 田中大暉, 杉本明生, 堀込瑛介, 藤枝みちる, 熊倉祐二, 清水公裕, 調憲, 西山正彦
2. 発表標題 肺扁平上皮がんにおける新規p63結合分子STXBP4による腫瘍悪性化とがん分子標的薬の探索
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 六代 範, 堀込瑛介, 田中大暉, 調憲, 桑野博行, 西山正彦
2. 発表標題 扁平上皮がんにおける新規p63結合分子STXBP4によるがん分子行的薬の探索
3. 学会等名 第23回 日本がん分子標的治療学会学術集会
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	清水 公裕 (Shimizu Kimihiro) (90375535)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	
研究分担者	河谷 菜津子 (Kawatani Natsuko) (80805557)	群馬大学・医学部附属病院・助教 (12301)	職名変更(2021年4月1日)
研究分担者	六代 範 (Rokudai Susumu) (20392334)	群馬大学・大学院医学系研究科・講師 (12301)	
研究分担者	矢島 俊樹 (Yajima Toshiki) (20346852)	群馬大学・大学院医学系研究科・准教授 (12301)	

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