

平成22年 5月 16日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890116
 研究課題名（和文） 肺修復及び肺癌発生に対するインターロイキン-6 ファミリーサイトカインの役割
 研究課題名（英文） The role of Interleukin-6 family cytokines in repair and tumorigenesis in the lung.
 研究代表者
 木田 博（KIDA HIROSHI）
 大阪大学・医学部附属病院・特任助教（常勤）
 研究者番号：80512988

研究成果の概要（和文）：肺上皮細胞特異的 Stat3 ノックアウトマウス（Stat3^{ΔΔ}）を用いてウレタン誘導肺腫瘍モデルを試したところ、Stat3^{ΔΔ}ではコントロールマウスと比べ、肺腫瘍成長が抑制された。肺腫瘍細胞 Stat3 は腫瘍成長に不可欠であることが示唆された。免疫組織化学的検討では腫瘍細胞の分化、増殖、腫瘍血管形成に差を認めなかった。一方気管支肺胞洗浄を用いた検討では、局所炎症は Stat3^{ΔΔ}で有意に増加しており、Stat3^{ΔΔ}では炎症促進作用を介した腫瘍抑制作用があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Urethane-induced tumorigenesis was suppressed in the lungs of airway epithelium-specific knockout mice of Stat3 (Stat3^{ΔΔ}) compared to control mice, suggesting that Stat3 in airway epithelium was required for the tumor growth in the lung. Immunohistochemistry did not show any significant differences in differentiation, proliferation or angiogenesis in the tumor. However, bronchoalveolar lavage (BAL) revealed that the local inflammation was significantly increased in the lung of Stat3^{ΔΔ} compared to control mice, suggesting the possibility that tumor suppression was mediated by the increased inflammation in the lung of Stat3^{ΔΔ}.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：呼吸器内科学

キーワード：幹細胞、肺癌、Stat3、ウレタン、ナフタレン、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌の約 50%で Stat3 は恒常的に活性化されている。恒常的活性化 Stat3 分子は線維芽細胞をトランスフォームさせるため、Oncogene として扱われる (Blomberg JF et al. Cell 98:295-303,1999) が、これまでに肺癌発生或いは維持における Stat3 の役割を *in vivo* で検討されたことはない。最近の報告では、EGFR 遺伝子変異陽性の肺癌細胞株において IL-6 オートクラインを介した Stat3 活性化機構が報告されている (Gao SP et al. J Clin Invest 117:3846-3856,2007)。

多くの癌と同様に肺癌もまた肺上皮幹細胞より発生する可能性を示唆する報告がある (Franklin WA et al. J Clin Invest 100:2133-2137,1997)。近年、肺腺癌の発生母体の可能性がある Bronchioalveolar Stem Cells (BASCs) と呼ばれる細胞が報告された (Kim CF et al. Cell 121:823-835, 2005)。同細胞における Stat3 の役割は不明である。

気道上皮傷害に引き続く修復は幹細胞の増殖、分化による構成細胞の補填が必要である。ナフタレン気道傷害モデルは BASCs 誘導を必要とする。肺上皮特異的 Stat3 (Stat3^{ΔA}) 及び Gp130 ノックアウトマウス (Gp130^{ΔA}) はナフタレン気道傷害後の修復遅滞を認めるため (Kida H et al. Am J Pathol, BASCs 機能に Gp130-Stat3 シグナルが重要である可能性を示唆している。

2. 研究の目的

肺上皮幹細胞及び肺癌における Gp130-Stat3 シグナルの役割を *in vivo* にて検討する。

3. 研究の方法

(1) ICR マウス(12 週齢)に対して 275mg/kg のナフタレンを腹腔内投与し、投与前、投与 3 日後、投与 2 週間後肺組織を取り出し、酵素処理により単細胞浮遊液を作成した。autoMACSTMProSeparator により CD31、CD45 陽性細胞を取り除いた気道上皮細胞浮遊液を作成し、さらに CD34、Sca-1 共陽性細胞 (BASCs) 数を FACS にて解析した。
(2) Stat3^{ΔA} 及び Control マウス(12 週齢)に対して 275mg/kg のナフタレンを腹腔内投与した。投与前、投与 3 日後肺組織を取りだし、同様の方法により BASCs 数を解析した。
(3) ICR マウス(12 週齢)より肺組織を取り出し、FACS Aria にて BASCs を sorting し、遺伝子発現を解析した。
(4) Stat3^{ΔA} 及び Control マウス(6 週齢)に対して 1mg/g のウレタンを腹腔内投与した。投与 4 カ月後、小動物用 *in vivo* CT システム Explore Locus を用い、肺を撮影、形成された腫瘍体積を定量化した。CT 撮影後、①肺

を 25cmH₂O で伸展固定し、形態学的及び免疫組織化学的検討を行った。②腫瘍組織を microdissect し、RNA を単離し、RNA 定量的解析を行った。③気管支肺泡洗浄 (BAL) を行い、炎症細胞数、細胞分画を定量した。④肺組織より蛋白抽出を行い、蛋白定量的解析を行った。

4. 研究成果

(1) ICR マウスにナフタレンを投与後、BASCs 数を測定した。同量のナフタレンは気道クララ細胞をほぼ全滅させること、その後の気道上皮再生には気道上皮幹細胞が関与すること、ナフタレン投与後気道上皮増殖のピークは投与 2~3 日目であることが知られている。投与 3 日目、BASCs 数は投与前に比べ有意に増加した。また投与 14 日目 BASCs 数は投与前レベルに戻っていた (図 1)。

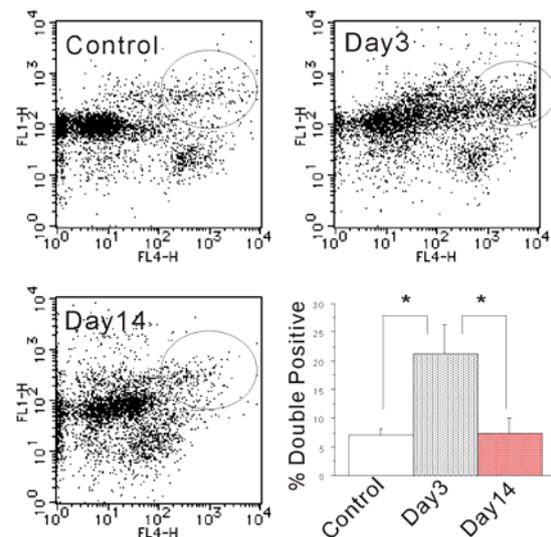


図 1

(2) 同じく 12 週齢の Stat3^{ΔA} 及び Control マウスにナフタレンを投与し、3 日目に上皮細胞中の BASCs の割合を FACSCanto にて解析した。Stat3^{ΔA} ではナフタレン気道傷害後の修復遅滞を認めることが知られている。ナフタレン投与 3 日目の Stat3^{ΔA} の共陽性細胞は上皮細胞中平均 27.6%、Control マウスの平均 46.7% と比べ有意に減少していた (n=4/group, p<0.05)。

(3) 12 週齢の ICR マウスより BASCs を FACS Aria により Sorting し、RNA を抽出した。Taqman PCR 法を用いて、幹細胞因子である Oct3/4、Sox2 の発現を検討したが、共陽性細胞とその他の気道上皮細胞との間で発現レベルに差は認めなかった。我々が測定した BASCs 分画は報告されているより遙かに多く、また分画を Sort し、RNA 定量化を

行った結果、我々が Sort した BASCs 分画は気道上皮幹細胞以外の細胞と他細胞の混成集団であると考えられ、現時点では BASCs 分画の増加を真の気道上皮幹細胞増加とするには時期尚早であると考えられた。

(4) Stat3^{ΔΔ}及び Control マウス(6 週齢)に対して 1mg/g のウレタンを腹腔内投与し、4 カ月後に肺を小動物用 CT にて観察した。Stat3^{ΔΔ}では Control マウスと比べ、ウレタン誘導肺腫瘍の形成が有意に抑制されていた (図 2)。

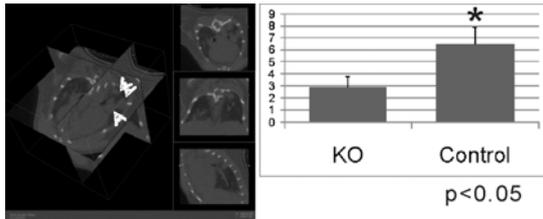


図 2

(5) CT 撮影後肺を伸展固定し、H&E 染色及びリン酸化 Stat3 に対する免疫染色を行った。H&E 染色では Stat3^{ΔΔ}では Control マウスと比べ腫瘍細胞の配列が疎な印象を受けるが定量的評価はできていない。リン酸化 Stat3 (p-Stat3) に対する免疫組織化学では、Control マウスの腫瘍組織では腫瘍細胞自身が p-Stat3 陽性であるが、Stat3^{ΔΔ}の腫瘍組織では腫瘍細胞自身は p-Stat3 陰性であり、腫瘍間質の血管内皮細胞や浸潤する炎症細胞が p-Stat3 陽性であった (図 3)。

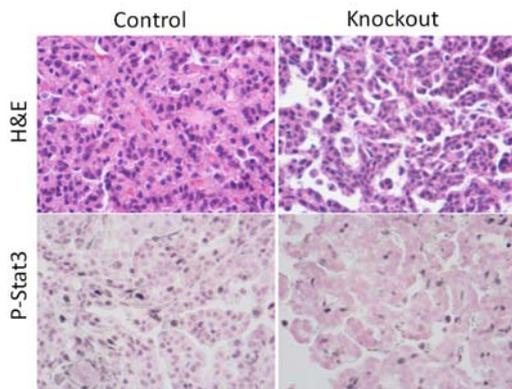


図 3

(6) 両マウスに発生する腫瘍の性状を比較するため、肺上皮細胞マーカーである Pro-Surfactant protein (SP)-C 及び Clara Cell Secretory Protein (CCSP)、腫瘍血管形成を比較するため Vascular Endothelium Growth Factor Receptor (VEGFR)-2、腫瘍細胞の増殖を比較するため Phospho-Histone (PH)-3 に対する免疫組織化学を施行したが、差を認めなかった (図 4)。

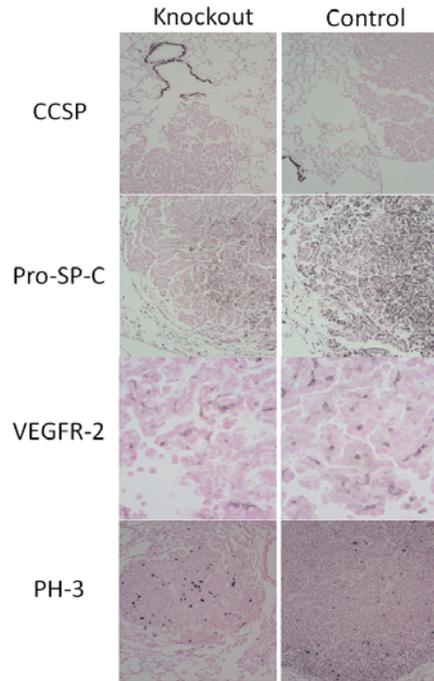


図 4

(7) 両マウスの肺局所の炎症を比較するため気管支肺胞洗浄を行った。回収された炎症細胞数を CT 撮影による腫瘍体積との関係でプロットすると、肺局所の炎症細胞数は腫瘍体積に比例して増加すること、炎症細胞数の増加は Stat3^{ΔΔ}において Control マウスと比較して顕著であることが示された (図 5)。

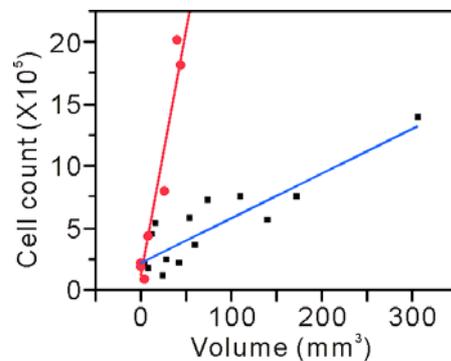


図 5

また両マウスの肺組織より抽出した蛋白質を使用して ELISA 法にて IFN- γ 及び TNF- α 産生を比較したところ、Stat3^{ΔΔ}にて産生が亢進していた (図 6)。

(8) 両マウスの肺組織に生じた腫瘍における遺伝子発現の差を検討するため、顕微鏡観察下に腫瘍を microdissect し、RNA を抽出、マイクロアレイを施行した。Control マウスの腫瘍組織と比較して、Stat3^{ΔΔ}の腫瘍組織では 345 個の遺伝子が発現上昇、384 個の遺伝子が発現低下を認めた。現在結果を詳細に

検討している。

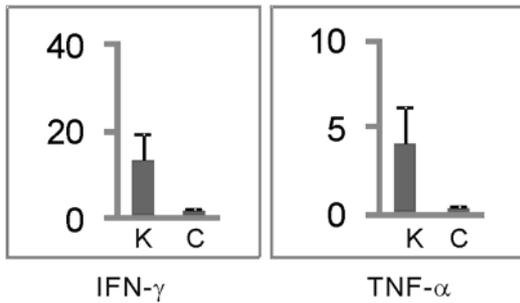


図6

以上より肺腫瘍細胞における Stat3 は腫瘍組織の成長に不可欠であることが示されたが、その機序は腫瘍細胞の分化、増殖、腫瘍血管形成等、従来より Stat3 と関わりが深いとされてきた現象とは異なるものであり、炎症を介した複雑なメカニズムが考えられ、現在も研究続行中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

木田博、吉田光宏、池上眞知子、Jeffrey A. Whitsett、気道上皮修復における GP130-STAT3 シグナルの役割、分子呼吸器病学、査読無、Vol.13、2009、p125-128

[学会発表] (計2件)

① 木田博、吉田光宏、川瀬一郎、Jeffrey A. Whitsett、気道上皮修復における GP130-STAT3 シグナルの役割、肺サーファクタント分子病態研究会、平成20年7月5日、札幌

② Kida H, Mucenski ML, Thitoff AR, LeCras TD, Ikegami M, Müller W, Whitsett JA, Gp130-Stat3 regulates epithelial cell migration and is required for repair of the bronchiolar epithelium. American Thoracic Society、平成20年5月18日、トロント

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木田 博 (KIDA HIROSHI)
大阪大学・医学部附属病院・その他
研究者番号：80512988

(2) 研究分担者

吉田 光宏 (YOSHIDA MITSUHIRO)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90359844