

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月28日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591568

研究課題名（和文） 肺癌進展における肺気腫の関与とその機序の解明

研究課題名（英文） Investigation about the mechanism that lung cancer growth is accelerated in emphysematous lungs

研究代表者

林 雅太郎 (HAYASHI MASATARO)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00554057

研究成果の概要（和文）：マウスにエラスターゼを投与し、肺気腫マウスを作製した。肺気腫マウスに Lewis (3LL) 肺癌細胞で転移性腫瘍を形成させた。肺気腫マウスでは2mm以上腫瘍結節数が多かった。肺気腫マウス肺ではlatentMMP-2が高値を示した。肺細胞を48時間培養した液で3LL細胞を培養した。肺気腫マウスの培養液で3LL細胞数が増加し、培養上清でactiveMMP-2とMT1-MMPが増加した。ヒト肺気腫合併肺癌組織は、非合併に比べ、PCNA、CD105、MMP-2が高発現していた。

研究成果の概要（英文）：A mouse model of pulmonary emphysema was induced by intratracheal nebulization of elastase. Intravenous administration of Lewis lung carcinoma (3LL) cells in the mice resulted in three-fold increase in metastatic foci with a diameter of no less than 2mm on the surface of the lungs. According to an in vitro study, proliferation of 3LL cells was promoted by incubation with the conditioned medium containing pneumocytes of the model mice for 48 hours. The latent form of MMP-2 was overexpressed in monocultures of the pneumocytes from the model mice. The active form of MMP-2 and MT1-MMP were synchronously increased in the conditioned medium with the incubation of 3LL cells. The PCNA proliferation index and MVD-CD105⁺ was higher in cancer tissue from patients with emphysema than in those from patients without. The MMP-2 expression intensity was also stronger in cancer cells and cancer stromal cells from patients with emphysema than in those from patients without.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、胸部外科学

キーワード：肺気腫、肺癌、癌細胞増殖、癌血管新生、MMP-2、MT1-MMP

1. 研究開始当初の背景

(1)我々のグループでは喫煙歴のあるI期非小細胞肺癌完全切除症例100例を検討し、肺気腫を合併した症例の術後死亡率・再発率は、肺気腫を合併しない症例のそれよりも有意に高いことを示した[Ueda K, et al. Clin Cancer Res 2006]。この結果から、我々は肺気腫が癌進展において有利な微小環境であると推測した。

(2)肺気腫は慢性閉塞性肺疾患(COPD)の原因の一つとされる肺の形態異常であり、肺胞隔壁の破壊による末梢気腔の異常拡大を特徴とする。組織内では肺胞マクロファージ、線維芽細胞でのmatrix metalloproteinase (MMP)-2の過剰発現が知られている。

(3)腫瘍進展に組織の細胞外基質分解は必須で、肺気腫が肺腫瘍進展に有利な環境になると考えた。MT1-MMP/MMP-2 axisは腫瘍浸潤や転移に関与するとされる。

2. 研究の目的

肺気腫の肺実質では、MMP-2が過剰発現しており、肺癌の浸潤・転移に有利な微小環境であると推測される。このようなMMP-2高発現の環境下では癌細胞-間質細胞相互作用が亢進し、癌進展が促進されるに違いない。我々は、「肺気腫を合併した肺癌では、癌細胞周囲にMMP-2が高発現し、癌細胞-間質細胞相互作用の亢進を介して癌進展に寄与する」という仮説に至った。

(1)動物モデルを用いて、肺気腫の合併が癌の増大・進展を促進することを検証する。さらにその分子機序を解明する。

(2)ヒト肺癌標本を用いて、肺癌組織の発現タンパクについて評価を行う。

3. 研究の方法

(1)動物モデルを用いた実験研究:

8週齢雄のC57BL/6マウスにエラストアーゼを経気管的に投与し、肺気腫モデルマウスを作製した。肺気腫マウスにLewis肺癌細胞を尾静脈から移植し、転移性腫瘍を形成させ、3週間後に肺を摘出した。次に肺気腫マウスの全肺ホモジナイズ液中のlatentMMP-2、activeMMP-2、MT1-MMPを測定した。次に肺気腫マウスの全肺細胞を48時間培養し、その培養液でLewis肺癌(3LL)細胞を培養した。

(2)ヒト肺癌標本を用いた臨床研究:

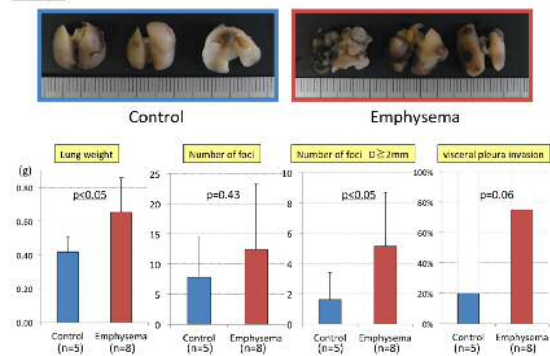
症例対象はリンパ節郭清を伴う肺葉切除を行った臨床病期I期の原発性非小細胞肺癌48例である。肺気腫の診断はCT濃度測定で行った。 -910 Hounsfield units (CT値)より小さな吸収値のvoxelの割合が肺全体の5%より高ければ、肺気腫とし、Emphysema群とNon-emphysema群に分類した。Emphysema群とNon-emphysema群で免疫組織化学染色による組織学的評価を行った。

4. 研究成果

(1)動物モデルを用いた実験研究:

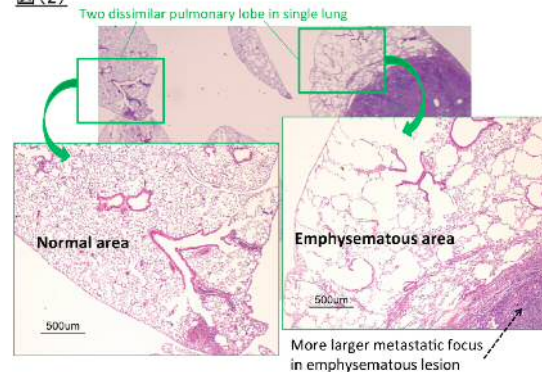
図(1)は移植3週後に摘出した肺である。肺気腫マウスでは肺重量、径2mm以上の肺表面の腫瘍結節数が有意に多かった。また肺気腫マウスでは、腫瘍結節の胸膜浸潤が多かった。

図(1)



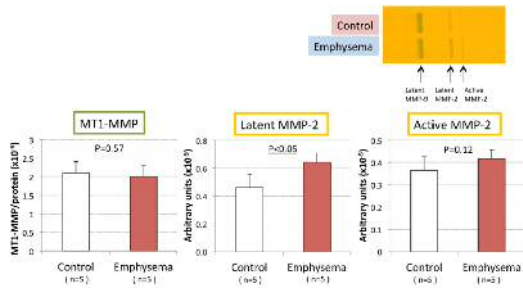
また肺気腫マウスの単一肺で、肺気腫を認めた肺葉は、そうでない肺葉に比べて大きな腫瘍結節が存在する傾向にあった[図(2)]。

図(2)



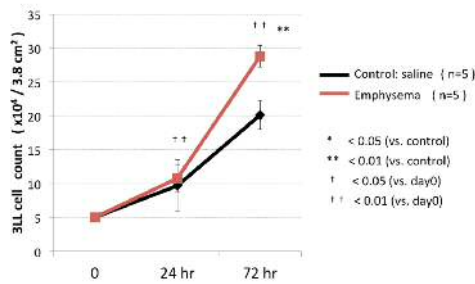
肺気腫肺でlatentMMP-2は有意に高値を示したが、activeMMP-2とMT1-MMPは有意差を認めなかった[図(3)]。

図(3)



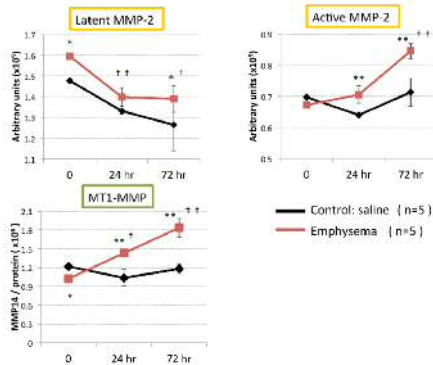
肺気腫肺の培養液では Lewis 肺癌細胞数が経時的に増加し、培養 72 時間後でコントロールより有意に多かった[図(4)]。

図(4)



肺気腫肺の培養上清は、LatentMMP-2 が有意に高値であった。Lewis 肺癌細胞を培養することで、activeMMP-2 と MT1-MMP はコントロールに比べ、有意に増加した[図(5)]。

図(5)



(2) ヒト肺癌標本を用いた臨床研究:

患者背景を示す[図(6)]。

Emphysema 群は Non-emphysema 群より男性が多く、%VC が高値であったが、その他の項目で差はなかった。

腫瘍細胞の増殖を評価した。腫瘍細胞の PCNA 陽性率は Emphysema 群で有意に高値であった[図(7)]。

腫瘍内の微小血管密度の評価を行った。CD105 陽性血管密度は Emphysema 群で有意に高かった[図(8)]。

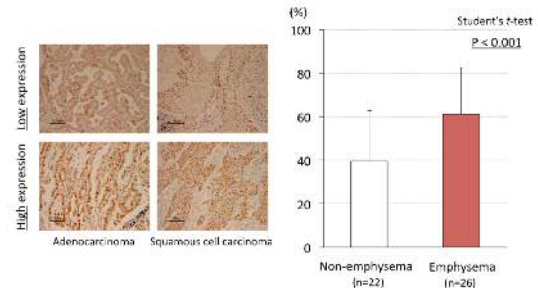
腫瘍細胞における MMP-2、MT1-MMP の発現について評価した。MMP-2、MT1-MMP の染色強度は 4 段階のスコアで評価した。Emphysema 群では Non-emphysema 群に比べて、MMP-2 の染色強度で Score1 が少なかった。Score2、3 の割合が多かった[図(9)]。

図(6)

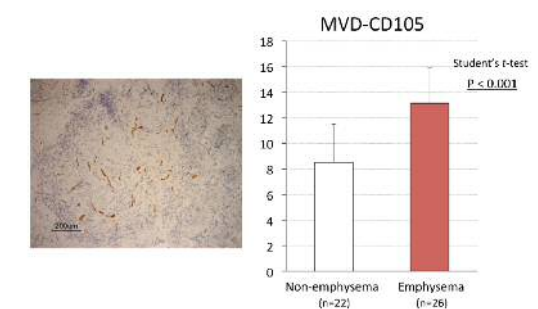
Variables	Non-emphysema (n=22)	Emphysema (n=26)	P-value
Age (y)	71.4 ± 8.5	71.7 ± 6.9	0.442
Gender (male/female)	17/5	25/1	0.049
Performance status (0/1/2/3)	16/5/1/0	21/4/0/1	0.481
Pack-year smoked	50 ± 28	52 ± 22	0.400
pO ₂ (mmHg)	80.6 ± 9.1	81.3 ± 9.9	0.413
VC (%)	93.0 ± 18.9	101.4 ± 15.0	0.047
FEV ₁ (%)	72.2 ± 15.5	67.8 ± 13.3	0.853
Tumor size (mm)	26.8 ± 11.3	26.8 ± 14.9	0.505
Resection (lobectomy/bilobectomy)	21/1	25/1	0.904
Histologic subtype (squamous cell carcinoma/adenocarcinoma)	7/15	8/15	0.938
Histologic grade (well/moderate/poor)	6/13/3	9/8/9	0.106

Value expressed as n or mean ± SD.

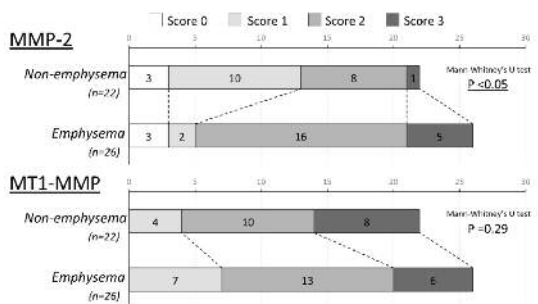
図(7)



図(8)



図(9)



以上から肺気腫に生じた肺腫瘍では腫瘍進展の促進に寄与する MT1-MMP/MMP-2 axis が刺激されるため、肺気腫環境下では肺腫瘍進展が促進されることが示唆された。

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)

[学会発表] (計 4 件)

①村上順一、林雅太郎、上田和弘、李桃生、濱野公一、肺気腫は肺腫瘍増大に好適な微小環境である：MT1-MMP/MMP-2 axis の関与、第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013. 4. 11～2013. 4. 13 福岡国際会議場 (福岡)

②Junichi Murakami, Kazuhiro Ueda, Arata Nishimoto, Masataro Hayashi, and Kimikazu Hamano, Pulmonary emphysema as a tumor-friendly microenvironment: Role of the MT1-MMP/MMP-2 axis, American Association for Cancer research (AACR) ANNUAL MEETING 2013 2013. 4. 6～2013. 4. 10 WashingtonD. C. (USA)

③村上順一、林雅太郎、上田和弘、濱野公一、肺気腫は肺腫瘍増大に好適な微小環境である：MT1-MMP/MMP-2 axis の関与、第 65 回日本胸部外科学会定期学術大会 2012. 10. 17～2012. 10. 20 福岡国際会議場 (福岡)

④村上順一、西本新、上田和弘、Tumor growth is accelerated in emphysematous lungs via the MT1-MMP/MMP-2 axis、第 71 回日本癌学会学術総会 2012. 9. 19～2012. 9. 21 ロイトン札幌 (札幌)

[その他]

ホームページ：山口大学大学院器官病態外科
<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~surg-1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 雅太郎 (HAYASHI MASATARO)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00554057

(2) 研究分担者

上田 和弘 (UEDA KAZUHIRO)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90420520