

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592060

研究課題名(和文) 癌宿主相互作用による肺癌の浸潤・転移におけるNECL5の役割の研究

研究課題名(英文) The role of Necl-5 in the invasive activity of lung adenocarcinoma

研究代表者

眞庭 謙昌 (MANIWA, YOSHIMASA)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50362778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：我々が独自に開発したDouble-layered collagen gel hemisphere(DL-CGH)法を用い、Necl-5の癌間質相互作用における役割について検討を行った。DL-CGHの内層にGFPで蛍光標識したA549とWI-38を共培養したものの、RNAi法でNecl-5を抑制したGFP-A549とWI-38を共培養したものを各々作成し、比較検討を行った。外層に浸潤するGFP-A549を観察したところ、Necl-5の発現を抑制した群では、外層に浸潤したGFP-A549の細胞数が有意に減少しており、浸潤能が抑制されることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used a bronchioloalveolar carcinoma (BAC) cell line and fibroblasts to assess the expression of Necl-5 in the development of cancer&#8211;stroma communication by using an easy-to-prepare double-layered collagen gel hemisphere (DL-CGH) system that enables visualization of cell migration during invasion. The expression of Necl-5 was higher in BAC cells than in fibroblasts. This tendency didn't change even when the BAC cells were mixed with fibroblasts. To assess the role of Necl-5 in the invasive activity of the BAC cells, we knocked down its expression using RNA interference (RNAi). The invasion assay with DL-CGH revealed that inhibition of Necl-5 expression in the BAC cells was associated with suppressed invasiveness. Necl-5 expression in lung cancer cells is crucial for their invasiveness in the cancer&#8211;stromal interaction, suggesting that Necl-5 could be a favorable molecular target for the suppression of invasiveness in lung adenocarcinoma.

研究分野：医歯薬学

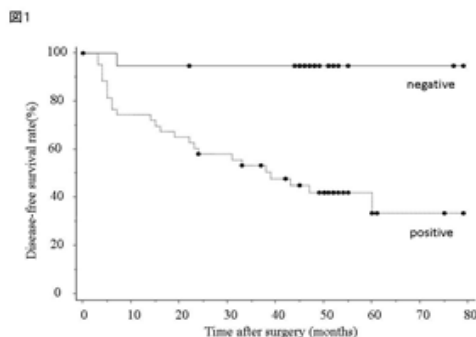
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：原発性肺癌 肺腺癌 細胞接着分子 Necl5 浸潤能 上皮間葉移行 分子標的 바이오マーカー

### 1. 研究開始当初の背景

Necl protein family は細胞間接着分子であり、線維芽細胞や上皮細胞において Cadherin とともに adherence junction を形成することが知られている。この Family の一つである Necl-5 は、細胞間接着の制御だけでなく、細胞運動や増殖にも機能する。最近の知見では、Necl-5 は、細胞同士の接触によって down-regulation され、細胞の運動と増殖が抑制されることが示された。一方、Necl-5 は癌細胞で発現が増加することが知られており、Necl-5 の機能異常が周辺の宿主細胞との接触障害を招き、浸潤、転移の一因となる可能性がある。我々はこれまで、肺腺癌切除検体を用いて Necl-5 の免疫組織化学的な検討を行い、Necl-5 が高発現しているものほど予後が不良であることを明らかにした。更にその発現は、早期癌といわれている adenocarcinoma in situ (AIS) 部位ではなく、癌浸潤部位 (invasive component) において特に亢進していた。肺腺癌においては、AIS が間質と相互作用することによって浸潤癌 (invasive adenocarcinoma) になるというモデルが考えられており、Necl-5 はこの癌間質相互作用に関わると考えられる。

我々は、外科切除された肺腺癌 63 症例における主病変部における Necl-5 の発現について、パラフィンブロックを用いた免疫組織化学染色で調べ、68% で強い発現を確認した。そして本蛋白質の発現はリンパ節転移の有無、病理病期、BAC 率と有意に相関し (それぞれ  $p=0.0398$ 、 $p=0.0070$ 、 $p=0.0423$ ) また、発現例では有意に予後不良であった。1 期症例の検討においても同様の結果がみられ、早期癌における術後補助療法の候補症例の選択に有用であることが示唆された (Nakai R et al., Cancer Science 101:1326-30, 2010)。これらの結果から、同蛋白質が原発性肺癌の臨床において重要な役割を持つことが明白となり、癌治療、とくに癌浸潤・転移コントロールにおける分子標的になり得ることが示された。



一方、我々が開発した 3D in vitro モデルは、細胞の動きをリアルタイムに観察でき、動画として連続的に変化を捉えられる。また画像処理により浸潤の定量的に評価を可

能にした。そして本法により、単独では遊走能を持たない癌細胞が線維芽細胞周囲をアメーバ様に盛んに運動することを見出した (Takata M, et al. Cell commun adhes, 14:157-67, 2007)。

これらの研究成果により、我々は、癌細胞と線維芽細胞の相互作用における Necl-5 の役割についての着想を得た。切除検体による検討において Necl-5 との相関が示された BAC 率は、癌細胞が宿主由来の線維芽細胞と混在する invasive component と肺胞構造が保たれた non-invasive な部分との比率を示す。我々の検討では invasive component で Necl-5 の発現が亢進していることが示され、同部での癌細胞と線維芽細胞の相互作用、特に in vitro モデルで認めた運動作用に Necl-5 が関与していることが想起された。

### 2. 研究の目的

癌浸潤および転移において、宿主組織由来の微小環境の変化が重要な役割を持つと考えられる。本研究では、このような環境下での原発性肺癌における癌・宿主由来細胞間相互作用のメカニズムを細胞接着因子 Necl-5 に着目して検討する。ノックアウトマウスを用いた癌浸潤モデルおよび三次元 (3D) in vitro モデルを用いて、癌浸潤・転移における Necl-5 の役割を明らかにし、新たな癌治療の分子標的として確立することを目的とする。

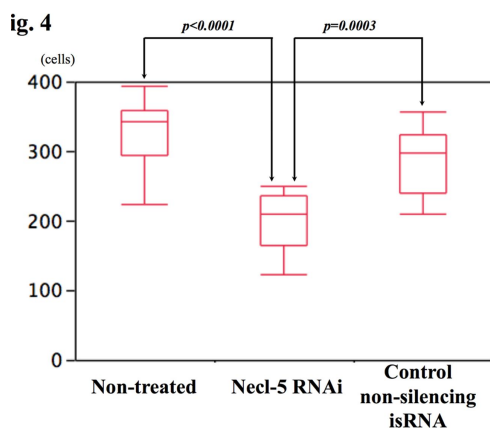
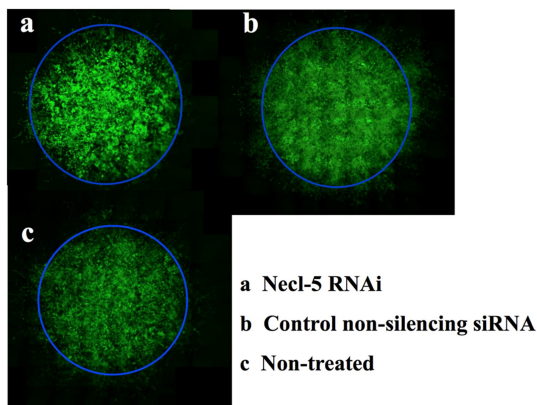
### 3. 研究の方法

我々が独自に開発した Double-layered collagen gel hemisphere (DL-CGH) 法を用いた。本法は、コラーゲンゲルでできた内層と、同じくコラーゲンでできた外層より成り、内層に対象となる細胞を容れ、倒立顕微鏡で経時的に観察することにより、内層から外層に向かって浸潤する細胞を視覚的に評価可能である。この内層にヒト肺腺癌細胞株である A549 を容れ単独培養しても、外層への浸潤はみられない。しかし、この A549 とヒト肺線維芽細胞である WI-38 とを共培養すると、まず外層に向かって WI-38 が浸潤し、単独では浸潤できない A549 が、WI-38 に沿ってアメーバ状に姿をかえつつ外層に侵入する様子が観察された。この現象は癌と間質の相互作用を見ているものと思われる。本法はこの作用を見る上で有用であると考えられる。今回、DL-CGH 法を用いて Necl-5 の癌間質相互作用における役割について検討を行った。

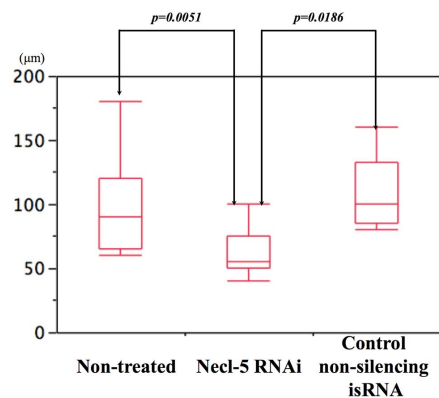
### 4. 研究成果

A549 単独、WI-38 単独、A549 と WI-38 を共培養した cell line について各々 Western blotting 法を行い、Necl-5 の発現を調べたところ、A549 単独の cell line で最も Necl-5 が発現していた。A549 と WI-38 を共培養したものでは、Necl-5 の発現亢進は見られなかつ

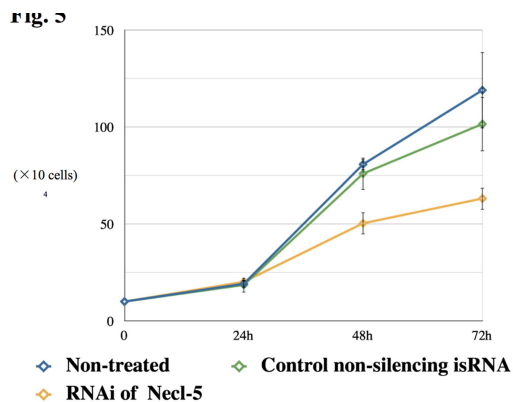
た。このことから、癌宿主相互作用に関わる Necl-5 は、癌細胞側でより発現が亢進していると考えられた。更に、Necl-5 の下流の蛋白である Focal adhesion kinase (FAK) についても Western blotting 法にて発現を調べたところ、Necl-5 と同様の結果を得た。次に DL-CGH 法を用いて、内層に GFP で蛍光標識した A549 と WI-38 を共培養したもの、RNAi 法で Necl-5 を抑制した GFP-A549 と WI-38 を共培養したものを各々作成し、比較検討を行った。外層に浸潤する GFP-A549 を観察したところ、Necl-5 の発現を抑制した群では、外層に浸潤した GFP-A549 の細胞数が有意に減少しており、浸潤能が抑制されることが示された。



この Necl-5 を抑制することによって浸潤能が低下する現象は、細胞遊走能の低下によるものか、増殖能の低下によるものかを明らかにするため、各々について更に検討を行った。WI-38 に沿って外層に移動する GFP-A549 を経時的に観察し、12 時間後の移動距離について比較したところ、Necl-5 を抑制した GFP-A549 では、抑制していない群に比べ、有意に移動距離が減少していた。



また、増殖能については、A549 の cell line において、24 時間、48 時間、72 時間後の細胞数をカウントすることとした。A549 の Necl-5 を RNAi 法で抑制した群では、抑制していない群に比べ、48 時間後、72 時間後の A549 の細胞数が有意に低下しており、増殖能が低下していることが示された。



以上の結果より、Necl-5 を抑制した A549 では、細胞遊走能、増殖能がともに抑制された結果、浸潤能が抑制されることが明らかとなった。

癌細胞における Necl-5 は、細胞の移動、増殖に関わることが示唆された。更に、DL-CGH 法において、癌細胞の Necl-5 を抑制することで、癌の浸潤能が抑制された。癌間質相互作用において Necl-5 は重要な役割を担っていると考えられ、Necl-5 は肺腺癌における molecular target になり得る。

## 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 5 件)

1. Tamura D, Arai T, Nagai T, Kaneda H, Aomatsu K, Fujita Y, Matsumoto K, De Velasco MA, Kato H, Hayashi H, Yoshida S, Kimura H, Maniwa Y, Nishio W, Sakai Y, Ohbayashi C, Kotani Y, Nishimura Y, Nishio K. Slug increases sensitivity to tubulin-binding agents via the downregulation of III and

- IVa-tubulin in lung cancer cells. Cancer Med. 2013, 2:144-54. 査読あり
2. Tane S, Maniwa Y, Hokka D, Tauchi S, Nishio W, Okita Y, Yoshimura M. The role of Necl-5 in the invasive activity of lung adenocarcinoma. Exp Mol Pathol. 2013 Apr;94(2):330-5. 査読あり
3. Tanaka Y, Ogawa H, Uchino K, Ohbayashi C, Maniwa Y, Nishio W, Nakao A, Yoshimura M. Immunohistochemical studies of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma: A possible association between staining patterns with neuroendocrine markers and tumor response to chemotherapy. J Thorac Cardiovasc Surg. 2013, 145: 839-846. 査読あり
4. Hokka D, Maniwa Y, Tane S, Nishio W, Yoshimura M, Okita Y, Ohbayashi C, Sakai Y, Chen X, Hayashi Y. Psf3 is a prognostic biomarker in lung adenocarcinoma. Lung Cancer 2013 79:77-82. 査読あり
5. Maniwa Y, Nishio W, Okita Y, Yoshimura M. Expression of Nectin 3: novel prognostic marker of lung adenocarcinoma. Thoracic Cancer 2012, 3: 175-181. 査読あり

〔学会発表〕(計 1件)

第113回日本外科学会定期学術集会 2013年  
4月11日(福岡)  
肺腺癌浸潤における Necl-5 の働きについて  
の検討  
田根慎也、真庭謙昌

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

真庭 謙昌 (MANIWA, Yoshimasa)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：50362778

### (2)研究分担者

林 祥剛 (HAYASHI, Yoshitake)  
神戸大学・大学院保健学研究科・教授  
研究者番号：50189669

### (3)連携研究者

該当なし