

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462176

研究課題名(和文) 肺癌症例における血中遊離癌細胞の転移形成能獲得メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanism of metastasis of circulating tumor cells in non small cell lung cancer

研究代表者

舟木 壮一郎 (Funaki, Soichiro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50464251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：原発性肺癌の手術症例に対して切除肺の肺静脈血の遊離癌細胞を癌細胞と正常血球細胞間において大きさに差があることに着目しフィルターを用いたサイズ選択的な検出法にて、循環癌細胞の存在並びにその形態にて術後再発率を含む臨床項目との相関を調べた。その結果、癌細胞が集塊を形成した(Cluster)症例において、形成していないものに比し有意に予後不良因子であることが判明した。これは循環癌細胞がその存在のみならずその形態も有効な術後再発予測因子であることが示唆された。また転移形成する上で、癌細胞がEMTを介し免疫細胞からの攻撃を回避する免疫抑制の性質を帯びる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Size-based detection method by using the filtration can detect rare circulating cancer cells (CTCs) in blood in non small lung cancer. by using this method, we can detect not only singular CTCs but also clustered CTCs, which is suggested to have high potential of distant metastasis and recurrences. The presence of clustered CTCs may be an useful prognostic indicator in surgically resected non small cell lung cancer. While, to reveal the mechanism of metastasis, we focused epithelial mesenchymal transition (EMT) which is also known to have a key process in cancer progression, and the cancer immunology, the programmed cell death 1/programmed cell death 1-ligand 1 (PD-1/PD-L1) pathway which plays a major role. Our results showed that PD-L1 expression is regulated by EMT status and plays an important role in cancer progression.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 遊離癌細胞 転移

1. 研究開始当初の背景

肺癌発生率の向上に伴い、日本を含む先進各国で死因の上位となっている。そして肺癌治療成績の向上は国民衛生・厚生において最も重要な課題である。肺癌でも最も多い非小細胞肺癌は完全切除しても半数近くが再発する。しかも遠隔転移が術後再発の発症形式の約70%を占め、それらを予測することは治療方針決定において極めて重要な指標となりうる。しかし、この転移形成のメカニズムは未だ不明な点が多い。第一段階として原発巣からの癌細胞の遊離が必要と考えられる。これらが、血中内を生存、循環癌細胞(CTCs; Circulating tumor cells)として全身を循環している間に、他臓器に生着し転移巣が形成されると考えられるが、循環中には物理的ストレス、免疫細胞からの攻撃など、多くの攻撃因子があるにも関わらず、それらを回避し転移形成する詳細なメカニズムは不明である。また癌細胞の転移能獲得のトリガーが、遺伝子の mutation (genetic) によるものなのか、遺伝子の配列異常ではない(epigenetics)変化なのかは不明である。この観点からも分析する必要がある。そして、転移予定臓器への浸入、増殖にて、転移が完成される。臨床現場では再発転移は専ら画像で診断されることが多く、転移巣のサンプル採取はなされることが少なく、詳細な分析は困難である。よって、転移のメインプレイヤーである循環癌細胞を検出、濃縮し、その分子生物学的解析ができれば、転移再発の克服に大きな第一歩になると思われる。そこで今回我々は循環癌細胞とその転移形成をサポートする種々の細胞またはサイトカインに着目し転移メカニズムの一端を genetic と epigenetics の両面から解明する予定である。様々な循環癌細胞の検出法について最近報告がなされている。従来までは、癌細胞特異抗原を標的とする Positive selection 法が一般的であったが、heterogeneous な癌細胞の集団においては全ての癌細胞を捕えているか不明であった。そこで、我々は、循環癌細胞の起源となりうる肺静脈から静脈血を採取し、リンパ球表面抗原の CD45 抗体と比重遠心分離法を用いリンパ球、血球系を除去する Negative selection 法にて、癌細胞を同定、遊離癌細胞として分析してきた。この結果、癌細胞は形態的に単一細胞としてだけでなく集塊(cluster)にて存在し、後者の方が高率に再発転移することを示した。これはステージ I 期であっても同様の結果が認められた。マウスの転移モデルにおいても集塊形成の方が転移しやすいとの報告例もあり、集塊形態は転移形成に何らかの役割を果たしていると考えられるが、その詳細は不明である。一方原発巣の病理組織の脈管侵襲を調べてみると cluster の存在と有意な関係を認め、この結果は癌細胞に破壊された血管から転移に有利な集塊形成の癌細胞が血中に導入されている一連の転移現象の具体的

モデルを示し、原発巣の環境因子も転移には重要であることを示唆している。一方、癌細胞も自らが転移しやすい形質を獲得している可能性や癌細胞以外の免疫細胞の関与も転移をサポートする一旦を担っていることが最近になり明らかになっている。特に上皮間葉移行(EMT; Epithelial Mesenchymal transition)と呼ばれる現象は癌細胞が上皮系から間葉系の紡錘状に替り、E-cadherin などの接着因子の発現が低下し、より転移しやすい有利な性質を帯びるものと考えられ、癌の転移、浸潤に深く関係していると考えられている。一方癌免疫の見地から検討すると、PD-1/PD-L1(Programmed cell death 1/Programmed cell death 1 ligand 1)と呼ばれる免疫チェックポイント機構が、各種免疫細胞からの攻撃から回避する重要なメカニズムであることがわかってきたが、遊離癌細胞-EMT-免疫チェックポイントの関係についてはわかっていない。ここで、遊離癌細胞については臨床検体を用い、その臨床背景との関連性を調べ、また EMT と免疫チェックポイントとの関連性を調べることで、最終的には、それらの結果を統合し転移形成のメカニズムを明らかにすることとした。

2. 研究の目的

肺癌の発生率は増加の一途をたどっており日本では死因の第一位となっている。肺癌治療成績の向上は国民衛生・厚生において急務であり、特に非小細胞肺癌は最も多く完全切除しても半数近くが再発する。遠隔転移が術後再発の約70%を占め、転移を克服することが今日課された最も重要な課題である。一般的に遠隔転移の第一歩は原発巣からの癌細胞の遊離であると考えられ、この細胞が血中で循環している間(循環癌細胞)に、遠隔臓器に生着し転移すると考えられる。よってこの循環癌幹細胞の性質を知ることは、転移を制御する上で重要である。この循環癌細胞を可能な限り enrich し、生物学的特徴を明らかにすることによって、バイオマーカーとしてのみならず、転移現象のメカニズムを明らかにすることと、癌細胞の転移に有利な形質獲得と癌免疫との関連性を明らかにすることが本研究の目的とする

3. 研究の方法

* 循環癌細胞研究

原発性肺癌の摘出肺の肺静脈からは血液を採取し ScreeCell® Cyto cell kit にて循環癌細胞を同定し、パバニコロウ染色にて癌細胞を同定し、その形態(癌細胞なし:N; non cancer cell, 単一癌細胞のみ:S; singular cancer cell, 集塊形成癌細胞あり:CS; Clustered cancer cells)に分類し各種臨床項目並びに予後との相関関係を調べた。また、ScreeCell® で enrich した細胞を培養し、その分子生物学的特徴を調べることでした。

* EMT-PD-1/PD-L1

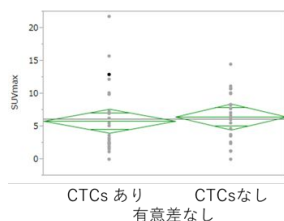
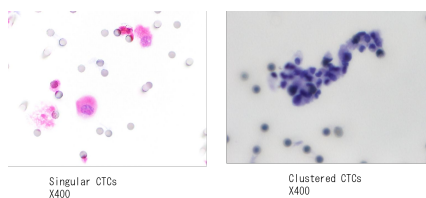
A549 ヒト腺癌の肺癌細胞株を用いて、TGF-

にてEMT誘導しPD-L1の発現制御について mRNA を RT-PCR にてタンパクを Western blotting 法にて分析する。ターゲットとなる遺伝子は上皮系マーカーであり E-cadherin と間葉系マーカーである N-cadherin、そして PD-L1 とした。

4. 研究成果

原発性肺癌に対して外科的切除を行った計 63 症例において検討した。臨床背景は平均年齢は 69 歳 (49 - 85) で、男女比 40 : 23 であった。病理病期 pStage I A / I B / I I A / I I B / I I I A / I V = 20 / 20 / 5 / 6 / 9 / 2 であった。病理組織像では腺癌が 48 例、扁平上皮癌が 10 例、カルチノイドが 1 例、神経内分泌型が 4 例であった。各症例において切除肺の肺静脈から静脈血を採取し ScreeCell® CYTOkit にて循環癌細胞を捕獲し、Papanicolaou 染色にて癌細胞の同定を行った。28 症例において循環癌細胞を認めた。形態別には CS 群 (集塊形成) が 23 例で S 群 (単一癌細胞) が 5 例であった (図)。各臨床因子 (pStage、腫瘍マーカー CEA、PET による SUV-max 値、腫瘍径) において循環癌細胞の有無とその形態において相関関係を調べてみた。

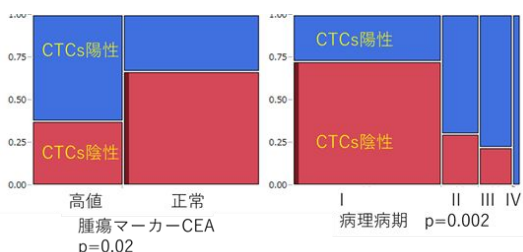
(図 Singular CTCs & Clustered CTCs)



術前 PET での SUV-max 値の相関関係を調べたが、循環癌細胞陽性群と陰性群での有意差は認めなかった。

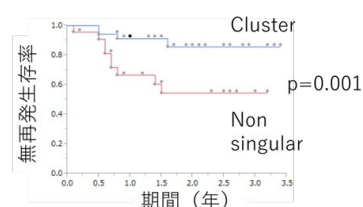
(図)

(図 PET-SUV-max と CTCs の陽性率) その他腫瘍マーカー CEA の高値群で有意に循環癌細胞の陽性率が高かった。また病理病期が進行するにつれて有意に循環癌細胞の陽性率が高い傾向にあった。(図) しかし、形態別にみると各々の有意差は認めなかった。



(図 CEA と病理病期における CTCs)

一方形態別にみると CS 群とそれ以外での相関関係は認めなかった。

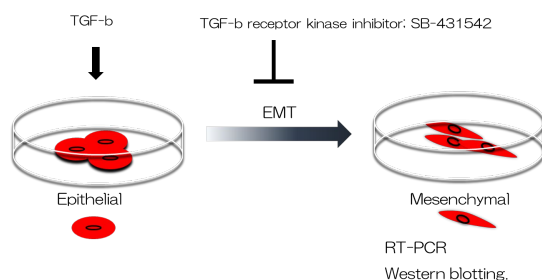


また無再発

生存期間において (図 無再発生存率)

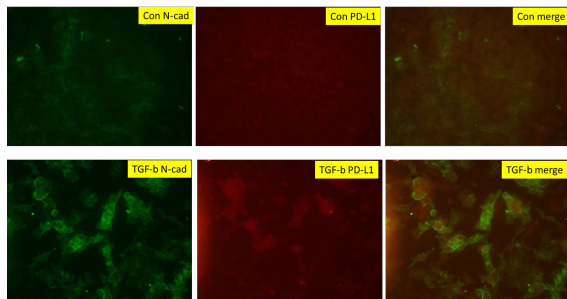
Log-rank 検定を行ったところ CS 群で有意に再発率が高い結果であった。そして、以上の結果をもとに、ScreeCell® にて検出した CTCs を enrich し培養した。計 5 例において、最大 4 週間の培養系を務めたが、CTCs の増殖は認めず。CD45negative selection 法にて、さらに血球を enrich した状態で ScreeCell® にて培養を試みたが、やはり CTCs の増殖は認めず、培養系の確率は断念せざるを得なかった。そこで、循環癌細胞が血液循環中、または転移予定臓器にて、免疫細胞からの攻撃を回避するメカニズムを明らかにすることから転移形成の制御に迫ることとした。この研究において着目したのが、免疫チェックポイントで主要な役割を担っている、PD-1 / PD-L1 (Programmed cell death 1 / Programmed cell death 1 ligand 1) 経路と癌転移や進行に深く関わっているとされている上皮間葉移行 (EMT; Epithelial Mesenchymal transition) である。まず、これらがどのように関連性があるか肺癌細胞株を用いて in vitro で調べることとした。

EMT による PD-L1 の発現制御を明らかにするため、まず肺腺癌の細胞株 A549 に EMT 誘導因子である TGF- β を添加し PD-L1 の発現の変化と E-cadherin (CDH1)、N-cadherin (CDH2) などの EMT マーカーの発現を、蛍光 mRNA、蛋白から RT-PCR、Western blot にて確認した (下図)。

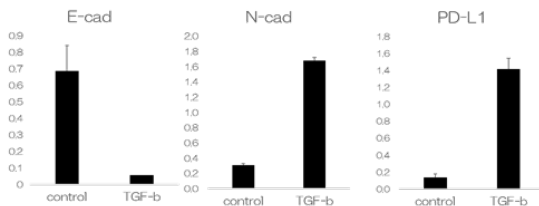


免疫蛍光染色では TGF- β 投与群で N-cadherin と PD-L1 発現上昇を認めた (図) RT-PCR にて、コントロール群に比し TGF- β 群で間葉系マーカーである N-cadherin の上昇を、上皮系マーカーの E-cadherin の低下を認めた (図)。また PD-L1 は TGF- β 群でコントロール群に比べ増加を認めた (図)。これにより TGF- β による EMT 経路において PD-L1 が誘導されることが示唆された。同様の結果がその他の肺癌細胞株でも確認された。蛋白の変化を見るために Western blot を施行したが、同様に TGF- β による EMT 誘導にて PD-L1 の上昇を認めた (図)。

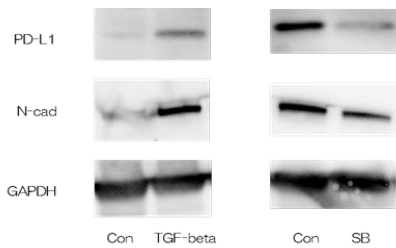
(図 免疫蛍光染色)



(図 RT-PCR)



(図 Western blotting)



TGF- 阻害剤投与にてタンパク発現の変化を見たところコントロール群比し N-カドヘリンと PD-L1 の発現抑制が認められた。

以上、このことを総合的に判断すると、原発性肺癌の外科的切除例における循環癌細胞の存在は予後不良因子であり、転移形成に関係している可能性が示唆された。また、転移形成を癌細胞の免疫学的アプローチから解析した結果、EMT と免疫チェックポイントの一つである PD-L1 の関与が示唆された。これらは、癌細胞が腫瘍本体から EMT を介し遊離し血中を循環し転移巣を形成するまでに、生存する有利な性質を獲得していることを示唆する。今後臨床検体を用いて PD-L1 の発現と循環癌細胞の存在との関連性を報告する予定である。

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 10 件)

Funaki S, Nakamura T, Nakatani T, Umehara H, Nakashima H, Okumura M, Oboki K, Matsumoto K, Saito H, Nakano T.
Global DNA hypomethylation coupled to cellular transformation and

metastatic ability.

FEBS letter: 589:4053-4060,2015

DOI: 10.1016/j.febslet.2015.11.020

Nojiri T, Hosoda H, Tokudome T, Miura K, Ishikane S, Otani K, Kishimoto I, Shintani Y, Inoue M, Kimura T, Sawabata N, Minami M, Nakagiri T, Funaki S, Takeuchi Y, Maeda H, Kidoya H, Kiyonari H, Shioi G, Arai Y, Hasegawa T, Takakura N, Hori M, Ohno Y, Miyazato M, Mochizuki N, Okumura M, Kangawa K.

Atrial natriuretic peptide prevents cancer metastasis through vascular endothelial cells. Proc Natl Acad USA : 112(13) 4086-91,2015

DOI: 10.1073/pnas.1417273112

S Funaki, Nakamura T, Nakatani T, Umehara H, Nakashima H, Nakano T. Inhibition of maintenance DNA methylation by Stella.

Biochem Biophys Res Commun: 453(3) :455-60,2014

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.09.101.

S Funaki, Nakamura T, Nakatani T, Umehara H, Nakashima H, Okumura M, Oboki K, Matsumoto K, Saito H, Nakano T.

Global DNA hypomethylation coupled to cellular transformation and metastatic ability .Biochem Biophys Res Commun: 589(24 Pt B):4053-60.

DOI: 10.1016/j.febslet.2015.11.020.

Sawabata N. Locoregional recurrence after pulmonary sublobar resection of non-small cell lung cancer: can it be reduced by considering cancer cells at the surgical margin?

Gen Thorac Cardiovasc Surg:61:9-16, 2013

DOI: 10.1007/s11748-012-0156-6

Sawabata N, Kanzaki R, Sakamoto T, Kusumoto H, Kimura T, Nojiri T, Kawamura T, Susaki Y, Funaki S, Nakagiri T, Shintani Y, Inoue M, Minami M, Okumura M. Clinical predictor of pre- or minimally invasive pulmonary adenocarcinoma:possibility of sub-classification of clinical T1a. Eur J Cardiothorac Surg,2013
DOI: 10.1093/ejcts/ezt329

Shintani Y, Abulaiti A, Kimura T, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M,

Sawabata N, Minami M, Morii E, Okumura M. Pulmonary fibroblasts induce epithelial mesenchymal transition and some characteristics of stem cells in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*:96:425-33,2013
DOI:10.1016/j.athoracsur.2013.03.092

Funaki S, Sawabata N, Abulaiti A, Nakagiri T, Shintani Y, Inoue M, Minami M, Okumura M. Significance of tumour vessel invasion in determining the morphology of isolated tumour cells in the pulmonary vein in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* : 43 (6): 1126-1130, 2013
DOI: 10.1093/ejcts/ezs553

Abulaiti A, Shintani Y, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Okumura M. Interaction between non-small-cell lung cancer cells and fibroblasts via enhancement of TGF- β signaling by IL-6. *Lung Cancer*:82(2):204-13,2013
DOI: 10.1016/j.lungcan

[学会発表](計 15 件)

Shintani Y, Funaki S, Kimura T, Fujiwara A, Kawamura T, Bessho T, Inoue M, Minami M, Okumura M. Activation of TGF β -IL6 axis mediates chemoresistance in non-small cell lung cancer by increasing epithelial-mesenchymal transition signaling. AACR annual meeting 2015. 2015/4/22, Philadelphia

新谷 康、藤原綾子、木村 亨、川村知裕、舟木壮一郎、井上匡美、南 正人、奥村明之進 上皮間葉転換 EMT を標的とした肺癌治療の開発、第 68 回日本胸部外科学会定期学術集会、2015/10/17-20、神戸
舟木壮一郎、福井絵里子、川村知裕、新谷 康、木村 亨、南 正人、奥村明之進 Clinical significance of Programmed Death 1-Ligand 1(PD-L1) in human Thymic cancer. 第 68 回日本胸部外科学会定期学術集会、2015/10/17-20、神戸

舟木壮一郎、福井絵里子、川村知裕、木村 亨、新谷 康、南 正人、奥村明之進 胸腺腫における PD-L1 発現の臨床学的意義 第 56 回日本肺癌学会学術集会 2015/11/26-28、横浜

野尻崇、新谷康、井上匡美、南正人、別所俊哉、舟木壮一郎、川村知裕、竹内幸

康、前田元、奥村明之進 ANP の血管保護作用による新しい癌転移予防戦略 - 前向き多施設臨床研究に向けて - 第 32 回日本呼吸器外科学会総会 2015/5/14-15、高松

野尻崇、細田洋司、徳留健、三浦浩一、新谷康、木村亨、井上匡美、南正人、竹内幸康、前田元、宮里幹也、寒川賢治、奥村明之進 ANP の血管保護作用による術後再発予防効果 - 前向き多施設臨床研究開始に向けて - 第 53 回日本癌治療学会学術集会 2015/10/29-31、京都

楠本英則、新谷 康、川村知裕、舟木壮一郎、井上匡美、別所俊哉、南 正人、奥村明之進 非小細胞肺癌における Podocalyxin の臨床学的意義 第 56 回日本肺癌学会学術集会、2015/11/26-28、横浜

藤原綾子、新谷 康、別所俊哉、舟木壮一郎、川村知裕、井上匡美、南 正人、奥村明之進 肺癌細胞株におけるピルフェニドンによる抗腫瘍効果の検討 第 56 回日本肺癌学会学術集会、2015/11/26-28、横浜

舟木壮一郎、澤端章好、川村知裕、中桐伴行、新谷 康、井上匡美、南正人、奥村明之進 フィルターによるサイズ選択的分離法を用いた原発性肺癌の循環癌細胞の検出法とその応用について 第 31 回日本呼吸器外科学会、2014/5/29-30、東京

Sawabata N, T Sakamoto, H Kusumoto, T Kumura, R Kanzaki, T Nojiri, T Kawamura, Y Susaki, S Funaki, T Nakagiri, Y Shintani, M Inoue, M Okumura. Clinical predictor of minimally invasive pulmonary Adenocarcinoma: A proposal for subclassification of clinical Ta. ESTS,2013/5/26-29, Biemingham
Shintani Y, Abulaiti A, Kimura T, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Morii E, Okumura M Pulmonary fibroblasts increase EMT signaling and decrease sensitivity to chemotherapy in non-small cell lung cancer cells via TGF- β and IL-6 signaling
IASLC,2013/10/27-31, Sydney

Funaki S, Sawabata N, A Abulaiti, T Kawamura, T Nakagiri, Y Shintani, M Inoue, M Minami, M Okumura
In the new adenocarcinoma classification, histo-pathological finding-invasion reflects the presence of isolated tumor cells.
27th European Association for Cardio-Thoracic Surgery.2013/10/5-9, Vienna

Shintani Y, Abulaiti A, Kimura T, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Morii E, Okumura M
IL-6 enhances EMT signaling and decreases sensitivity to chemotherapy in non-small cell lung cancer cells.
第 72 回日本癌学会、2013/10/3-5、横浜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

舟木 壮一郎 (Soichiro Funaki)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号 : 50464251

(2)研究分担者

南 正人 (Masato Minami)
大阪大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号 : 10240847

井上 匡美 (Masayoshi Inoue)
研究者番号 : 10379232
京都府立医科大学・医学研究科・教授

奥村 明之進 (Meinoshin Okumura)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号 : 40252647

中桐伴行 (Tomoyuki Nakagiri)
大阪大学・医学系研究科・招へい教員
研究者番号 : 70528710

新谷 康 (Yasushi Shintani)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号 : 90572983

川村知裕 (Tomohiro Kawamura)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号 : 30528675

澤端 章好 (Noriyoshi Sawabata)
大阪大学・医学系研究科・招聘教授
研究者番号 : 50403184

(平成 25 年度まで分担者として参画)