

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462177

研究課題名(和文) 肺気腫における癌関連線維芽細胞を介した肺癌進展誘導の機序解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Mechanism identification and Developing a novel method for therapy against lung cancer invasion via cancer-associated fibroblasts in pulmonary emphysema

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌治療の新たな標的として、癌関連線維芽細胞が有用であるか否かを検討するために、我々は、肺気腫を合併した肺癌における癌関連線維芽細胞の特性と気腫肺での肺癌の進展における癌関連線維芽細胞の役割を解明することを目的とした。我々は、肺気腫モデルマウスを用いてLewis肺癌細胞xenograftモデルを作製し、そのモデルマウスから摘出した気腫肺における癌関連線維芽細胞の同定をFACS解析を用いたFAP、alpha-SMA陽性細胞の検出により試みた。

研究成果の概要(英文)：To evaluate whether cancer-related fibroblasts are useful as a novel target for lung cancer therapy, we aimed to elucidate the characteristic of cancer-related fibroblasts in lung cancer with pulmonary emphysema and the role of cancer-related fibroblasts in lung cancer progression in the emphysema lung. We manufactured Lewis lung cancer xenograft in murine model with pulmonary emphysema and tried to identify cancer-related fibroblasts in the emphysema lung resected from this model by detecting FAP and alpha-SMA-positive cells using FACS analysis.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 肺気腫 癌関連線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

肺気腫の存在と肺癌

原発性肺癌は悪性新生物の死因の第1位であり、既存の治療ではその制御に難渋している。肺気腫とは病理解剖学的表現で「終末細気管支より末梢の含気空間が、壁の破壊で異常に増加している肺の状態」と定義され、慢性閉塞性肺疾患(以下 COPD)の病態の1つとされる。日本人の40歳以上のCOPD有病率は8.6%、患者数は530万人と推定されているため、肺気腫患者数も多いと予想できる。今まで COPD における肺癌の発生、悪性度に関する研究は多く行われているが、宿主肺が肺癌の進展にどう影響を与えるかについての報告はほとんどない。

我々は喫煙歴があるI期非小細胞肺癌完全切除症例を臨床的に検討し、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、肺気腫の有無が肺癌の予後に影響することを初めて証明した(Ueda K. et al. Clin Cancer Res 2006)。さらに我々は転移性肺癌モデルを用いた動物実験で、肺気腫の存在により肺癌の増大が促進すること、肺気腫の環境下では肺癌細胞と宿主(肺)細胞との相互関係により MT1-MMP/MMP-2 axis が活性化していることを見出し、肺気腫における肺癌細胞の増殖・浸潤に関する分子機序の一つを明らかにした(未発表)。しかし、肺気腫が肺癌進展に有利な環境となるメカニズムの根本的解明には至っていない。

癌における癌関連線維芽細胞(CAF)

以前から癌組織における癌細胞と間質細胞の相互作用の重要性が注目されていた。最近ではCAFが癌進展のどの段階においても重要な機能を担っており、癌の維持や増殖に必要な生存・成長シグナル、栄養の供給に寄与しているだけでなく、癌の進展過程である浸潤や転移を制御していると報告されている(Kalluri R. et al. Nat. Rev. Cancer 2006,

Brennen WN. et al. Mol. Cancer Ther. 2012)。しかし、CAFの遺伝子発現や癌細胞との相互作用に関する分子機構の解明は不十分である。さらにCAFの起源に関しては(1)癌が存在する臓器固有線維芽細胞からの変化、(2)骨髄由来の細胞の生着・分化、(3)癌細胞からの上皮間葉転換(以下 EMT)の3つが想定されているが、明確にわかっていない。

肺気腫における線維芽細胞

肺気腫肺では肺胞隔壁の破壊や免疫異常を来しており、傷害を受けた上皮細胞やマクロファージからサイトカインが産生され、線維芽細胞の活性化また筋線維芽細胞への分化が起こっている。

2. 研究の目的

肺気腫を合併した肺癌におけるCAFの特性、肺癌の進展への寄与のメカニズムについての報告はない。我々は『**肺気腫を合併した肺癌においてCAFが、肺癌の進展を誘導している**』との仮説を立てた。この仮説を動物モデル、ヒト手術標本を用いて次のような研究手順で検証する。

(1)動物モデル(転移性肺腫瘍モデルを作製)

免疫組織染色を用いたCAFの同定と分布状況の確認
CAFの起源の検索
癌組織からのCAFの単離と機能解析
CAFと癌細胞の相互作用による癌細胞の増殖・生存・浸潤・転移を評価
CAFの機能抑制による肺癌進展への影響

(2)ヒト手術標本

免疫組織染色を用いたCAFの同定
CAFの分子表面マーカーの陽性率と臨床的悪性度、予後の関係
癌組織からのCAFの単離と機能解析、機能解析結果と臨床的悪性度、予後の関係

3. 研究の方法

肺気腫を合併した肺癌における CAF の特性

癌組織内における CAF の同定、CAF の起源の探索、癌組織から CAF の単離、CAF の機能解析を行うことで、肺気腫を合併した肺癌の CAF の特性を調べる。

(1) CAF を既知の分子表面マーカーで同定する。

動物モデルを用いて免疫組織化学染色で評価する。CAF や線維芽細胞の表面マーカーである FAP、FSP-1、 α -SMA、Vimentin を使用する (Kalluri R. et al. Nat. Rev. Cancer 2006)。

(2) CAF の起源を探索する。

起源は肺の線維芽細胞からの変化または、かつ骨髄由来の細胞の生着、分化が有力とされている。骨髄由来細胞のみを GFP (green fluorescence protein) で認識できる肺気腫マウスを作製する。同モデルマウスを用いて転移性肺癌モデルを作製する。摘出肺標本を CAF に特異的に発現するとされる FAP (Brennen WN. et al. Mol. Cancer Ther. 2012) について免疫組織化学染色を行う。癌組織内の GFP 陽性/FAP 陽性の細胞を骨髄由来の CAF と、GFP 陰性/FAP 陽性の細胞を骨髄以外の組織由来の CAF と判断し、それぞれの比率を算出する。

(3) CAF を癌組織から単離する。

動物転移性肺腫瘍モデルの摘出肺から初代培養を行う。第2または第3継代細胞を FAP、 α -SMA などの分子表面マーカーの抗体を使用し、Flow cytometry で CAF を単離する。尚、分子表面マーカーの選択は免疫組織化学染色の結果から判断する。

4. 研究成果

肺気腫を合併した肺癌における CAF の特性

エラストラーゼを経気管的に投与し、肺気腫マウスを作製した。肺気腫マウスに Lewis 肺癌細胞 (2.5×10^5 細胞/マウス) を尾静脈から注入し、転移性肺腫瘍モデルを完成させた。

(1) CAF を既知の分子表面マーカーで同定する。

免疫組織化学染色で FAP、FSP-1、 α -SMA、Vimentin の発現を調べた。そのすべてで染色された細胞を認めた。

(2) CAF の起源を探索する。

GFP キメラマウス作成に難渋し、また FAP 染色が明瞭に描出できずに CAF の起源を同定することはできなかった。

(3) CAF を癌組織から単離する。

動物転移性肺腫瘍モデルの摘出肺から初代培養を行う。第2継代細胞を FAP、 α -SMA 分子表面マーカーの抗体を使用し、Flow cytometry で CAF を単離した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

Murakami J, [Ueda K](#), Sano F, [Hayashi M](#), [Nishimoto A](#), Hamano K. Pulmonary emphysema and tumor microenvironment in primary lung cancer. *J Surg Res.* 2016, 200, 690-697, doi: 10.1016/j.jss.2015.09.004. 査読あり

Murakami J, [Ueda K](#), Sano F, [Hayashi M](#), Tanaka N, Hamano K. Prediction of postoperative dyspnea and chronic respiratory failure. *J Surg Res.* 2015, 195, 303-310, doi: 10.1016/j.jss.2015.01.018. 査読あり

[Ueda K](#), Murakami J, Sano F, [Hayashi M](#), Suga K, Hamano K. Similar radiopathological features, but different postoperative recurrence rates, between Stage I lung cancers arising in emphysematous lungs and those arising in nonemphysematous lungs. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2015, 47, 905-911, doi: 10.1093/ejcts/ezu311. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

村上順一、上田和弘、林雅太郎、佐野史歩、濱野公一、喫煙状況および背景肺が肺癌外科治療成績に及ぼす影響、第 55 回日本肺癌学会、2014 年 11 月 14-16 日、国立京都国際会館(京都府、京都市)
Murakami J, Ueda K, Nishimoto A, Hayashi M, Tanaka N, Hamano K.
Prediction of postoperative breathlessness and chronic respiratory failure: significance of lung structural assessment with quantitative computed tomography
第 95 回アメリカ胸部外科学会、2014 年 4 月 29 日、トロント(カナダ)
Murakami J, Ueda K, Nishimoto A, Hayashi M, Tanaka N, Hamano K.
Pulmonary emphysema as a tumor-friendly microenvironment: Role of the MT1-MMP/MMP-2 axis.
第 104 回アメリカ癌学会、2013 年 4 月 10 日、ワシントン(アメリカ)

〔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

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

西本 新 (NISHIMOTO, Arata)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90396325

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

(3) 連携研究者

なし