

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462184

研究課題名(和文) 肺癌切除検体の肺静脈血に含まれるストローマ細胞の検出及び解析

研究課題名(英文) The detection and analysis of the stromal cell included in the pulmonary venous blood of the resected lung cancer specimen.

研究代表者

神山 育男 (Kamiyama, Ikuo)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70317147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、肺癌切除検体の肺静脈血を採取しストローマ細胞の検出と解析を行うことである。そのためにマウス肺癌モデルで静脈血中に肺癌細胞とともに放出されるストローマ細胞を検出、解析するモデルを作成した。培養したマウス肺癌細胞株Lewis lung carcinoma(LLC)をマトリゲルに懸濁しマウス肺内に注入し生着させた。腫瘍は経時的に増大し、病理学的にも肺への生着が確認され、LLCの肺への移植法が確立できた。肺静脈血からセルブロックを作成し癌細胞の検出を試みたが、腫瘍細胞が少なく、目的とした細胞塊を得ることは困難であった。実験モデルのさらなる改良が必要である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to detect and analyze stroma cells included in the pulmonary venous blood of the resected lung from the lung cancer patients. We prepared mouse lung cancer model in order to establish to detect stromal cells circulating with cancer cells in the pulmonary venous blood. Incubated lung cancer cells, Lewis lung carcinoma (LLC), were suspended with Matrigel and injected into mouse lung parenchyma. Cancer cells formed tumor, then the tumor was increased in size chronologically. Pathological result indicated the engraftment of cancer cells into mouse lung parenchyma. Subsequently we tried to detect the cancer cells using the cell block technique in pulmonary venous blood. We made cell block from pulmonary venous blood, but it was difficult to obtain cancer cells because of smallness of circulating cancer cells. Further studies should be conducted to validate this method for screening circulating stromal cells.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 転移性肺腫瘍 ストローマ細胞

1. 研究開始当初の背景

癌転移のメカニズムに関して宿主-腫瘍間の相互作用の重要性が認識されている。腫瘍を構成する癌細胞以外の宿主側のストローマ細胞(間質細胞)には線維芽細胞・筋線維芽細胞などの間葉系細胞、単球・マクロファージなどの免疫細胞、血管内皮細胞や様々な前駆細胞などが挙げられる¹⁾。研究代表者らのグループは、ストローマ細胞が癌細胞と共に転移し、転移のメカニズムに関与しているという仮説を立てた。

原発巣由来のストローマ細胞が転移に関与するという仮説を動物実験モデルで再現し、動物実験で明らかになったメカニズムを利用して、臨床に役立たせることが研究の最終目的である。

2. 研究の目的

マウス肺癌モデルで静脈血中に肺癌細胞とともに放出されるストローマ細胞を検出、解析する方法を開発する(セルブロック法及び免疫染色)。臨床で肺癌のために切除された肺葉の肺静脈血を採取し、ストローマ細胞の検出と解析を行う。肺癌細胞とともに放出されるストローマ細胞のフェノタイプを明らかにする。蛋白発現プロファイルを明らかにして、肺癌細胞-ストローマ細胞間の相互作用を解明する。

3. 研究の方法

赤色蛍光蛋白DsRedに標識されたマウス肺癌細胞株をGFPマウスの肺或いは腎臓に移植し、ストローマ細胞が緑色蛍光蛋白に標識された腫瘍を発育させる。肺静脈或いは腎静脈にカニューレシオンし、持続採血し、蛍光顕微鏡で癌細胞とストローマ細胞が収集されていることを確認する。セルブロック法を用いて静脈血中の細胞を効率よく収集してパラフィンに包埋する。ストローマ細胞のマーカーを用いて免疫染色し、収集された細胞の解析を行う。転移能の異なる癌細胞株と比較し、検討する。マウス実験で手法を確立した後、肺癌のために切除されたヒトの肺葉から、肺静脈内に残留する血液を採取し、セルブロック法でストローマ細胞の解析を行う。マーカーによる免疫染色に加え、種々の蛋白発現プロファイルを明らかにし、癌細胞-ストローマ細胞間の相互作用も解析し検討する。

4. 研究成果

(1) マウス肺癌モデルの作成

手技: マウスはC57BL/6、雄性、8週齢を使用。Lewis lung carcinoma(LLC)をカウントし、50000個をマトリジェルに懸濁して使用した。マウスに麻酔をかけ、左側胸部を剃毛。気管挿管を行い人工呼吸器管理下に皮膚、皮下組織、前鋸筋を切開する。骨性胸郭を露出させると肋間から左肺が透見できる。肋間筋を切離し開胸。左肺靭帯を切離し肺を持ち上げ、インスリン注射用30G針を刺入し、培

養癌細胞を懸濁したマトリジェル20 μ lを肺内にゆっくり注入する。閉創し、数日後、肺内に腫瘍が形成され、やがて縦隔リンパ節に転移を形成したことを確認する。

結果: 移植5日目のマウスでは、肉眼的に左肺に腫瘍が生着していることが確認できた。病理所見でも大型の腫瘍細胞が正常肺胞構造の中に存在していることを確認した。11日目のマウスでは肉眼的に縦隔リンパ節が腫大しており病理学的にも転移が確認され、肺内に移植した癌細胞がリンパ節転移することが確認された。

(2) 肺静脈血からのセルブロック作成

手技: マウスに麻酔をかけ胸骨正中切開で開胸する。左心房を同定し、SP31カテーテルを左心房内に挿入。シリンジでゆっくりと肺静脈血を採取した。採取した血液からセルブロックを作成する。結果: 遠心管法(クライオバイアル)、二重遠心法を行った。安定して1~1.2mlの血液が採取できた。パフィーコート層は比較的明瞭であったが、血球成分を除いた細胞塊を得ることができずパラフィン包埋に至らなかった。

本研究で達成できたことは、マウス肺癌細胞株を肺に移植し腫瘍を発育させる手技を確立したこと、肺静脈(左心房)にカニューレシオンし採血する手技が安定したことである。肺静脈血中の腫瘍細胞塊をセルブロックで観察することが困難でありさらなる改良が必要である。今後も継続して実験モデルの確立を目指す。

<引用文献>

1) Duda DG, Duyverman AM, Kohno M, et al. Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. PNAS 2010;107:21677-21682

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

(1) Kurebayashi Y, Emoto K, Hayashi Y, Kamiyama I, Ohtsuka T, Asamura H, Sakamoto M. Comprehensive Immune Profiling of Lung Adenocarcinomas Reveals Four Immunotypes with Plasma Cell Subtype a Negative Indicator. 査読有. Cancer Immunol Res. 2016 Mar;4(3):234-47. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0214.

(2) Kinoshita T, Fujii H, Hayashi Y, Kamiyama I, Ohtsuka T, Asamura H. Prognostic significance of hypoxic PET using (18)F-FAZA and (62)Cu-ATSM in non-small-cell lung cancer. 査読有. Lung Cancer. 2016 Jan;91:56-66. doi: 10.1016/j.lungcan.2015.11.020.

(3) Otake S, Ohtsuka T, Asakura K, Kamiyama I, Kohno M. Impact of comorbidity index on morbidity and

survival in non-small cell lung cancer. 査読有. Asian Cardiovasc Thorac Ann. 2016 Jan;24(1):30-3. doi: 10.1177/0218492315617834.

(4) Okui M, Goto T, Asakura K, Kamiyama I, Ohtsuka T. Alveolar macrophage phenotype expression in airway-instilled bone marrow cells in mice. 査読有. Springerplus. 2015 Dec 12;4:770. doi: 10.1186/s40064-015-1525-2.

(5) Yotsukura M, Kinoshita T, Kohno M, Asakura K, Kamiyama I, Emoto K, Hayashi Y, Ohtsuka T. Survival predictors after resection of lung metastases of head or neck cancers. 査読有. Thorac Cancer. 2015 Sep;6(5):579-83. doi: 10.1111/1759-7714.12225.

(6) Ohtsuka T, Kamiyama I, Asakura K, Kohno M. Thirty-day outcomes after lobectomy or segmentectomy for lung cancer surgery. 査読有. Asian Cardiovasc Thorac Ann. 2015 Sep;23(7):828-31. doi: 10.1177/0218492315589476.

(7) Kinoshita T, Ohtsuka T, Yotsukura M, Asakura K, Goto T, Kamiyama I, Otake S, Tajima A, Emoto K, Hayashi Y, Kohno M. Prognostic impact of preoperative tumor marker levels and lymphovascular invasion in pathological stage I adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. 査読有. J Thorac Oncol. 2015 Apr;10(4):619-28. doi: 10.1097/JTO.0000000000000480.

(8) Kamiyama I, Kohno M, Kamiya K, Nakamura H, Sawafuji M, Kobayashi K, Watanabe M. A new technique of bronchial microsampling and proteomic analysis of epithelial lining fluid in a rat model of acute lung injury. 査読有. Mol Immunol. 2014 Jun;59(2):217-25. doi: 10.1016/j.molimm.2014.02.013.

(9) Ohtsuka T, Kaseda K, Shigenobu T, Hato T, Kamiyama I, Goto T, Kohno M, Shimoda M. Carbon monoxide-releasing molecule attenuates allograft airway rejection. 査読有. Transpl Int. 2014 Jul;27(7):741-7. doi: 10.1111/tri.12314.

(10) Kohno M, Watanabe M, Goto T, Kamiyama I, Ohtsuka T, Tasaka S, Sawafuji M. Attenuation of lung ischemia-reperfusion injury by rho-associated kinase inhibition in a rat model of lung transplantation. 査読有. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 2014;20(5):359-64. Doi:10.5761/atcs.0a.13-00095.

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) Ikuo Kamiyama, Takashi Ohtsuka, Takao Shigenobu, Yasoo Sugiura, and

Hisao Asamura. Multimodality Treatment for Advanced Thymoma. 16th World Conference on Lung Cancer. 2015.9.6~9.9 デンバー (アメリカ合衆国)

(2) 神山育男, 青木耕平, 澤藤誠, 浅村尚生. 肺癌手術におけるハーモニックスカルペル (フックタイプ DH105) を用いた安全な肺門部露出法. 第 32 回日本呼吸器外科学会総会 2015.5.14~5.15 サンポートホール高松 (香川県高松市)

(3) 河野光智, 神山育男, 松田信作, 渡辺真純, 堀之内宏久, 酒井宏水, 小林紘一. 人工赤血球 (ヘモグロビン小胞体) 製剤の効能と安全性 - 外科周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与の効果と安全性. 第 21 回血液代替物学会年次大会 2014.12.8~12.9 中央大学理工学部後楽園キャンパス (東京都文京区)

(4) 春木理沙, 神山育男, 松田信作, 河野光智, 田口和明, 長尾紗理, 丸山徹, 小田切優樹, 小松晃之. 人工酸素運搬体の新物質戦略 HemoAct の血液適合性および安全性評価. 第 21 回血液代替物学会年次大会 2014.12.8~12.9 中央大学理工学部後楽園キャンパス (東京都文京区)

(5) 神山育男, 四倉正也, 坂巻寛之, 志満敏行, 松田信作, 重信敬夫, 鈴木繁紀, 木下智成, 奥井将之, 朝倉啓介, 大塚崇, 河野光智, 渡辺真純. 左 B1+2 転移気管支領域発生の肺癌に対する左 S1+2 区域切除術 第 55 回日本肺癌学会学術集会 2014.11.14~11.16 京都国際会議場 (京都府京都市)

(6) 河野光智, 大竹 宗太郎, 松田 信作, 四倉 正也, 重信 敬夫, 木下 智成, 加勢田 馨, 奥井 将之, 羽藤 泰, 神山育男, 後藤 太一郎, 大塚 崇, 渡辺 真純, 堀之内 宏久. 進行非小細胞肺癌に対して gefitinib 投与後にサルベージ肺切除を施行した 2 例の経過. 第 55 回日本肺癌学会学術集会 2013.11.21~11.22 京王プラザホテル (東京都新宿区)

(7) 大塚崇, 羽藤 泰, 神山育男, 後藤 太一郎, 河野光智. 葉切除または区域切除による術後 30 日以内の合併症の比較検討. 第 55 回日本肺癌学会学術集会 2013.11.21~11.22 京王プラザホテル (東京都新宿区)

(8) 神山育男, 大竹 宗太郎, 松田 信作, 四倉 正也, 重信 敬夫, 加勢田 馨, 木下 智成, 奥井 将之, 羽藤 泰, 後藤 太一郎, 大塚 崇, 河野光智. 肺尖部胸壁浸潤肺癌手術症例の検討. 第 55 回日本肺癌学会学術集会 2013.11.21~11.22 京王プラザホテル (東京都新宿区)

(9) 四倉 正也, 木下 智成, 大竹 宗太郎, 松田 信作, 重信 敬夫, 加勢田 馨, 奥井 将之, 羽藤 泰, 神山育男, 後藤 太一郎, 大塚 崇, 江本桂, 林雄一郎, 河野光智. 頭頸部原発悪性腫瘍の肺転移に対する肺切除例の検討. 第 55 回日本肺癌学会学術集会 2013.11.21~11.22 京王プラザホテル (東京

都新宿区)

(10) 木下 智成、加勢田 馨、羽藤 泰、神山育男、後藤 太一郎、大塚 崇、林雄一郎、田島敦志、河野光智。末梢発生肺扁平上皮癌における血管・胸膜浸潤の意義。第 55 回日本肺癌学会学術集会 2013.11.21~11.22 京王プラザホテル(東京都新宿区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神山 育男 (KAMIYAMA, Ikuo)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：70317047

(2) 研究分担者

河野 光智 (KOHNO, Mitsutomo)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：10276272

鈴木 繁紀 (SUZUKI, Shigeki)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：80645672

渡辺 真純 (WATANABE, Masazumi)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：90201227