

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：84425

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462194

研究課題名(和文)悪性胸腺上皮性腫瘍のpodoplanin発現に基づいた集学的治療の開発

研究課題名(英文)The establishment of multimodal therapy of thymic epithelial tumors with podoplanin expression

研究代表者

須崎 剛行 (Susaki, Yoshiyuki)

独立行政法人国立病院機構刀根山病院(臨床研究部)・その他部局等・研究員

研究者番号：10528649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、浸潤性胸腺腫や胸腺癌などの悪性胸腺上皮性腫瘍に対し、podoplaninの発現を免疫組織学的に精査した。発現を伴う症例は、そうでない症例に比して明らかに不良な再発予後を得た。また、podoplanin発現が、播種などで再発した部位に高発現している傾向があった。よって、podoplaninが胸腺腫の進行に関連していると考えられた。

よって、胸腺癌細胞株を確立し、上皮間葉移行にpodoplaninが関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Podoplanin expression was examined immunohistochemically in invasive thymomas and thymic carcinomas. Regarding disease-free survival, podoplanin-positive cases had significantly poorer prognosis than podoplanin-negative cases. Podoplanin expression was observed in disseminated lesions frequently. These data indicated that podoplanin was associated with the progress of invasion of thymomas. We established the thymic carcinoma cell line, and clarify podoplanin expression in thymic carcinoma cells correlate with Epithelial Mesenchymal transition.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：podoplanin 胸腺癌 胸腺腫 CTOS

## 1. 研究開始当初の背景

胸腺腫および胸腺癌を含む悪性胸腺上皮性腫瘍は、縦隔悪性腫瘍の中で最も頻度の高い疾患群である。我々はこれまでに、胸腺腫の腫瘍上皮細胞が、正常胸腺上皮細胞に見られる T 細胞分化誘導能をある程度保持していること、その程度が腫瘍上皮細胞の HLA classII 発現と関連すること、また、WHO 分類は予後および腫瘍上皮細胞の免疫学的機能を反映する画期的な臨床分類であることを示してきた。そして、胸腺腫・胸腺癌の腫瘍発生に関わる腫瘍抑制遺伝子座が 6 番染色体長腕に、浸潤転移に関わる抑制遺伝子座が 8 番染色体短腕・16 番染色体長腕に存在する可能性を報告した。最近では胸腺腫瘍上皮細胞における podoplanin の発現が、WHO 分類や正岡病期、予後との関連を示し、腫瘍の悪性化つまり浸潤・転移に関与している可能性が示唆されている。さらに、podoplanin は、一部の固形癌において、癌幹細胞マーカーとしての可能性や癌の悪性化にかかわるとされている形質転換との関連性をも示唆されている。この形質転換は上皮間葉移行 (Epithelial Mesenchymal transition ; EMT) とも言われ、上皮系の強い細胞接着から、より細胞移動に有利に細胞接着の弱い間葉系へ性質を帯びる現象で、肺癌などの種々の固形癌で認められ、予後や転移との相関関係が示されている。このように、胸腺上皮性腫瘍に関する免疫病理学的な解明は進んできた一方で、臨床的な治療戦略については、非浸潤性胸腺腫では完全切除により治癒が見込めるといふ以外に、癌薬物療法が進歩した今日においても化学療法の標準化はなされず、様々なレジメで実地診療がなされ、浸潤性胸腺腫および胸腺癌に対しては集学的治療の必要性が述べられる程度にと

どまっている。これまで、浸潤性胸腺腫に対する併用化学療法を含む集学的治療が臨床試験として前向きに行われている。切除不能 III 期胸腺腫に対し、シスプラチン・ピンクリスチン・ドキシソルピシン・エトポシドを用いた併用化学療法後に外科切除を行い術後放射線照射を追加する第 2 相試験が日本臨床腫瘍グループ (JCOG) で行われ(9)、シスプラチン・ドキシソルピシン・サイクロフォスファミドを用いた併用化学療法を含んだプロトコルも試され、これらの奏効率は 62-77% と報告されている。一方、分子標的療法としては、2004 年に c-kit の遺伝子変異を認めた胸腺癌でイマチニブが奏効した症例報告がなされ、臨床試験が試みられたがその効果は一部の症例に限定されていると結論された。他に、EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブやエルロチニブ、ヒストン・デアセチラーゼ阻害剤のベリノスタット、複数のキナーゼを標的とするソラフェニブやスニチニブなどの分子標的薬も用いられてきたが、これらの効果はいずれも限定的であった(15-17)。つまり、胸腺腫・胸腺癌はきわめて heterogeneity が高い。この原因として、悪性腫瘍は、“cancer stem cell” や “tumor-initiating cell” と呼ばれる single clone からさまざまに分化した細胞で成立している可能性が示唆されている(22)。ここに申請する研究計画は、新しい初代培養システムである Cancer-tissue originated spheroids (CTOS) を導入することにより、in vitro で悪性胸腺上皮性腫瘍における podoplanin の浸潤・転移にかかわる生理経路を解析し、その治療標的としての可能性を評価することを目指している。

## 2. 研究の目的

本研究は、完全切除不能または術後再発を認

めた浸潤性胸腺腫および胸腺癌などの悪性胸腺上皮性腫瘍に対する新たな集学的治療法を開発することを目的とする。抗癌剤や分子標的薬に対する感受性について、切除標本を用いて分子病理学的に解析するとともに、さらに胸腺腫・胸腺癌を新たに確立された培養系を応用して細胞株を樹立し、その悪性化のメカニズムを EMT の見地から、検討する。また抗がん剤耐性のメカニズムを *in vitro* で分析する。Podoplanin 発現を中心としたこれらのデータに基づいて、新たな分子標的薬による治療戦略の構築を目指す。我々は、癌薬物治療が進歩し薬剤の選択肢が豊富になった中で、これまで標準化されていなかった、遠隔転移を含む完全切除不能あるいは術後再発をきたした根治不能の悪性胸腺上皮性腫瘍に対する治療法を確立する。

### 3. 研究の方法

我々は最近、固形癌に応用され始めた新たな初代培養システム：Cancer-tissue originated spheroids(CTOS)を用いて *in vitro* で胸腺腫・胸腺癌の抗癌剤感受性を解析すると同時に、免疫不全マウスに移植し *in vivo* で抗癌剤・分子標的薬の感受性試験を行う。並行して、分子標的療法の可能性を探索するために細胞分裂や血管新生に関与する分子の遺伝子変異・蛋白発現を解析し、確立された培養系で遺伝子発現制御による腫瘍増殖の変化を解析する。

- (A) 悪性胸腺上皮性腫瘍を用いた初代培養系 CTOS の確立
- (B) CTOS 細胞を用い、TGF- $\beta$  による上皮系としての E-カドヘリン、間葉系として N-カドヘリンをターゲットとした EMT 誘導の可能性を調べる。
- (C) CTOS から免疫不全マウスへの腫瘍移植し、動物実験で腫瘍微小

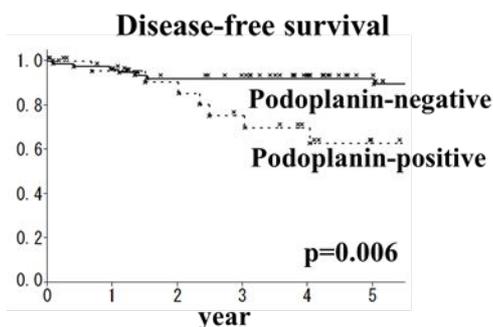
環境を再現・解析できるシステムを策定

- (D) 外科切除標本を用い、podoplanin の蛋白発現を解析し、WHO 分類および病期分類との相関を明らかにする。
- (E) CTOS 培養系で、podoplanin 発現遺伝子を、siRNA を用いてノックダウンし腫瘍増殖への関与を調べる。

### 4. 研究成果

外科切除標本を用いた podoplanin 蛋白発現の検討

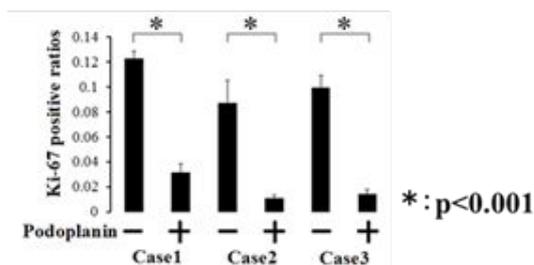
過去の胸腺腫手術例 111 例において、免疫組織学的検討を行った。Podoplanin 発現を認めたものは 26 例(23.4%)であった。Podoplanin 発現例とそれ以外では、5 年無再発生存率において、前者が 63.0%に対し、後者が 92.1%と、発現例で有意に不良な予後を得た( $p=0.006$ )。よって、過去の報告のごとく、podoplanin 発現は、予後不良因子であった。また、podoplanin 発現と、WHO 分類との関連については、Type B1-3 と Type A/AB では、前者に有意に発現が高かった( $p<0.001$ )。しかしながら、podoplanin 発現と正岡病期とは関連を認めなかった(下図)。



なお、胸腺癌については、12 例について免疫組織学的検討を行った。うち、2 例(16.7%)に podoplanin 発現を認めた。症例数が少ないが、胸腺癌については、podoplanin 発現例の再発は観察期間中になく、胸腺腫とは異なっていた。

胸腺腫播種 11 例、リンパ節転移 5 例について podoplanin 発現を調べたところ、播種巣の 10 例(90.3%)、リンパ節転移全例(100%)に発現を認めた。なかには、原発巣に発現のないものも含まれた。Podoplanin は胸腺上皮細胞進展に関与する可能性が示唆された。

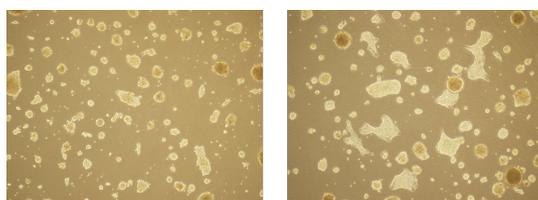
一方で、胸腺腫瘍細胞において、podoplanin 発現細胞と、非発現細胞に分け、Ki-67 発現率を比較すると、podoplanin 発現細胞において、Ki-67 発現率は有意に低く ( $p < 0.001$ )、これは、podoplanin 発現細胞の dormant な性質を現すものと考えられた。すなわち、podoplanin は、いわゆる“ tumor-initiating cell ”かそれに類する細胞の発現蛋白である可能性を示唆するものであった (下図)。



さらに、播種切除症例において、同部の podoplanin 発現を検討したところ、原発巣で発現がない症例

#### CTOS による胸腺癌細胞の樹立

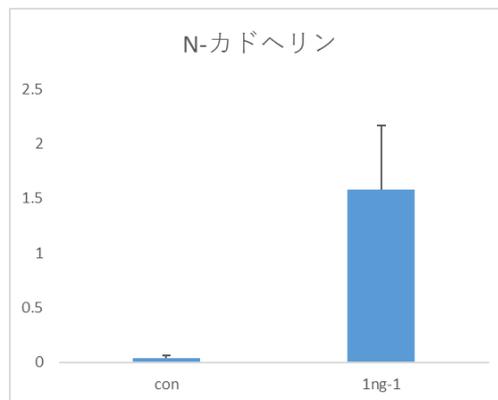
当科で外科的切除した胸腺腫・胸腺癌を CTOS 法にて細胞株の樹立を試みた。胸腺腫では WHO 分類各 type を試みるも細胞株は樹立できなかった。胸腺癌 1 例のみ樹立できたため、この細胞株にて研究を進めることとした。まずその細胞株の悪性を調べるため癌浸潤、転移において重要な上皮間葉移行 (Epithelial Mesenchymal transition ; EMT) に着目した。胸腺癌における EMT の関連性についての報告はないものの、肺癌など多くの癌腫において、転移、浸潤など悪性と EMT の相関関係が報告されているため、TGF- $\beta$  を投与し EMT の誘導が起こるか調べ、本細胞株の性質を調べてみた。TGF- $\beta$  1ng/ml 投与し 2 日間培養した結果細胞形態を見たところ、紡錘状の細胞の形態変化した細胞群の増加を認めた (下図)。



コントロール群

TGF- $\beta$  1ng/ml 投与群

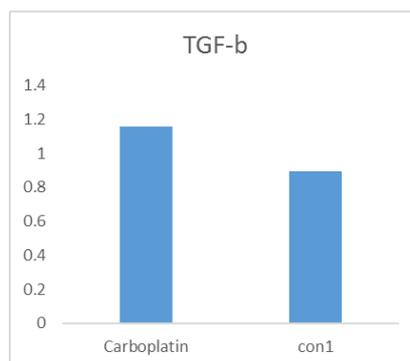
またそれらの細胞コロニーを回収し、m total RNA を抽出、RT-PCR にて EMT マーカーである E-カドヘリンと N-カドヘリンの mRNA を測定したところ、コントロール群に比し有意に N-カドヘリンの上昇を認めた (下図  $p < 0.05$ )。しかし E-カドヘリンには両群で有意な差が認めなかった。



過去の報告例における肺癌細胞株 (A549) では TGF- $\beta$  による EMT 誘導での N-カドヘリンの上昇は一致するものの、E-カドヘリンの低下は認めず、癌腫による性質の差が示唆された。しかし EMT マーカーが変化することから、何らかの関連性をうかがわせる結果であった。

また、抗がん剤感受性を調べるためカルボプラチン 25  $\mu$ M 下に 2 日間培養した。肺癌細胞株 A549 では、EMT 誘導されることがわかっている。結果、形態は TGF- $\beta$  投与のような明らかな紡錘状細胞への形態変化を認めなかった。

また mRNA を調べた結果、TGF- $\beta$  投与のような一定の傾向はみられなかった。しかし TGF- $\beta$  の mRNA はカルボプラチン投与群で上昇することが確認された (下図)。上記の結果からも TGF- $\beta$  投与で N-カドヘリンの上昇を認めるため、さらに投与期間を延長すれば N-カドヘリンが上昇する可能性もあると思われる。以上のように肺癌細胞株と、今回 CTOS にて樹立した胸腺癌細胞株との性質の差異は後者があくまでも一臨床サンプルからのものであり、おそらく heterogeneous な細胞集団であること、またカルボプラチン投与期間が比較的短期間であったことが影響していると思われる。今後この性質を念頭に、podoplanin の mRNA の発現を TGF- $\beta$  投与やカルボプラチンなどの抗がん剤投与にて検討し、さらに癌幹細胞マーカーとの関連性を調べる予定である。



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 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

第 28 回日本呼吸器外科学会(2011/5/13, 別府)

発表者: 須崎 剛行

演題名: 胸腺上皮細胞における podoplanin 発現の臨床病理学的意義の解析

第 30 回日本呼吸器外科学会(2013/5/9, 名古屋)

発表者: 須崎 剛行

演題名: 胸腺腫における podoplanin の発現と悪性度との関係についての臨床病理学的検討

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

須崎 剛行 (Susaki Yoshiyuki)

独立行政法人国立病院機構刀根山病院・研究員

研究者番号: 10528649

(2)研究分担者

奥村 明之進 (Okumura Meinoshin)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 40252647

(3)研究分担者

南 正人 (Minami Masato)

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 10240847

(4)研究分担者

井上 匡美 (Inoue Masayoshi)

京都府立大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 10379232

(5)研究分担者

新谷 康 (Shintani Yasushi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 90572983

(6)研究分担者

中桐 伴行 (Nakagiri Tomoyuki)

大阪大学・医学系研究科・研究員

研究者番号: 70528710

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

( )