

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860272

研究課題名(和文)肺腺癌の悪性化に関わるケモカインネットワークの解明

研究課題名(英文)Elucidation of chemokine network associated with lung adenocarcinoma progression

研究代表者

梅田 茂明(UMEDA, Shigeaki)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30644439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：KRAS下流分子の網羅的解析の中で、候補遺伝子のケモカインに着目して発現解析を行った。幾つかの肺癌細胞株ではCXCL7の完全な発現の消失が見られた。臨床検体ではCXCL7とCXCR2の発現は正に相関していた。CXCL7の免疫染色では低分化腺癌で高発現していた。CXCL7高発現のがん細胞周囲ではリンパ球浸潤が目立つ症例も認められた。これらの結果からは、ケモカインが肺腺癌の進行や微小環境に関わっていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the course of searching downstream molecules of KRAS induction, the chemokines were focused, and expression analysis of the genes was performed. Some of the lung cancer cell lines showed complete loss of CXCL7 mRNA expression. The mRNA expression of CXCL7 and CXCR2 in clinical samples were positively correlated. The expression of CXCL7 was observed in poorly differentiated adenocarcinoma. Some cases revealed strong expression of CXCL7 in cancer cells accompanied by prominent lymphocytic infiltration. These data suggest chemokines are involved in lung adenocarcinoma progression and cancer microenvironment.

研究分野：人体病理学

キーワード：ケモカイン 肺腺癌 悪性化

1. 研究開始当初の背景

当該研究室では、肺癌の発生進展機構を明確にすべく、病理組織形態学的解析をベースに、分子細胞生物学・分子遺伝学的手法を取り入れ、多角的かつ長期的に研究を継続してきた。これまでに、KRAS 遺伝子変異を伴う肺腺癌が他と比べて有意に高い術後再発危険率を示すこと、また、一方で、マイクロアレイを用いた KRAS 下流分子の網羅的発現解析から、このような悪性度の分子基盤をなす複数の候補分子を同定し、報告してきた。この成績は、KRAS 下流分子に着目した研究は肺腺癌の悪性度を規定する分子基盤を明確にするうえで優れた戦略であることを示している。このマイクロアレイ解析では、変異型 KRAS 遺伝子を導入した不死化気道上皮細胞において、複数のケモカインリガンド (PPBP/CXCL7, CCL3, CXCL2) の高発現が認められており、予備的解析によって、それらの mRNA レベルでの発現が幾つかの肺癌細胞株で高度に上昇していることを確認している。

ケモカインとは細胞間の相互反応を媒介するサイトカインで、1987 年の Yoshimura らによる IL-8 の報告から現在までに 50 種類以上のケモカインと 20 種類以上のケモカインレセプターが同定されている。その作用機構には、パラクライン、オートクライン、ジャクスタ・クラインの3つが考えられている。白血球の遊走作用を促すケモカインは、腫瘍の播種や血管新生、転移などがんの生物学においても重要な役割を持つ。ケモカイン受容体を発現するがん細胞の例として、CXCR4 が卵巣癌やメラノーマ、肺小細胞癌、腎癌、甲状腺癌などがん細胞において高頻度に発現が増強され、その発現はがんの進行や転移と関連する。また、他にも CCR6(直腸癌や膵癌)、CXCR6(前立腺癌)、CXCR2(メラノーマ、食道癌)などの腫瘍細胞での発現が示されている。更に、CXCR4 の発現低下と CXCR7 の発現亢進が高悪性度転化に相關することも最近報告されている。

以上の背景から、変異型 KRAS によって誘導されるケモカインリガンド・ケモカイン受容体の構築するネットワークが、肺腺癌の進展(浸潤・転移)に關与する可能性が十分に考えられる。

2. 研究の目的

当該研究室では、これまでに、KRAS 遺伝子変異を伴う肺腺癌が他と比べて有意に高い術後再発率を示すことを明らかにしてきた。また、マイクロアレイを用いた KRAS 下流分子の網羅的発現解析から、変異型 KRAS によって複数のケモカイン (PPBP/CXCL7, CCL3, CXCL2) の発現誘導が起ることを発見した。ケモカインは、従来、白血球の遊走を促し炎症反応を誘導する因子と考えられていたが、最近では、がん細胞の浸潤・転移への關与が注目されている。また、がんの高

悪性度転化と相關するケモカインの例も報告されるようになってきている。本課題では、変異型 KRAS によって誘導されたケモカインに着目し、それらの構築するネットワークの解明を介して、肺腺癌の悪性度を規定する分子基盤に迫る。

3. 研究の方法

(1) 肺癌細胞株を用いたスクリーニングの mRNA 発現解析

肺癌細胞株(当該教室には40種類程の肺癌細胞株が保管されている)から mRNA を抽出し、逆転写反応を行い、cDNA を作成する。ケモカインリガンド CXCL7, CXCL2, CCL3 とそれぞれの受容体 CXCR2, CCR1/5 のプライマーを設計し、定量的 PCR で mRNA 発現を測定する。初代培養気管支上皮細胞と不死化気管支上皮細胞株を対照とし、肺癌細胞で顕著に発現が上昇(あるいは低下)している分子を抽出する。

(2) 臨床検体を用いた mRNA 発現解析

肺癌細胞株と同様に、抽出された RNA の逆転写反応、cDNA 作成を行い、上記(1)の解析で抽出したケモカイン遺伝子の mRNA を凍結検体を用いて定量的 PCR で解析する。正常部と非腫瘍部との発現比較を行う。

(3) 免疫組織化学的解析と臨床病理学的特性との相關解析

肺癌において高発現が確認されたケモカインについて、パラフィン包埋標本を用いて免疫染色を行い、蛋白レベルでの発現細胞の同定や発現の局在を評価する。発現細胞の同定に関して、好中球やマクロファージ、リンパ球など炎症細胞との位置關係を明らかにする。ケモカインの発現とがんの組織型や分化度、病期、脈管侵襲、リンパ節転移、他臓器転移、予後との相關を検討し、ケモカインが悪性化へ寄与するかどうかを評価する。

4. 研究成果

KRAS 遺伝子下流分子候補の CXCL7, CXCL2 については、細胞株で mRNA 発現解析を行ったところ、幾つかの肺癌細胞株では CXCL7 の完全な発現の消失が見られた。臨床検体を用いた CXCL7 およびその受容体蛋白である CXCR2 の mRNA 発現解析を行ったところ、非腫瘍部では腫瘍部と比較して CXCL7 の有意な発現低下が見られた。CXCL7 と CXCR2 の発現は正に相關していた。

CXCL7 の局在を確認するために、免疫染色を施行。CXCL7 は、細気管支は陰性。腫瘍部では完全な陰性例と癌細胞に局所的に陽性の症例があり、癌細胞がびまん性に陽性の症例も認められた。染色の特徴を調べるために、陽性の割合を 0-1 までのスコアで半定量的に評価し、組織型では充実性増殖優位型腺癌でスコアが高い傾向にあった。0.2 をカットオフとして2群に分けた場合、充実性増殖優位

型腺癌は高発現群に集中していた。CXCL7 に対するレセプターとして CXCR2 を検討した。リアルタイム PCR で、細胞株では高い症例と低い症例を様々な組織型で認めた。CXCR2 の免疫染色では、細気管支上皮は陰性。腫瘍部では、癌細胞は陰性が弱陽性。背景には形質細胞や好中球からなる炎症細胞が陽性であった。パラフィン包埋固定のヒト臨床検体において世界で初めて肺癌細胞での CXCL7 の発現を検出した(図 1)。肺胞上皮や細気管支上皮は基本的に陰性で、肺癌の腫瘍化に関わる可能性がある。CXCL7 と CXCR2 との関係については、パラクラインを介した伝達経路や未知のレセプターを介した伝達経路が考えられる。CXCL7 の発現については低分化な部分で陽性であったため、癌の進行期での役割が示唆される。

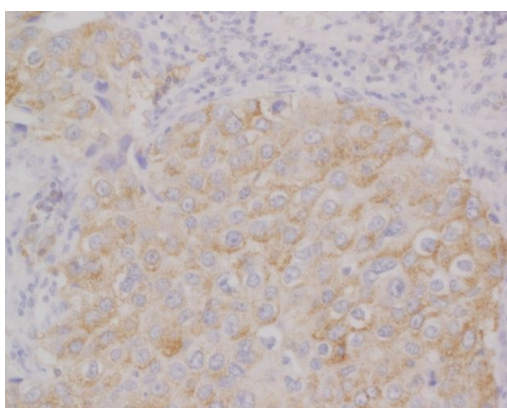


図 1 CXCL7 の免疫染色

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 6 件)

Arai, Y., Chiba, Y., Umeda, S., Ohara, Y., Iwai, T., Komatsu, M., Yabuki, K., Sano, D., and Oridate, N. (2016). Reduction surgery using a combination of a stereolithographic model and navigation system for ossifying fibroma with secondary central giant cell granuloma. *Auris Nasus Larynx*. 43, 207-11. doi: 10.1016/j.anl.2015.08.003. (査読あり)

渡邊まゆ美, 伊藤栄作, 梅田茂明, 阿部志保, 若菜公雄, 明石巧, 北川昌伸, 江石義信, 矢花正, 坂本穆彦. (2015). 輪状細管を伴う性索腫瘍と卵巣粘液性嚢胞腺腫を認めた Peutz-Jeghers 症候群の 1 例. *診断病理* 32, 183-188. (査読あり)

Umeda, S., Tateno, M., Miyagi, E., Sakurai, K., Tanaka, R., Tateishi, Y., Tokinaga, A., Ohashi, K., and Furuya, M. (2014). Uterine tumors resembling ovarian sex cord tumors (UTROSCT) with metastasis: clinicopathological study of two cases. *International journal of clinical and*

experimental pathology 7, 1051-1059. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3971308/> (査読あり)

Yagi, K., Yamamoto, K., Umeda, S., Abe, S., Suzuki, S., Onishi, I., Kirimura, S., Fukayama, M., Arai, A., Kitagawa, M., et al. (2013). Expression of multidrug resistance 1 gene in B-cell lymphomas: association with follicular dendritic cells. *Histopathology* 62, 414-420. doi: 10.1111/his.12035. (査読あり)

Niimi, Y., Takahashi, M., Sugawara, E., Umeda, S., Obayashi, M., Sato, N., Ishiguro, T., Higashi, M., Eishi, Y., Mizusawa, H., et al. (2013). Abnormal RNA structures (RNA foci) containing a penta-nucleotide repeat (UGGAA)_n in the Purkinje cell nucleus is associated with spinocerebellar ataxia type 31 pathogenesis. *Neuropathology* 33, 600-611. doi: 10.1111/neup.12032. (査読あり)

石川善啓, 亀田陽一, 田尻道彦, 大森隆広, 永島琢也, 小島陽子, 菅野健児, 岡本浩直, 梅田茂明, 益田, 宗考, 廣島健三. (2013). 左肺下葉原発 ciliated muconodular papillary tumor の 1 切除例. *肺癌* 53, 817-818. (査読あり)

[学会発表](計 6 件)

梅田茂明, 奥寺 康司, 立石 陽子, 小島陽子, 大橋 健一: The role of CXCL7/CXCR2 axis in lung adenocarcinoma, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 9 日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

梅田茂明, 奥寺 康司, 三井 秀昭, 鈴木 健久, 立石 陽子, 小島陽子, 松村舞依, 大橋 健一: Tumor suppressor role of IL24 in lung adenocarcinoma, 第 104 回日本病理学会総会, 2015 年 5 月 1 日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

梅田茂明, 奥寺 康司, 立石 陽子, 小島陽子, 大橋 健一: 肺腺癌における IL-24 の発現解析, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

梅田茂明, 齋藤悠一, 奥寺 康司, 立石 陽子, 三井 秀昭, 小島陽子, 鈴木 健久, 松村舞依, 大橋 健一: 肺腺癌における IL-24 の臨床病理学的解析, 第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 25 日, 広島国際会議場, ANA クラウンプラザホテル広島(広島市中区)

梅田茂明, 奥寺 康司, 鈴木 健久, 立石 陽子, 三井 秀昭, 小島陽子, 大橋 健一: 変異型 EGFR 遺伝子の導入によって誘導される下流遺伝子の分子基盤について, 日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

梅田茂明, 奥寺 康司, 立石 陽子, 三井 秀昭, 鈴木 健久, 大橋 健一: 変異型 EGFR

遺伝子の導入によって誘導される下流遺伝子の分子基盤について，日本病理学会総会，2013年6月7日，ロイトン札幌，さっぽろ芸文館(北海道札幌市)

〔図書〕(計1件)

田中道雄，常深あきさ，梅田茂明，北條林太郎，石川妙，手島保．(2014)．【超音波×病理 対比アトラス】(5章)心臓 いわゆる"虚血性心筋症" 70歳代男性．検査と技術 42，1071-1073．

6．研究組織

(1)研究代表者

梅田 茂明 (UMEDA, Shigeaki)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30644439