

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462121

研究課題名(和文) 初期浸潤肺腺がん凍結組織培養を利用した肺腺がんの悪性化分子機構の解明

研究課題名(英文) Understanding the mechanism of malignant alterations of invasive pulmonary adenocarcinoma by using frozen tissue culture technique

研究代表者

竹内 朋代 (Takeuchi, Tomboy)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：50450333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：凍結組織培養系を利用して小型肺腺がんでは認められる悪性度の指標になる因子を探索することを目指し、バイオバンクで保存している凍結組織を利用して培養を試みた。しかし、継代培養は効率が悪く解析用の試料確保が困難であったため、腫瘍移植マウスを作製して解析を進めることにした。1次移植を行った36症例のうち、12症例で腫瘍の生着が確認された。形成した腫瘍の多くは100mm<sup>2</sup>以下の小さなものであった。2次移植を行った7症例のうち1症例のみ腫瘍の形成が認められた。今後はさらに症例数を増やし、得られた腫瘍組織について、病理標本の作製及び形態学的特徴の解析を計画している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to search for the factors causing malignant alteration of small adenocarcinoma of the lung using tissue culture technique utilizing frozen tissue preserved in Biobank Center. Frozen tissue culture was performed some cases but it is difficult to secure enough samples by using frozen tissue culture technique. We had tried unsuccessfully to frozen tissue culture, so patient-derived tumor xenografts (PDX) were prepared by transforming lung adenocarcinoma tissues into immunodeficient mice. It was established 12 PDX lines out of 36 samples, and they were mostly small size of tumors below 100mm<sup>2</sup> in size. The transplantable xenograft for second generation was only one case. PDX reflects tumor pathology, growth, metastasis and disease outcome, it might be available for understanding the pathological state of cancer. We plan to establish more PDX models, and it will be analyzed that morphological feature and molecular characteristics of PDX tissues in future.

研究分野：組織培養

キーワード：バイオバンク ヒト試料 バイオリソース

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 野口は、2cm 以下の小型の末梢型肺腺がんを腫瘍の増殖形態と腫瘍間質の性状により 6 型に分類し、予後との関連を見出した(引用文献 1)。肺胞上皮を置換して増殖する type A, B は 5 年生存率が 100% であり、非浸潤がんと考えられている。同様に肺胞上皮置換型の増殖を示し、腫瘍内に繊維芽細胞の増殖巣を認める type C は 5 年生存率が 75% であり、type A, B の非浸潤がんの期間を経て浸潤がんへと進行した初期浸潤がんと考えられている。肺胞上皮非置換性の増殖を示す type D, E, F は予後不良であり、早期から浸潤・転移する進行がんと考えられる。非浸潤がんから浸潤がんへ進展した type C では死亡例が認められるようになるが、浸潤がんへの悪性化により死に至る症例はどのような分子生物学的特徴を持っているのか明らかになっていない。野口 type C 症例において悪性化を引き起こす因子を明確にすることが、肺腺がんにおける初期浸潤の分子機構の解明に必要である。

(2) ヒトの疾患に対する病因・病態を解明するための研究や創薬研究等、臨床に繋がる基礎研究において、最も信頼性が高く、有効なデータを得るためには、ヒト由来の研究試料を使用することが不可欠である。また、最近では世界的にもあらゆるライフサイエンス研究分野において、動物実験の削減という観点からもその代替手段としてヒト由来試料のニーズが高まっている。このような動向を受け、国内外で手術や検査で摘出した組織の残余を研究利用のために収集・管理するバイオバンクの設置が進められている。筑波大学においても主に手術切除後の腫瘍組織を研究用に凍結保存するバイオバンクが設置されており、申請者はその運営に携わっている(引用文献 2)。既に 1500 症例以上のヒト組織が凍結保存されている。特に肺がん症例は保存数が多く、中でも最も発生頻度が高い肺腺がんは約 200 症例を保有している。そこで、凍結保存されている肺腺がん(野口 type C)症例を用いてがん悪性化の機序を解明するための基盤研究を行う。

## 2. 研究の目的

研究用ヒト試料・情報を保管しているバイオバンクに凍結保存されている組織の継代培養を行い、株化を試みる。得られた株化細胞を詳細に解析して小型肺腺がんの中で初期浸潤がんである野口分類 type C 症例についてがんの悪性化を引き起こす原因を探索することを目的とした。

(1) バイオバンクに保存されている小型肺腺がん症例の凍結組織を培養して株化を試み

る。継代を繰り返すことにより、細胞接着、増殖に変化が生じるか継代過程で観察される細胞挙動を解析するとともに、上皮様細胞(がん細胞)のみが選別されて株化できる症例の割合、その臨床情報を詳細に分析する。

(2) 使用する凍結組織の組織片の一部を免疫不全マウスに移植して生着、腫瘍形成能を調べる。腫瘍の形成が認められたマウスについて、もとの腫瘍と比較して形態学的特徴を調べる。さらにマウスに形成された腫瘍組織を培養して(1)と同様に株化を試みる。株化の成功率や株化するまでの細胞挙動について解析する。

(3) 凍結組織培養系において株化が可能であった症例及びマウスに腫瘍形成が認められた症例について、培養や移植を行う前のもとの組織との間で遺伝子発現プロファイル解析する。培養でがん細胞株を樹立できるような症例の分子生物学的特徴を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 初年度は小型肺腺がん症例の凍結組織培養と腫瘍移植マウスの作製を行った。培養の過程で観察される細胞接着、増殖などの細胞挙動を解析した。また、腫瘍移植マウスの腫瘍形成過程の観察を行った。

(2) 小型肺腺がんは症例数が少なく大きさも小さいため、初年度に十分な検証ができなかったため、ステージⅢ以上の進行がんを使用して検証した。培養は組織片を培養皿に静置する方法、組織を酵素で単細胞に分散して播種する方法の 2 種類で行った。さらに細胞保存液に浸漬して緩慢凍結後に保存を行った症例についても静置法で培養を試みた。

(3) 凍結組織片を培養することで十分量の検体を確保することが困難であったので、腫瘍組織移植マウスを作製して組織を確保することにした。肺がん組織を 2-3mm 角に細切したものを免疫不全マウス(C.B-17/Icr-scid)に皮下移植を実施した。腫瘍形成が認められたものは新たなマウスへ 2 次移植を行った。

## 4. 研究成果

(1) 組織片を培養皿に静置する方法、組織を酵素で単細胞に分散して播種する方法の 2 種類で行ったが、何れの方法も増殖速度が非常に遅く、継代できる密度になるまでかなりの時間を要した。そこで、培養保存液に浸漬して凍結保存している組織を用いて培養を試みたところ、細胞増殖が確認でき、継代も可能であったが、繊維芽細胞の混入率が高くがん細胞のみを分離することが非常に困難であった。



図 1. 静置した組織片の周囲に接着した細胞

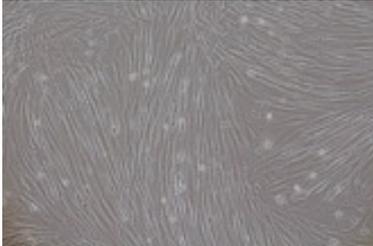


図 2. 培養液に浸漬した組織片を培養して増殖した線維芽細胞

(2) 凍結組織片を用いた培養方法では十分な検体を確保することが困難であった。そこで、今後は腫瘍組織移植マウスを作製して組織を確保することにした。腫瘍組織移植マウスを作製して組織を確保し検証することにした。肺がん組織の一部を免疫不全マウスに皮下移植して腫瘍組織移植マウスの作製を行った。36 症例中 12 症例で腫瘍の生着が確認できたものの、多くの症例は 5mm 程度の腫瘍形成後に増殖が止まり、3 ヶ月の観察期間を経てもそれ以上大きくなることはなく変化が認められなかった。腫瘍を形成したものはあらたなマウスに移植を行い、飼育、観察を続けた。

症例	年齢	性別	病理診断	病期
11	69	男	乳頭状増殖優位型	I B
15	73	男	上皮内腺がん	0
16	75	男	微乳頭状増殖優位型	I A
17	71	男	置換性増殖優位型	I A
18	35	女	微小浸潤性腺がん	I A
19	65	女	置換性増殖優位型	I B
28	75	男	浸潤性粘液腺がん	?
35	64	女	置換性増殖優位型	I B
41	67	男	充実性増殖優位型	I A
44	85	女	微小浸潤性腺がん	I A
46	66	男	微小浸潤性腺がん	I A

48	66	男	浸潤性粘液腺がん	III A
----	----	---	----------	-------

表 1. 1 次移植で生着が認められた症例の詳細

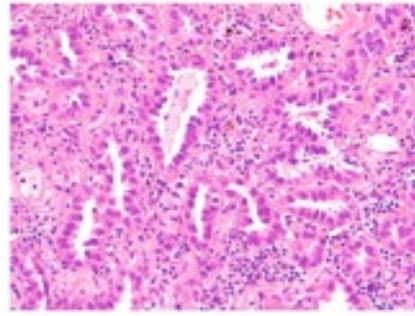


図 3. 患者組織の HE 染色像 (症例 15)

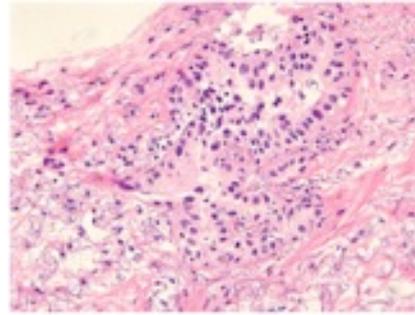


図 3. 1 次移植で形成した腫瘍組織の HE 染色像 (症例 15)

(3) 1 次移植は 36 症例の肺腺がん組織で実施した。1 次生着観察期間中の 1 症例を除いた 36 症例中 12 症例で生着が確認できた。12 症例中 8 症例では外見または触診で腫瘍形成やしこりが観察された。そのうち直径 1cm 以上の腫瘍が形成した症例は 2 症例であり、いずれも浸潤性腺がんであった。直径 1cm 未満の症例は数カ月の観察期間後も腫瘍が大きくなり、パール程度の腫瘍を維持していた。これらの 8 症例は全て 2 次移植を行ったが 2 次移植で腫瘍が確認できたものは 1 症例のみであった (症例 19)。この 1 症例は 1 次腫瘍がパール大のもので 2 次移植で確認できた腫瘍もパール大を維持したまま成長は認められていない。1 次移植で生着した 13 症例中 5 症例は外見からは腫瘍の確認はできず、解剖時に米粒大程度の非常に小さな腫瘍を発見したもので、2 次移植は実施できなかった。移植で得られた腫瘍組織について病理標本の作製を行い、形態学的特徴の観察を行った。何れの生着腫瘍も元の患者組織と形態学的に類似しており、1 次移植においては患者組織の形態が反映されていることがわかった。研究計画では遺伝子発現プロファイル解析を実施するためにマウスに形成された腫瘍、もとの組織より RNA を調整してヒト由来の遺伝子プローブが搭載されているマイクロアレイスライドを用いたマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現解析プロファイルを作成する予定であった。しかし、生着した腫瘍の大きさ、量が十分でないため実施できなかった。

た。

(4) これまでの成果より、肺腺がん組織を移植したマウスにおいて約 30%程度に腫瘍の生着が認められており、特に進行がんでは腫瘍の顕著な増殖も認められた。一方で、初期がんでは移植組織の生着は認められるものの、腫瘍があまり成長せずに維持されていた。このような症例が二次移植、三次移植を経ることにより継代により選別された細胞集団となるのか、また移植による環境変化が生着、増殖能力に影響を及ぼすのか、症例を追加して検証を進める予定である。本研究期間内では、解析に使用するための十分量の検体の確保に時間を費やしてしまったために当初、計画した肺腺がんの悪性化を及ぼす因子の探索まで実施ができなかった。今後はさらに初代腫瘍移植マウスに形成した腫瘍を二次移植、三次移植を行い、得られた腫瘍組織について、病理標本の作製及び形態学的特徴の解析を計画している。並行して遺伝子発現プロファイル解析を実施するためにマウスに形成された腫瘍、もとの組織より RNA を調整する。対象症例としてマウスに腫瘍の生着が認められなかった症例の組織からも同様に RNA を調整してサンプル調整を行う。ヒト由来の遺伝子プローブが搭載されているマイクロアレイスライドを用いたマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現解析プロファイルを作成する。移植マウス腫瘍、もとの組織の遺伝子発現プロファイルを比較するとともに生着症例、生着しなかった症例との間の発現遺伝子プロファイルを比較し肺腺がんの悪性化に関わる因子を解析する。悪性化を引き起こす要因が明らかになることで、肺腺がんにおける初期浸潤メカニズムの解明に大きな意義をもつと考えられる。

<引用文献>

- (1) Noguchi M. *et al.*, *Cancer* 1995;75:2844-2852
- (2) 大学病院を中心とした地域レベルのバンキングシステム構築の試み. 竹内朋代, 森下由紀雄, 野口雅之. *病理と臨床* 30(6):646-653, 2012.

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

竹内 朋代 (TAKEUCHI, Tomoyo)  
筑波大学・医学医療系・助教  
研究者番号：50450333

##### (2) 研究分担者

野口 雅之 (NOGUCHI, Masayuki)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：00198582

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )