

学 位 論 文 要 旨

氏 名 園 田 大



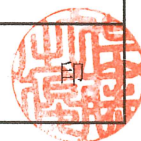
論 文 題 目

Characterization of morphological alterations in micropapillary
adenocarcinoma of the lung using an established cell line

(新規に樹立した細胞株を使用した微小乳頭状肺腺癌の形態学的変化の特徴)

指 導 教 授 承 認 印

佐 藤 之 俊



Characterization of morphological alterations in micropapillary adenocarcinoma of the lung using an established cell line

(新規に樹立した細胞株を使用した微小乳頭状肺腺癌の形態学的変化の特徴)

氏名 園田 大

肺癌で最も一般的な組織型は腺癌であり、これには、*lepidic*、*acinar*、*papillary*、*micropapillary* (MIP)、*solid* がサブタイプとして含まれる。その中で、MIP 肺腺癌はリンパ節転移、リンパ管浸潤および血管浸潤の頻度が高く、予後不良とされている。MIP 肺腺癌は、病理学的には腺上皮細胞が数個で小花状 *florets* に配列した構造を示し中心に線維血管間質が認められないものと定義されている。その特徴は、腫瘍細胞が肺胞腔内に浮かぶように存在していることであるが、これが MIP 肺腺癌の予後不良とどのように関連しているかについては明らかになっていない。さらに、MIP 肺腺癌は他のサブタイプの肺腺癌に比較して細胞株を含む研究試料が少なく、病態生理を解明し治療法を開発するための基礎研究は限られている。そのような中、我々は MIP 肺腺癌の患者から KU-Lu-MPPt3 細胞株を樹立した。これは MIP 肺腺癌から樹立された最初の細胞株である。この研究では、KU-Lu-MPPt3 細胞株を使用して、MIP 肺腺癌の特徴とその悪性度との関連を調査した。

KU-Lu-MPPt3 細胞株は樹立時には Type I コラーゲンコートディッシュで培養し、接着状態で増殖していたが、その後一部の細胞は凝集塊を形成して遊離し浮遊状態で増殖した。浮遊した細胞を回収し、接着状態の細胞と別に培養した。接着状態の細胞を KU-Lu-MPPt3 adhesive (AD) cells、凝集した浮遊細胞を KU-Lu-MPPt3 clumpy and suspended (CS) cells と定義した。

AD cells と CS cells を用いてマイクロアレイ分析を行い遺伝子の発現を比較検討したところ、8054 個の遺伝子が両者の間で 2 倍以上発現が異なっており、このうち脂肪酸受容体である CD36 と、水チャネルタンパク質であり腫瘍の進行や浸潤、転移の促進に関与する *Aquaporin1* が、特に CS cells で発現が高かった。これらの遺伝子の発現を免疫組織化学検査によって KU-Lu-MPPt3 細胞株を樹立した患者の組織と CS cells を比較したところ、肺胞腔内の腫瘍細胞と CS cells で陽性であった。このため、CS cells は MIP 肺腺癌に特徴的な肺胞腔内の腫瘍細胞に類似した性質を保持している可能性があると考えられた。このため、CS cells の特徴を解析することによって MIP 肺腺癌における転移や浸潤機構について解明できると考えた。

マイクロアレイ分析にて同定された発現に差を認める遺伝子を KEGG pathway enrichment 解析にかけたところ、pathway 候補の中に細胞接着分子と Akt シグナル伝達経路を認めた。CS cells で高度に発現した CD36、PDK1、および Jak1 は、Akt 経路の活性化に関連していることが知られており、AD cells で高度に発現した TIMP1 および Paxillin は、限局性接着キナーゼ(FAK)経路の活性化に関連している。そのため、Akt と FAK およびそれらのリン酸化特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングによって、AD cells と CS cells で発現を調べたところ、FAK は AD cells で、Akt

は CS cells で、それぞれ活性化されていることがわかった。また、興味深いことに CS cells は Type I コラーゲンの上で培養すると、数日で一部の細胞が接着し AD cells 様に形態変化した。この細胞を Glued CS cells と定義し、ウエスタンブロッティングによって FAK と Akt の発現を調べたところ、Glued CS cells では CS cells に比較してリン酸化 Akt の発現が低下し、リン酸化 FAK の発現が上昇した。共焦点顕微鏡にてこれらの細胞はリン酸化 FAK の蓄積を伴う葉状仮足のような突起を形成していた。このことから、CS cells の接着性が FAK および Akt のリン酸化と関連していることが示唆された。

このように、CS cells が接着する際に Akt および FAK が連動して変化していることから、FAK と Akt の間で関連性があると考え、FAK 阻害剤及び Akt 阻害剤を加えた際の変化をウエスタンブロッティングによって観察した。その結果、Akt 阻害剤がリン酸化 FAK レベルを低下させ、FAK 阻害剤がリン酸化 Akt レベルを上昇させた。これは、CS cells における Akt と FAK 間のシグナル伝達クロストークの可能性を示唆している。

さらに、CS cells における Akt および FAK と接着性および細胞増殖との関連を調べるために、Akt および FAK の阻害剤を用いて接着アッセイおよび増殖アッセイを行ったところ、両阻害剤とも細胞増殖および接着を阻害した。共焦点顕微鏡分析により、CS cells が接着する際に認められる葉状仮足様突起の形成は Akt 阻害剤によって阻害されることが明らかになった。このため、CS cells において FAK および Akt のリン酸化が接着および増殖に重要な因子となることが分かった。

以上の結果から以下の 3 点が明らかになった。1. 形態及び免疫組織化学検査の結果から CS cells は MIP 肺腺癌に特徴的な所見である肺胞腔内の腫瘍細胞と類似した性質を保持している、2. AD cells では FAK が、CS cells では Akt が活性化されていた、3. CS cells の接着には FAK および Akt のリン酸化が関与していた。

近年他の癌腫の臨床試験において FAK 阻害剤及び Akt 阻害剤の有効性が報告されている。本研究の結果から、MIP 肺腺癌においてこれらの治療薬が有用となる可能性が示唆された。今後、AD cells や CS cells における FAK 経路および Akt 経路の詳細な関与を明らかにすることによって、MIP 肺腺癌の生存や浸潤のメカニズムの解明が進展し、新たな治療法の開発につながることを期待される。