

研 究 報 告 書  
令和2年度：A課題

令和4年3月31日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研究施設 京都府立医科大学

住 所 京都府京都市上京区河原町通  
広小路上る梶井町465

研究者氏名 徳田 深作

(研究課題)

間質圧が肺癌の病態に果たす役割の解明と新たな治療法の開拓

---

令和3年 3月 1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

## 研究背景

慢性炎症は癌のリスク因子となることが知られており、炎症細胞から分泌されるサイトカインが癌の発生・促進に寄与することなどがその原因と考えられている。一方、慢性炎症は間質の圧を上昇させることができることが知られており、ほとんどの癌組織においても間質圧の上昇を認めることが報告されている。しかし、間質側からの物理的な圧力が癌の病態に果たす役割について調べた報告はほとんどない。

肺癌は固形癌の中で分子標的薬が実臨床で最初に使用された腫瘍であり、その病態に関与するドライバー遺伝子やシグナル経路が最もよく分かっている腫瘍の一つである。ドライバー遺伝子を標的とした分子標的薬の開発は肺癌の治療成績の向上をもたらしたが、分子標的薬を含めた抗癌剤治療を継続しても肺癌細胞はいずれ耐性化してしまうため、遠隔転移を有する肺癌の根治は未だに難しくその予後は依然として厳しい状況である。

本研究では肺癌細胞に静水圧を加えてその影響を調べ、肺癌の病態に関与する既知のシグナル経路との関係を比較検討することによって、間質側からの物理的な圧力が肺癌に及ぼす影響を明らかにする。遠隔転移を有する肺癌を根治して肺癌の治療成績を改善するためにはこれまでの抗がん剤治療とは異なる角度からアプローチする治療法が必要と考えられ、本研究で「間質圧」が肺癌の病態に果たす役割を明らかにすることは肺癌の新たな治療戦略の開拓に貢献すると考えられる。

## 方法

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の培養細胞である HCC4011、HCC827、H1975、H1650、HCC4006、PC9 細胞を用いて実験を行った。

静水圧を加えるために培養細胞を  $0.4\mu\text{m}$  のポアを有するフィルター膜 (Corning 社) に培養し、コンフルエントになった状態で管腔側と基底側の培地の量を変えることによって培地の高さに差をつけ、静水圧の影響を検討した。

静水圧が培養細胞に与える形態学的な影響を調べるために光学顕微鏡や電子顕微鏡による解析を行った。細胞増殖を検討するため BrdU 法による解析、シグナル伝達を調べるためウェスタンブロッティングや Phospho-Kinase Array による解析を行った。また肺癌患者の手術検体を用いて光学顕微鏡や電子顕微鏡による解析を行った。

本研究で用いた培養細胞や手術検体は、施設の倫理委員会の承認を得た研究計画に沿って患者や家族に十分なインフォームドコンセントを行い、同意いただいた上で採取したもの用いた。

## 結果と考察

上皮成長因子受容体 (EGFR) の遺伝子変異は日本人における肺腺癌の原因遺伝子の約半数を占めており、関与するシグナル経路の解明が進んでいる。そこで本研究では EGFR 変異陽性肺癌細胞の HCC4011、HCC827、H1975、H1650、HCC4006、PC9 細胞を用いて実験を行った。

まず基底側からの圧が及ぼす影響を調べるために培養細胞がコンフルエントになった状態で水面の差をつけて静水圧を加えたところ、HCC4011、HCC827、H1975 細胞では水面の差が維持できたが H1650、HCC4006、PC9 細胞では維持できなかった。免疫染色でタイトジャンクション構成タンパク質の ZO-1 を観察したところ、水面の差が維持できなかった H1650、HCC4006、PC9 細胞では ZO-1 の細胞間接着部位への局在が確認できず、これらの細胞株ではタイトジャンクションの形成が不十分なため水面が維持できないと考えられた。水面の差を維持することができ実験的に静水圧を加えることが可能であった HCC4011、HCC827、H1975 細胞を用いてさらに解析を進めた。

HCC827 細胞に基底側から静水圧を加えて走査型電子顕微鏡で細胞表面を観察したところ、管腔側から圧を加えた条件では上皮の表面は平坦であったが、基底側から圧を加えた条件では上皮の表面はところどころで隆起して凹凸不整な構造が認められた（図 1 上）。垂直断面の切片を作成して光学顕微鏡で観察したところ、管腔側から圧を加えた条件では HCC827 細胞は単層構造を示したが、基底側から圧を加えた条件では細胞が数層に重なり上皮の重層化が認められた（図 1 下）。同様の重層化は HCC4011 細胞、H1975 細胞でも確認された。さらに透

透過型電子顕微鏡では重層化した上皮の内部に腔が認められ、腔の表面には微絨毛が観察された。これらの結果から、基底側から圧を加えることによって上皮の重層化や極性異常が引き起こされることが示唆された。

次に基底側からの圧が細胞増殖に及ぼす影響について BrdU 法で解析を行ったところ、基底側から圧を加えた条件では管腔側から圧を加えた条件と比較して BrdU 陽性細胞が増加していた(図 2)。さらにアポトーシスを評価するため培養上清に認められるアポトーシスした細胞の debris を定量したところ、基底側から圧を加えた条件では debris の量が減少していた。これらの結果から、基底側からの圧によって細胞周期の亢進やアポトーシスの抑制が引き起こされると考えられた。

さらに間質圧がシグナル伝達に及ぼす影響について検討を行った。EGFR 変異陽性肺癌では EGFR の下流に存在する Ras/Raf/MEK 経路や PI3K/Akt/mTOR 経路が活性化されることが知られている。そこで基底側の圧がこれらのシグナル経路に与える影響を検討するためにウェスタンブロッティングで解析を行ったところ、基底側から圧を加えた条件ではリン酸化 ERK やリン酸化 Akt はむしろ減少していた(図 3 左)。さらに Phospho-Kinase Array を用いてキナーゼ活性の変化について網羅的な解析を行ったところ、基底側から圧を加えた条件でいずれのキナーゼのリン酸化も増加していなかった。そこでさらに主要なシグナル経路の一つである PKA シグナルの関与を検討したところ、PKA の活性化剤であるフルスコリンを投与した条件では基底側からの圧によって引き起こされる上皮の重層化が抑制された(図 3 右)。これらの結果から、基底側からの圧によって引き起こされる上皮の重層化や細胞増殖の亢進に上皮の重層化や細胞増殖の亢進に PKA シグナル経路が関与することが示唆された。

さらに肺癌の手術検体を用いて透過型電子顕微鏡を用いて観察したところ、重層化した腫瘍の内部に腔が形成されており、腔の表面には微絨毛が認められた(図 4)。これらの結果からヒト肺癌組織においても培養肺癌細胞に基底側から圧を加えたときと同様の極性異常が生じていることが示唆され、生体内においても間質圧の上昇が癌の増殖亢進や極性異常に関与している可能性があると考えられた。

本研究により、がん組織で認められる間質圧の上昇が肺癌細胞の増殖亢進、アポトーシスの抑制、極性異常に寄与しており、PKA シグナルがそのメカニズムに関与することが示唆された。今後は間質圧の上昇による癌促進メカニズムのさらなる解明を目指し、新たな方向からアプローチする肺癌の治療法の開拓を目指す予定である。

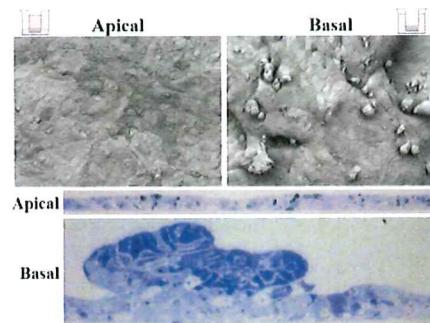


図 1：静水圧による上皮の重層化  
上図:HCC827 細胞の走査型電子顕微鏡図。基底側から圧を加えた条件では表面に隆起・凹凸が観察された。  
下図：垂直断面のトルイジンブルー染色図。基底側から圧を加えた条件で上皮の重層化を認めた。

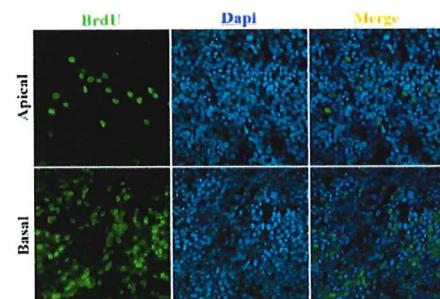


図 2：静水圧による細胞増殖の亢進  
BrdU 法。基底側からの圧によって BrdU 陽性細胞の増加が認められた。

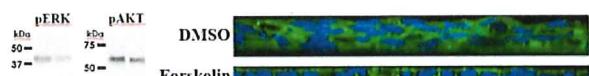


図 3：静水圧がシグナル伝達に及ぼす影響  
左図：ウェスタンブロット。基底側からの圧によって、リン酸化 ERK、Akt の減少が認められた。  
右図：免疫染色図（緑:F-actin, 青:Dapi）。基底側からの圧によって引き起こされる上皮の重層化は forskolin によって抑制された。



図 4：ヒト肺癌組織の電子顕微鏡図  
左図：光学顕微鏡図（トルイジンブルー染色）。管腔(Apical)に沿って重層化した腫瘍を認めた。  
右図：透過型電子顕微鏡図。重層化した腫瘍の内部に腔形成を認め(cavity)、表面に微絨毛が観察された。Apical:管腔側, N:核。

## 謝辞

本研究に研究助成のご支援を賜りました公益財団法人がん研究振興財団に心より感謝申し上げます。