



The role of Necl-5 in the invasive activity of lung adenocarcinoma

Tane, Shinya

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2014-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第5993号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005993>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

学位論文の内容要旨

The role of Necl-5 in the invasive activity of lung adenocarcinoma

肺腺癌浸潤におけるNecl-5の役割について

田根 慎也, 眞庭 謙昌, 法華 大助, 田内 俊輔, 西尾 渉, 大北 裕, 吉村 雅裕

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

外科学講座呼吸器外科学分野

(指導教員: 眞庭 謙昌 教授)

田根 慎也

(背景) Necl protein family は細胞間接着分子であり、線維芽細胞や上皮細胞において Cadherin とともに adherence junction を形成することが知られている。この Family の一つである Necl-5 は、細胞間接着の制御だけでなく、細胞運動や増殖にも機能する。最近の知見では、Necl-5 は、細胞同士の接触によって down-regulation され、細胞の運動と増殖が抑制されることが示された。一方、Necl-5 は癌細胞で発現が増加することが知られており、Necl-5 の機能異常が周辺の宿主細胞との接触障害を招き、浸潤、転移の一因となる可能性がある。我々はこれまで、肺腺癌切除検体を用いて Necl-5 の免疫組織染色学的な検討を行い、Necl-5 が高発現しているものほど予後が不良であることを明らかにした。更にその発現は、早期癌といわれている adenocarcinoma in situ (AIS) 部位ではなく、癌浸潤部位(invasive component)において特に亢進していた。肺腺癌においては、AIS が間質と相互作用することによって浸潤癌(invasive adenocarcinoma)になるというモデルが考えられており、Necl-5 はこの癌間質相互作用に関わると考え、今回実験的検討を行った。

(方法) 我々が独自に開発した Double-layered collagen gel hemisphere(DL-CGH)法を用いた。本法は、コラーゲンゲルでできた内層と、同じくコラーゲンでできた外層より成り、内層に対象となる細胞を容れ、倒立顕微鏡で経時に観察することにより、内層から外層に向かって浸潤する細胞を視覚的に評価可能である。この内層にヒト肺腺癌細胞株である A549 を容れ単独培養しても、外層への浸潤はみられない。しかし、この A549 とヒト肺線維芽細胞である WI-38 とを共培養すると、まず外層に向かって WI-38 が浸潤し、単独では浸潤できない A549 が、WI-38 に沿ってアメーバ状に姿をかえつつ外層に侵入す

る様子が観察された。この現象は癌と間質の相互作用を見ているものと思われ、本法はこの作用を見る上で有用であると考える。今回、DL-CGH 法を用いて Necl-5 の癌間質相互作用における役割について検討を行うこととした。

(結果) まず、A549 単独、WI-38 単独、A549 と WI-38 を共培養した cell line について各々 Western blotting 法を行い、Necl-5 の発現を調べたところ、A549 単独の cell line で最も Necl-5 が発現していた。A549 と WI-38 を共培養したものでは、Necl-5 の発現亢進は見られなかった。このことから、癌宿主相互作用に関わる Necl-5 は、癌細胞側でより発現が亢進していると考えられた。更に、Necl-5 の下流の蛋白である Focal adhesion kinase (FAK) についても Western blotting 法にて発現を調べたところ、Necl-5 と同様の結果を得た。次に DL-CGH 法を用いて、内層に GEP で蛍光標識した A549 と WI-38 を共培養したもの、RNAi 法で Necl-5 を抑制した GFP-A549 と WI-38 を共培養したものを各々作成し、比較検討を行った。外層に浸潤する GFP-A549 を観察したところ、Necl-5 の発現を抑制した群では、外層に浸潤した GFP-A549 の細胞数が有意に減少しており、浸潤能が抑制されることが示された。この Necl-5 を抑制することによって浸潤能が低下する現象は、細胞遊走能の低下によるものか、増殖能の低下によるものかを明らかにするため、各々について更に検討を行った。WI-38 に沿って外層に移動する GEP-A549 を経時的に観察し、12 時間後の移動距離について比較したところ、Necl-5 を抑制した GFP-A549 では、抑制していない群に比べ、有意に移動距離が減少していた。また、増殖能については、A549 の cell line において、24 時間、48 時間、72 時間後の細胞数をカウントすることとした。A549 の Necl-5 を RNAi 法で抑制した群

では、抑制していない群に比べ、48 時間後、72 時間後の A549 の細胞数が有意に低下しており、増殖能が低下していることが示された。以上の結果より、Necl-5 を抑制した A549 では、細胞遊走能、増殖能がともに抑制された結果、浸潤能が抑制されることが明らかとなった。

(結論) 癌細胞における Necl-5 は、細胞の移動、増殖に関わることが示唆された。更に、DL-CGH 法において、癌細胞の Necl-5 を抑制することで、癌の浸潤能が抑制された。癌間質相互作用において Necl-5 は重要な役割を担っていると考えられ、Necl-5 は肺腺癌における molecular target になり得る。

神戸大学大学院医学(系)研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2384 号	氏名	田根 慎也
論文題目 Title of Dissertation	<p>The role of Necl-5 in the invasive activity of lung adenocarcinoma 肺腺癌浸潤における Necl-5 の役割について</p>		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner	西村 善博	
	副査 Vice-examiner	林 祥剛	
	副査 Vice-examiner	大野 良治	

(要旨は1,000字～2,000字程度)

Necl protein family は細胞間接着分子であり、線維芽細胞や上皮細胞において Cadherin とともに adherence junction を形成することが知られている。この Family の一つである Necl-5 は、細胞間接着の制御だけでなく、細胞運動や増殖にも機能する。最近の知見では、Necl-5 は、細胞同士の接触によって down-regulation され、細胞の運動と増殖が抑制されることが示された。一方、Necl-5 は癌細胞で発現が増加することが知られており、Necl-5 の機能異常が周辺の宿主細胞との接触障害を招き、浸潤、転移の一因となる可能性がある。本研究者らはこれまで、肺腺癌切除検体を用いて Necl-5 の免疫組織染色学的な検討を行い、Necl-5 が高発現しているものほど予後が不良であることを明らかにした。更にその発現は、早期癌といわれている adenocarcinoma in situ (AIS) 部位ではなく、癌浸潤部位 (invasive component)において特に亢進していた。肺腺癌においては、AIS が間質と相互作用することによって浸潤癌(invasive adenocarcinoma)になるというモデルが考えられており、Necl-5 はこの癌間質相互作用に関わると考え、今回実験的検討が行われた。

本研究者らが独自に開発した Double-layered collagen gel hemisphere (DL-CGH) 法を用いた。コラーゲングルでできた内層と同じくコラーゲンでできた外層のうち、内層に対象となる細胞を容れ、倒立顕微鏡で経時に観察する。この方法により、内層から外層に向かって浸潤する細胞を視覚的に評価可能となった。この内層にヒト肺腺癌細胞株である A549 を容れ単独培養しても、外層への浸潤はみられないが、A549 とヒト肺線維芽細胞である WI-38 を共培養すると、まず外層に向かって WI-38 が浸潤し、単独では浸潤できない A549 が WI-38 に沿ってアメーバ状に姿をかえつつ外層に侵入する様子が観察された。この現象は癌と間質の相互作用を見ているものと思われ、本法はこの作用を見る上で有用であると考えられる。今回の研究では、DL-CGH 法を用いて Necl-5 の癌間質相互作用における役割について検討が行われた。

まず、A549 単独、WI-38 単独、A549 と WI-38 を共培養した cell line について各々 Western blotting 法を行い、Necl-5 の発現を検討したところ、A549 単独の cell line で最も Necl-5 が発現していた。A549 と WI-38 を共培養したものでは、Necl-5 の発現亢進は見られなかった。このことから、癌宿主相互作用に関わる Necl-5 は、癌細胞側でより発現が亢進していると考えられた。更に、Necl-5 の下流の蛋白である Focal adhesion kinase (FAK) についても Western blotting 法にて発現を検討したところ、Necl-5 と同様の結果が得られた。次に DL-CGH 法を用いて、内層に GEP で蛍光標識した A549 と WI-38 を共培養したもの、RNAi 法で Necl-5 を抑制した GFP-A549 と WI-38 を共培養したものを各々作成し、比較検討を行った。外層に浸潤する GFP-A549 を観察したところ、Necl-5 の発現を抑制した群では、外層に浸潤した GFP-A549 の細胞数が有意に減少しており、浸潤能が抑制されることが示された。この Necl-5 を抑制することによって浸潤能が低下する現象は、細胞遊走能の低下によるものか、増殖能の低下によるものかを明らかにするため、各々

について更に検討を行った。WI-38 に沿って外層に移動する GEP-A549 を経時的に観察し、12 時間後の移動距離について比較したところ、Necl-5 を抑制した GFP-A549 では、抑制していない群に比べ、有意に移動距離が減少していた。また、増殖能については、A549 の cell line において、24 時間、48 時間、72 時間後の細胞数をカウントし検討した。A549 の Necl-5 を RNAi 法で抑制した群では、抑制していない群に比べ、48 時間後、72 時間後の A549 の細胞数が有意に低下しており、増殖能が低下していることが示された。以上の結果より、Necl-5 を抑制した A549 では、細胞遊走能、増殖能とともに抑制された結果、浸潤能が抑制されることが明らかとなった。

本研究により、癌細胞における Necl-5 は、細胞の移動、増殖に関わることが示された。また、癌細胞の Necl-5 を抑制することで、癌の浸潤能が抑制された。癌間質相互作用における Necl-5 の重要性はこれまで明らかでなかったが、本研究により、Necl-5 は肺腺癌における molecular target になり得る重要な知見を得てものとして価値ある業績と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。