

## 肺を標的とする中・短期発癌モデルの開発に関する研究

研究分担者 横平 政直 香川大学医学部 腫瘍病理学 助教

### 研究要旨

本研究はマウスおよびラットの肺腫瘍モデルにおける早期病変について、将来の腫瘍化の推定が可能なマーカーの同定を目的とした。腺系腫瘍は、Pulmonary Surfactant Protein C (SP-C)抗体陽性の型肺胞上皮由来、扁平上皮異型細胞はClara cell secretory protein (CCSP)抗体陽性のクララ細胞由来であることが判明した。また、肺早期病変である過形成病変において、Napsin A の肺胞壁内細胞への高発現の有無により、腫瘍化の判別が可能であることが明らかになった。肺がんの早期病変における組織型および潜在腫瘍化の判別に有用と期待される。Napsin A の発現は肺サーファクタンとプロテイン-Bの発現に若干相同性を示した。

### A. 研究目的

ラットの肺腫瘍誘発物質としては、N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (DHPN) (2週間の飲水投与)が知られている。しかし、肺腫瘍発生までには約30週間と長期を要する。マウスでは、4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)の腹腔内投与による肺腫瘍モデルが存在するが、これも肺腫瘍発生までに最短で12週間を要する。

これらのモデルにおいて、早期に過形成病変が出現するが、将来、軽快するものと悪性化するものが混在している。本研究では肺発癌の早期病変における将来の悪性化を予想することが可能なマーカーの検索を目的とした。このマーカーにより、物質の発癌修飾作用についての評価をより短期間で行うことができると期待される。さらに、早期病変で起こる悪性化のメカニズムについて、新たな病理組織学的知見を得られる可能性がある。

実験1として、肺増殖性病変の起源に着目し、クララ細胞のマーカーであるClara cell secretory protein (CCSP)と型肺胞上皮細胞のマーカーであるPulmonary Surfactant Protein C (SP-C)の発現を、NNK誘発マウス肺腫瘍(腺系)、N-nitrosotris-(2-chloroethyl) urea (NTCU)腹腔内投与により誘発された肺扁平上皮異形成、およびDHPN誘発ラット肺腫瘍(腺系)について検討を行った。

実験2では肺の早期腫瘍性病変の同定に有用なマーカーの候補についての検索を目的とした。NNKはマウスには腫瘍を誘発する代表的物質である。しかし、F344雄ラットに投与した時には、早期に過形成を誘発するが、その後、徐々に病変は消失してしまう。一方、DHPNにより誘発された過形成は経時的に腺腫、腺癌へ進展する。DHPN投与により肺に生じた代表的な腫瘍性病変について、複数の抗体を検討し、候補となるマーカーの検索を行った。

検討した複数の抗体はCyclin D1、Napsin A、p27、Thyroid transcription factor 1 (TTF-1)、Ki-67、Cytokeratin (CK) 7、CK 20、CK 34 E12、CK 5/6、surfactant proteins-A (SP-A)、p53、Endothelial growth factor receptor (EGF-R)、estrogen receptor (ER)、progesterone receptor (PR)、carcinoembryonic antigen1 (CEA)、p16、proliferating cell nuclear antigen (PCNA)、chromogranin Aおよびsynaptophysinの19種類である。

実験3では実験2の結果から候補として絞ったマーカーについて、NNK誘発過形成(将来消失する過形成)およびDHPN誘発過形成(将来腫瘍化する過形成)に対して比較検討を行った。特に、将来消失する過形成病変と腫瘍化する過形成病変で染色性に相違が認められるかという点に着目した。なお、実験2から絞られた候補マーカーは、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1およびERの5種類である。

実験4は、ラット肺の炎症性変化におけるNapsin Aの発現を確認するための実験を行った。各種微粒子2mgを気管内投与後、28日目のラット肺を用いて、Napsin Aの発現を検討した。炎症を誘発する微粒子としては、quartz、NiOおよびCuOの3種類を用いた。

さらに実験5として、Napsin Aは肺サーファクタンとBの成熟に関与していることから、その発現機序解明を目的として、サーファクタンプロテイン(SP)-A、B、C、Dについて染色を行い、napsin Aの発現と比較検討を行った。用いた材料はDHPN誘発F344雄ラット肺腫瘍(腺系腫瘍、30週)及びquartz誘発F344雄ラット肺(炎症性変化、28日目)の固定標本である。

## B . 研究方法

(実験1) NNK 誘発 A/J 雌マウス肺腫瘍(腺系腫瘍、16週)およびN-nitroso-tris-chloroethylurea (NTCU) 誘発 A/J 雌マウス肺扁平上皮異形成(20週)、DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腫瘍(腺系腫瘍、30週)の固定標本を用い、SP-C(sc-1379, Santa Cruz, CA, USA, 1:50) および Clara cell secretory protein (CCSP, CC10) (sc-9773, Santa Cruz, CA, USA, 1:2000) について二重免疫染色を行い評価した。

(実験2) DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腫瘍(腺系腫瘍、30週)の固定標本を用い、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1、Ki-67、Cytokeratin (CK) 7、CK 20、CK 34 E12、CK 5/6、SP-A、p53、EGF-R、ER、PR、CEA、p16、PCNA、chromogranin A および synaptophysin について免疫染色を行い評価した。用いた抗体の情報および希釈倍率等に関しては表1に示す。

(実験3) DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腫瘍(過形成、腺系腫瘍、12週および30週)およびNNK 誘発 F344 雄ラット肺過形成病変(12週および30週、NNK 単独群30週では病巣がほぼ見られないので、NNK 投与後に2mg quartz 微粒子/0.2ml 生理的食塩水の懸濁液を気管内投与した NNK+quartz 群について検討した)の固定標本を用い、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1 および ER について免疫染色を行い評価した。

(実験4) 微粒子の気管内投与後28日後のF344 雄ラット肺の固定標本を用い、Napsin A について免疫染色を行い評価した。微粒子は quartz、NiO および CuO の3種類であり、いずれも2mg/0.2ml 生食の用量で被験微粒子を気管内投与した。

(実験5) DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腫瘍(腺系腫瘍、30週)及び quartz 誘発 F344 雄ラット肺(炎症性変化、28日目)の固定標本を用いて、SP-A、B、C、D についてそれぞれ免疫染色を行った。用いた抗体の情報は表2に示す。

(倫理面への配慮)

いずれの実験も動物実験に先立ち、香川大学、総合生命科学研究センター、動物実験部門の動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、その許可を得た後に同実験部門において香川大学動物実験規程に従って飼育管理した。

## C . 研究結果

(実験1) NNK 誘発 A/J 雌マウス肺および DHPN 誘発 F344 雄ラット肺ではいずれも肺胞上皮過形成病変、腺腫、腺癌が見られた。DHPN 誘発 F344 雄ラット肺では腺癌の結節の一部に扁平上皮化生が見られた。マウスおよびラットともに、肺胞上皮過形成性病変、腺腫、腺癌のいずれも SP-C に強く陽性を示した(図1, 図3)。肺胞上皮過形成性病変および腺系腫瘍部に CCSP の発現は見られなかった。

一方、NTCU 誘発 A/J 雌マウス扁平上皮異形成(図2) および、DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腺癌中の扁平上皮化生成分(図3)ではいずれも CCSP に陽性を示していた。

(実験2) DHPN 誘発の肺過形成病変および腺腫に関して、良好に染色された抗体は、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1、ER、CK 34 E12 および CK 5/6 の7種類であった(図4)。このうち、CK 34 E12 および CK 5/6 に関しては扁平上皮化生を示す部分に陽性像を示していた。しかし、これらは、過形成病変の鑑別には適さないと判断した。以上より、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1 および ER が、さらに詳細な検討を行うべきマーカーの候補として挙げた。

(実験3) NNK および DHPN 誘発 F344 雄ラット肺病変に対して、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1、ER のいずれも病変部が良好に染色された(図5)。

一方で、DHPN 誘発過形成病変と NNK 誘発過形成病変を比較すると、その発現に差が見られたのは Napsin A および TTF-1 であった。いずれも、DHPN 誘発過形成病変においては、肺胞壁を構成する細胞に強く発現を示したが、NNK 誘発過形成性病変では肺胞壁の細胞の発現は乏しく、肺胞内マクロファージ等の肺胞内の成分では発現が見られた。また、Napsin A は TTF-1 と比べて染色性が良好であった。以上から、Napsin A のラットの肺胞壁内細胞への高発現は malignant potential を示唆すると考えられた。

実験3におけるその他の所見は以下の通りである。Napsin A は腫瘍において、悪性度が高いと発現が低下していた。一方で、ER は悪性度が上昇すると発現が上昇する傾向が見られた。TTF-1 は悪性度の違いによる発現の変化は見られなかった。

(実験4) 炎症により発生する過形成病変は、発癌物質によって誘発される過形成と比べて腫瘍化する可能性は低いと推測される。この炎症性過形成について、Napsin A の肺胞壁内細胞への発現が乏しいのか検討を行った。Quartz、NiO および CuO を F344 雄ラットに気管内投与すると、28日目には肺に炎症性過形成病変が認められる。Napsin A はこれらの部に実験3での NNK 誘発過形成性病変とほぼ同様の染色性を示した(図6)。すなわち、肺胞壁内細胞への発現は乏しく、肺胞内マクロファージ等の肺胞内成分への高発現が認められた。

(実験5) SP-A、B、C、D の染色病理組織像とそのまとめをそれぞれ図7および表3に示す。SP-A と D は比較的類似した染色性を示した。炎症における肺胞内粘液に強く発現を認めた(SP-A、D は肺胞免疫に関与している)。肺増殖性病変においては、最も SP-C の発現が強く認められた。臨床上、SP-A はヒトでの肺癌血清マーカーとして利用されているが、今回のラットにおける増殖性病変での発現は低かった。Napsin A の発現パターンは SP-B と若干の類似性を示したが、SP-A、C、D のいずれとも完全な一致は見られなかった。

## (考察)

マウスおよびラットにおいて、発癌物質により誘発される肺腫瘍はほとんどが肺胞上皮の過形成を経た腺系腫瘍である。実験1によって、この起源が型肺胞上皮であることが示唆された。今回、動物における肺扁平上皮癌の材料の入手が困難であったために扁平上皮癌についての検討は行うことが出来なかった。しかし、今回、NTCU誘発の扁平上皮異形成はクララ細胞起源であることが示唆された。NTCUによる肺扁平上皮癌の発生はすでに報告されており、この異形成病変は扁平上皮癌の早期病変と考えられる。

以上より、SP-Cは型肺胞上皮由来の腺系腫瘍、CCSPはクララ細胞由来の扁平上皮系腫瘍のマーカーである可能性が示唆された。さらに、肺における過形成病変および腺腫、腺癌の本態も型肺胞上皮の増殖であることが明らかになった。

実験2, 3の結果、Napsin Aは型肺胞上皮で発現し、染色性も最も良好であった。線維化や炎症細胞浸潤による肺胞壁の増大は型肺胞上皮の増殖に起因しない変化と考えられる。今回、増殖性変化を示唆するマーカー(細胞増殖、細胞周期)の検討も行ったが、炎症性過形成病変およびDHPNによる腫瘍性の過形成性病変のいずれにも類似した発現を示し、過形成病変の鑑別には有効性が乏しいと考えられた。

実験4では、炎症に起因する過形成病変について、NNK誘発過形成病変と同様の染色性を示すことを確認した。NNKはマウスでは肺発がん物質として知られている。F344雄ラットでは、NNKにより発生した過形成病変が経時的に消失するとはいえ、潜在的に腫瘍化する可能性がないのかという点について否定出来ない。実験4の結果で、NNK誘発過形成病変と炎症性過形成が類似した染色性を示したことは、今回認められた過形成病変が可逆性であり、潜在腫瘍化能については乏しいという可能性を示唆する。

Napsin AはペプチダーゼA1ファミリーに属するペプシン様アスパラギン酸プロテアーゼで、肺サーファクタントBの成熟に関与していることから実験5を行った。肺サーファクタント(SP)は肺胞II型細胞で合成され、肺胞腔に分泌されて肺胞の全表面を覆う脂質-蛋白質複合体(リポ蛋白質)であり、表面張力を維持することにより肺虚脱を防ぐ作用や、気道から進入してくる病原体に対する自然免疫防御作用を有している。SPIは、SP-A, B, C, Dが知られており、SP-BとSP-Cは疎水性が強く、SP-AとSP-Dは親水性である。SP-AとSP-Dは構造上、非常に相同性が高く、SP-AやSP-Dが肺胞免疫に関与しているとされる。今回の検討では、Napsin AとSPには類似した染色性を示すものの、完全に一致するSP subtypeは見られなかった。

今回の実験結果からの過形成病変の捉え方と鑑別を図8にまとめた。正常肺胞上皮細胞は発癌物質や炎症性化合物の影響により、いわゆる肺胞上皮過形成を生じる。この肺胞上皮過形成には、可逆性のものと非可逆性のものがあると推測される。可逆性の過形成は炎症に伴う、「炎症性可逆性過形成」といえる。非可逆性の過形成は将来、腺腫、腺癌と腫瘍化していく可能性が高い、「潜在腫瘍性過形成」といえる。これらの鑑別にNapsin Aは有効であり、肺胞上皮を構成する細胞の陽性率が高い場合は潜在腫瘍性過形成である可能性が高いと言える。

以上、Napsin Aは動物肺発がんモデルなどで早期に発生する過形成病変が将来腫瘍化する可能性を判別するマーカーとして有用であることが明らかとなった。肺に過形成病変が出現した際に、その将来的な影響を確認するためにも肺胞壁内細胞のNapsin Aの高発現を確認することは重要である。また、化学物質等の肺へのがん原性等をスクリーニング評価する際に、肺胞壁内細胞のNapsin A高発現を示す過形成病変を指標とすることも有用と考えられる。今後は、DHPNのみでなく、多種の発癌物質による誘発過形成病変に対して、napsin Aの有効性について検証予定である。

## (結論)

ラット及びマウスに誘発される腺系腫瘍については、SP-C陽性の型肺胞上皮由来、マウスの扁平上皮異型細胞はCCSP陽性のクララ細胞由来であることが明らかとなった。Napsin Aは、肺に発生する過形成病変の、将来腫瘍化する可能性についての判別に有用であることが判明した。また、Napsin Aの発現は肺サーファクタントとプロテイン-Bの発現に若干相同性を示した。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

Yokohira M, Kishi S, Yamakawa K, Nakano Y, Ninomiya F, Kinouch S, Tanizawa J, Saoo K, Imaida K., Napsin A is possibly useful marker to predict the tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in F344 rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 66: 117-123, 2014.