

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19420

研究課題名(和文) Sphere形成癌幹細胞様分画の肺癌多臓器転移における機能の検討

研究課題名(英文) The role of cancer stem cell-like sphere forming cells in multi-organ metastasis of lung cancer

研究代表者

荻野 広和 (OGINO, Hirokazu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：20745294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、癌幹細胞の転移形成における機能を解明することを目的とし、以下の検討を行った。

まず2種類のヒト肺癌細胞株をそれぞれ特殊環境下で培養することでsphere形成癌幹細胞様分画を単離し、これらは幹細胞マーカーを高発現することを確認した。次にこれらをヒト肺癌多臓器転移モデルマウスに接種したところ肝転移形成が大幅に促進された。親株と癌幹細胞様分画の遺伝子発現解析から複数の肝転移促進候補遺伝子が抽出され、今回遺伝子Xに着目した。RNAiを用いて癌幹細胞様分画の遺伝子X発現を抑制したところ、肝転移形成が抑制されることが確認され、遺伝子Xが肝特異的な転移形成に重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the roles of cancer stem cells (CSCs) in forming multiple organ metastasis in mice. First, we isolated the CSC-like populations from two human lung cancer cell lines by culturing in low-attachment and low-nutrient condition, and confirmed these populations showed higher gene expressions of stem cell markers. Next, we found the number of liver metastasis was increased in mice inoculated with CSC-like populations in multiple organ metastasis model. By analyzing the gene expressions of CSC-like populations and parental cells, several candidate genes were picked-up that might regulate liver metastasis. In this study, we focused on gene X, and confirmed that the specific inhibition of gene X of CSC-like populations by RNAi resulted in the suppression of liver metastasis in mice. These results indicate that gene X might regulate the production of liver specific metastasis, therefore it might be a good therapeutic target to control the liver metastasis.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：肝転移 癌幹細胞 肺癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性の呼吸器悪性疾患である肺癌は予後不良の疾患で、その分子機構の解明および新規治療法の開発が急務である。肺癌治療では遠隔臓器への転移が患者の予後やQOLを悪化させる主な要因となることから、これまでに癌転移克服を目指して様々な検討がなされてきた。

我々の研究グループは、これまでに重症免疫不全 (SCID) マウスの NK 細胞活性を除去することにより、臨床における転移様式を再現したヒト肺癌の多臓器転移モデルを確立し(表 1)、これまで同モデルにおいて遠隔転移の分子メカニズムの解析や、血管新生因子を標的とした新規治療法開発を行ってきた。本モデルは実地臨床における肺癌転移様式をよく反映しており、今後同モデルを用いることで臨床に則した様々な基礎的研究が可能であると考えている。

表 1: NK 細胞除去 SCID マウスにおける各種肺癌細胞株の転移様式

Histology	Cell line	Metastasis to				
		Bone	Lung	Liver	Kidney	LN
Small cell	H69	-	-	++	+	+++
	H69/VP	-	-	++	+	+++
	NCI-H1048	++	-	++	+++	+++
	SBC-3	-	-	++	+	++
	SBC-5	+++	+	++	+	+
Adeno Ca	ACCLC-319	+	+++	+	+	+
	PC14PE6	-	+++	+	+	-
	A549	-	++	-	-	-
Squamous cell Ca	RERF-LC-A1	-	-	++	+	-

(Yano S et al. 1996, Ogino H et al. 2008)

(2) 近年、腫瘍細胞集団の中に幹細胞の性質を持ち、腫瘍進展の中心となる「癌幹細胞」の存在が血液腫瘍のみならず固形癌においても報告されている。癌幹細胞は、腫瘍組織再生能が高く、抗癌剤や放射線治療に対しても高い抵抗性をもつことが知られているが、肺癌多臓器転移における癌幹細胞の機能に関しては未だ解明されていない。

最近我々は、ヒト肺癌細胞株を低接着培養プレートを用いて特殊環境下で培養することにより、sphere 形成能を有する細胞分画の単離に成功しており、今回これらの癌幹細胞様分画のヒト肺癌多臓器転移モデルにおける機能を解析することで、癌幹細胞の肺癌遠隔転移における役割の解明および新規治療法の開発に寄与できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では肺癌多臓器転移における癌幹細胞様分画の機能を解析し、その作用機序の解明およびそれらを標的とした新規治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

研究には 2 種類のヒト肺癌細胞株 (SBC-5、LC-319/bone2) を使用した。これらの細胞を低接着・低栄養状態で 2 週間培養することで sphere 形成癌幹細胞様分画を単離した。単離された癌幹細胞様分画の幹細胞マーカーの発現について RT-PCR を用いて検討した。次に、これらヒト肺癌細胞株より単離した sphere 形成癌幹細胞様分画を NK 細胞除去 SCID マウスに接種し、親株と比較することで多臓器転移促進能の有無を評価した。また親株と癌幹細胞様分画の発現遺伝子の相違について microarray を用いて網羅的に解析し、転移形成に影響を及ぼす遺伝子群を同定した。次にこれらの遺伝子群の中から遺伝子 X に注目し、RNAi による発現抑制株を作成し、多臓器転移形成に及ぼす影響を解析した。

4. 研究成果

(1) いずれの株においても、*in vitro* において低接着・低栄養状態で培養することにより、sphere を形成する癌幹細胞様分画が単離された(図 1)。次にこれらの癌幹細胞様分画における幹細胞マーカーの発現を RT-PCR を用いて検討したところ、NANOG、CXCR4 といった幹細胞マーカーが、親株と比較し高発現していることを確認した。*in vitro* における増殖能について MTT assay にて検討したが、親株と癌幹細胞様分画の間に差は認めなかった(図 2)。

図 1: ヒト肺癌細胞株における sphere 形成

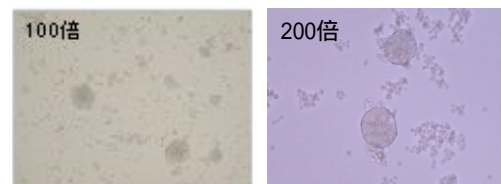
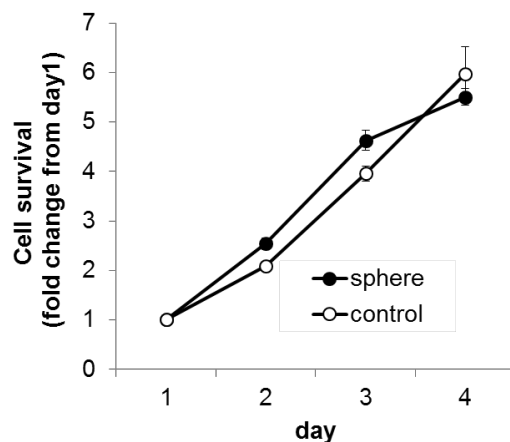


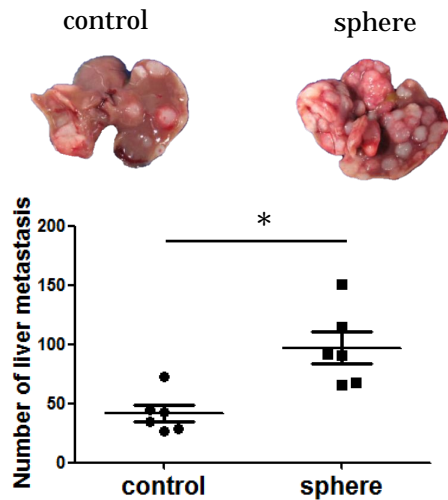
図 2: *in vitro* における増殖能



(2) 次に親株および癌幹細胞様分画を NK 細胞除去 SCID マウスの尾静脈より接種したところ、いずれの細胞株においても癌幹細胞様分画接種群において肝転移の形成が有意に亢

進することが判明した(図 3)。一方肺転移に関しては癌幹細胞様分画接種群において有意に減少していた。

図 3: 癌幹細胞様分画の肝転移促進効果



(3)次に癌幹細胞様分画における肝転移促進機序を解明するため、癌幹細胞様分画とその親株の発現遺伝子の差異についてcDNA マイクロアレイ法を用いて検討したところ、複数の肝転移促進候補遺伝子が抽出された(図 4)。それらの中で本研究では遺伝子 X に注目し以下の解析を行った。

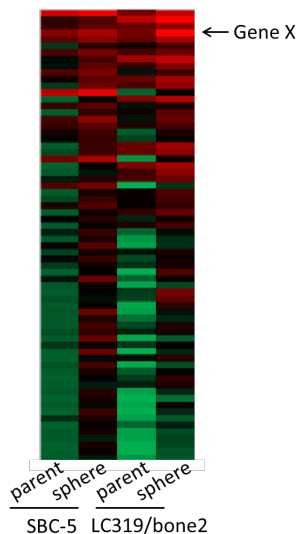
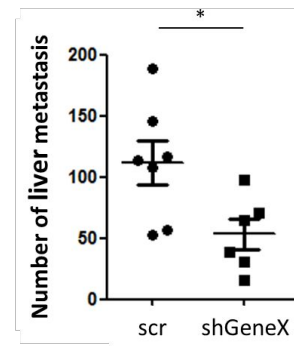


図 4: 肝転移関連因子の網羅的解析

(4)遺伝子 X の肝転移形成に及ぼす影響を解析するため、shRNA ベクターを用いて遺伝子 X の恒常的な発現抑制株を作成した。具体的には、SBC-5 に遺伝子 X に対する shRNA 発現ベクターを導入し発現抑制株を樹立した。コントロールには scramble 導入株を用いた。次にこれらから sphere 形成癌幹細胞様分画を単離し、NK 細胞除去 SCID マウスへ接種したところ、遺伝子 X 発現抑制群において肝転移形成が低下した(図 5)。

図 5: 遺伝子 X 発現抑制による肝転移形成抑制効果



これらの結果は、遺伝子 X が肝特異的な転移形成に寄与し、新規治療標的分子となり得る可能性を示唆していると考えられた。

### 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 4 件)

後東久嗣, 荻野広和, 三橋惇志, 西岡安彦. 小細胞肺癌における肝転移の位置づけとがん幹細胞様細胞の役割. 第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会. 米子コンベンションセンター(鳥取県・米子市). 2016 年 7 月 22 日.

荻野広和, 三橋惇志, 後東久嗣, 西條敦郎, 佐藤正大, 坂口暁, 手塚敏史, 倉本卓哉, 田畑祥, 上原久典, 埴淵昌毅, 西岡安彦. Sphere 形成癌幹細胞様分画のヒト肺癌多臓器転移モデルマウスにおける役割についての解析. 第 74 回日本癌学会学術・総会. 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市). 2015 年 10 月 10 日.

荻野広和, 後東久嗣, 三橋惇志, 西條敦郎, 佐藤正大, 柿内聡司, 埴淵昌毅, 上原久典, 西岡安彦. Sphere 形成癌幹細胞様分画の肺癌多臓器転移における役割についての解析. 第 24 回日本がん転移学会学術集会・総会. シティプラザ大阪(大阪府・大阪市). 2015 年 7 月 23 日.

Hirokazu Ogino, Atsushi Mitsuhashi, Hisatsugu Goto, Atsuro Saijo, Takuya Kuramoto, Sho Tabata, Hisanori Uehara, Soji Kakiuchi, Masaki Hanibuchi, Yasuhiko Nishioka. Characterization of Sphere-Forming Stem-Like Population of Lung Cancer Cell Line in Multi-Organ Metastasis Model. ATS 2015 International Conference. Denver, CO, USA. 2015 年 5 月 19 日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荻野 広和 (OGINO, Hirokazu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：20745294