様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　６　月　２４　日現在

機関番号：　８１３０３
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2015～2016
課題番号：　１５Ｋ１９４３７

研究課題名（和文）CD271を発現する肺扁平上皮がんの解析と治療戦略への応用

研究課題名（英文）Analysis of CD271-positive NSCLC as a potential therapeutic target

研究代表者
小齋　仁美（KOSAI, HITOMI）

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）・がん先進治療開発研究部・共同研究員

研究者番号：７０７２８２０３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：肺癌幹細胞性の発揮を関わるCD271の解析を行った。CD271をノックダウンすると腫瘍形成が著明に抑制された。同時に細胞周期がG0にて停止すること、MAPK(Erk)シグナルが減少することが示された。G0アレスト誘導には、CDKN1Cの発現上昇が重要であることが示された。実際にCDKN1のノックダウンによりG0アレストが部分解除された。一方、CD271ノックダウンは細胞遊走を著明に抑制したが、この抑制はエフェクター分子RhoAによることが示唆された。CD271の下流シグナルは複数存在し、細胞増殖と細胞遊走を別個に制御していた。CD271は肺癌治療の標的となりうる分子であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：CD271 has been shown to be a cancer stem cell marker of squamous cell carcinoma. To determine a potential role of CD271 in squamous cell carcinoma of the lung, CD271 was knock-downed by shRNA. CD271 mRNA knockdown inhibited both cell proliferation and migration. p42/44Erk inhibition as well as RhoA inhibition inhibited these malignant phenotypes. These malignant potential was delivered from the intra-cytoplasmic region of CD271. Together, CD271 is a potential target for squamous cell carcinoma type NSCLC therapy.

研究分野：　呼吸器腫瘍学

キーワード：　肺癌幹細胞

１．研究開始当初の背景

(1) 非小細胞肺がん　(NSCLC)は、世界的に発症が多い悪性腫瘍であり、致命率も高い。自覚症状に乏しいことも多く、進行がんとして発見される症例も多い。転移や再発が多く、放射線療法、化学療法を施行しても予後不良例が多い。扁平上皮がんは明確なドライバー変異がないため、治療戦略上検討しなければいけない点が多い。外科的切除以外には有効な分子標的薬や細胞障害性薬剤がほとんど存在しないため、新規治療薬の開発が急務となっている。

(2) 近年の研究において「がん幹細胞」が注目されている。腫瘍は単一の細胞集団ではなく、幹細胞性を有する細胞（CSC）が造腫瘍能を持つ。大多数の非がん幹細胞(non-CSC)は、抗がん剤および放射線に感受性を有する。CSC は、①自己複製能、②多分化能、③抗がん剤・放射線抵抗性、を３大主徴とし、治療抵抗性の元凶であるとされる。実際に、乳がんや脳腫瘍などで CSC の存在が相次いだ。NSCLC においてもがん幹細胞理論はあてはまると考えられる。CSC をターゲットとした治療は、次世代の先進的治療法として期待を集めている。

(3) がん患者由来扁平上皮癌組織を用いてセルソーターによる癌亜集団の解析を開始した。CD44,CD90 等の癌幹細胞マーカーに着目して細胞を分取し、超免疫不全マウス（NOG マウス）に移植した（腫瘍形成能スクリーニング）。その結果、CD271 ががん幹細胞マーカーであることを世界に先駆けて見出した。がん幹細胞理論では、がん幹細胞は悪性形質の本態と捉えられている。すなわち、①非対称分裂による多様性獲得、②浸潤・転移能の獲得、③薬剤耐性と治療抵抗性の獲得、という３つの性質の根源はすべて癌幹細胞に帰着すると言い換えることができる。

(4) CD271 は p75 neurotorophine receptor (p75NTR)とも呼ばれ、神経成長因子(NGF)の受容体である。in vitro で細胞死と細胞生存という、一見して正反対の生理活性を有する報告がある。先行研究では、悪性黒色腫の幹細胞マーカーとしての報告があるものの、NSCLC において、CD271 と「がん幹細胞」に関する解析はほとんどなされていなかった。

２．研究の目的

(1) CD271 ががん幹細胞マーカー足り得るかを検証するため、扁平上皮がんの「担がんマウス」解析において CD271 陽性細胞と陰性細胞を NOG マウスへ異種移植実験を事前に行った。結果、CD271 陽性細胞は有意にマウスへの腫瘍形成能を有した。加えて、免疫組織染色を行った結果、CD271 はがん辺縁部に染色が確認された。以上から CD271 はがん幹細胞マーカーである可能性が高いと考えられる。CD271 と肺扁平上皮癌幹細胞との関連を明らかにするため、以下の３点を具体的目標とする。

(2) 造腫瘍形能に必要な CD271 の機能ドメイン解析

扁平上癌細胞株を使って、CD271 が幹細胞性の発揮するためのドメインを同定し、機能ドメイン阻害による治療効果の可能性について明らかにする。

(3) CD271 の標的遺伝子は何か？−網羅的解析−

がん幹細胞の特性として Dormancy の獲得、多分化能の獲得など複数が報告されている。そこで、CD271 ががん幹細胞特性に与える影響を調べる。悪性形質発現や生体防御からの逃避に着目してその意義を明らかにする

(4) CD271 シグナル伝達に必要な分子は？

肺がん幹細胞エフェクター分子の同定

CD271 のシグナル伝達に関与する分子として TRAF6 が報告されているが、NSCLC の腫瘍形成に関わる分子は不明。そこで、CD271 を高発現させた細胞およびリコンビナント化した CD271 を用いて、CD271 細胞内ドメイン会合タンパク質を解明する。

(5) 最終的に、CD271 シグナル伝達阻害剤等を用いて in vitro および in vivo 両面においてNSCLC 治療モデルを構築することを目指す。本解析により、CD271 シグナルを切り口とした肺がん幹細胞のバイオロジーを展開し、CD271 をターゲットとした治療法開発の基盤構築に挑む。

３．研究の方法

(1) がん細胞株に対し、レトロウイルスにより野生型 CD271(WT)、細胞内領域欠損型 CD271(ΔC)、細胞内ドメイン欠損型 CD271(ΔDD)を発現させ、タンパク質の強制発現株を作成する。細胞増殖と腫瘍形成能を調べる。

(2) がん幹細胞の特性としては、Dormancy の獲得、多分化能の獲得など複数が報告されている。そこで、CD271 ががん幹細胞特性に与える影響を調べる。担がんマウスの腫瘍について、CD271 陽性分画及び陰性分画を FACS Aria を用いて分取し、RNA を抽出しマイクロアレイを行う。変動分子群について、gene

ontology、GSEA を用いたパスウェイの網羅的な解析を行う。

(3) CD271 シグナル伝達に必要な分子
肺がん幹細胞エフェクター分子の同定
CD271 のシグナル伝達に関与する分子として TRAF6 が報告されているが、NSCLC の腫瘍形成に関わる分子は不明。そこで、CD271 を高発現させた A549 細胞を用いて、CD271 細胞内ドメイン会合タンパク質を解明する。リコンビナント CD271(Strept-His-tag)を細胞抽出物と混合し Pull Down アッセイを行う。SDS-PAGE にてタンパク質を分離後、TOF-MS 解析を行い、新規の CD271 細胞内ドメインの会合タンパク質を決定する。

(4) 新規治療標的としての CD271
新規治療標的となりうる CD271 の阻害によって、がん幹細胞の性質を阻害できるかを in vitro で検討する。siRNA、TAT-PEP(RhoA との共役阻害)を行う。がん幹細胞性の評価は、細胞増殖および浸潤能評価を行う。後者はスクラッチアッセイおよびマトリゲルチャンバーを用いた invasion assay を実施する。

４．研究成果
(1) 腫瘍形成に関わる細胞内ドメインの同定
細胞内ドメインを全部欠損したΔC 変異体を扁平上皮癌細胞株に導入した。dΔC 変異体では細胞増殖の低下を認めた。一方、ΔDD では増殖抑制は著明に減弱した。したがって、細胞増殖には CD271 の細胞質内領域が必要であるが、その責任領域は複数存在することが示唆された。

(2) CD271 シグナル標的遺伝子の同定
CD271 陽性細胞と陰性細胞を FACS ソーターにて分取し、発現遺伝子の網羅的解析を実施した。その結果、細胞周期関連遺伝子である CDKN1C が得られた。CD271 陽性細胞では CDKN1C の発現が制御されていることから、ひとつのエフェクターとして機能発揮していることが示唆された。

(3) CD271 ノックダウンは腫瘍増殖を著明に低下させる
shRNA 発現ベクターを導入することによって HPCM2 株の CD271 を安定的にノックダウンすることに成功した。この細胞は著明に細胞増殖が抑制されており、シグナル伝達系を解析したところ、MAPK(ERKp42/44)が減少していた。ERK 阻害薬 U0126 を添加したところ、細胞増殖は著明に抑制された。したがって ERK 経路は CD271 抑制による増殖阻害に関連する可能性が高いことが判明した。

(4) CD271 は細胞周期を停止させ G0 アレストを誘導する
CD271 ノックダウンにより細胞周期が G0 にアレストした。さらに、CDKN1C が発現上昇が G0 アレストに重要な働きをしていた。CDKN1 のノックダウンを更に行ったところ、G0 アレストが部分的に解除された。したがって、CD271 の下流シグナルは複数存在し、細胞増殖と細胞遊走を別個に制御していることが示唆された。この事実は CD271 が癌治療の標的であることを強く示唆していると考えられた。

(5)CD271 シグナルを阻害すると細胞遊走が低下する
CD271 ノックダウンを行った扁平上皮癌細胞では細胞遊走が著明に抑制された。同時に、浸潤能も明らかに低下した。一方、RhoA に対する阻害を行ったところ細胞遊走が抑制された。したがって、RhoA 阻害は CD271 による細胞遊走に関与する可能性が高いと考えられた。

(6) CD271 会合分子の同定
CD271 の細胞質内領域についてリコンビナント蛋白を調整した。これを用いて細胞可溶化液から会合分子を精製し SDS-PAGE に展開した。蛋白を可視化し、特異的バンドを切りだして TOF-MS 法により同定した。その結果、Vps 蛋白等の複数の会合候補分子が捕捉された。これらの中には細胞内輸送に関連する因子も含まれていたため、CD271 の調節には輸送による空間的調節が存在することが示唆された。

(7) 以上の結果から、CD271 の下流シグナルは複数存在し、細胞増殖と細胞遊走を別個に制御していることが明らかとなった。CD271 の抑制は著明な細胞増殖低下と細胞周期停止を誘導することから、有望な扁平上皮肺癌の治療標的となりうることが明らかとなった。

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２件）
①福島　誠，長島隆一，小齋仁美，小山内七重，本橋ほづみ，山本雅之，田中伸幸
Nrf2 は NLRP3 インフラマソーム活性化を介して黄色ブドウ球菌感染を制御する.
第６９回日本細菌学会東北支部総会 2016 年

８月１８-１９日　青森県十和田市

②長島隆一，福島　誠，　小齋仁美，小山内七重，本橋ほづみ，山本雅之，田中伸幸
Nrf2 による 2 型自然リンパ球(ILC2)制御の可能性.
第６９回日本細菌学会東北支部総会 2016 年８月１８-１９日　青森県十和田市

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1) 小齋　仁美（KOSAI, Hitomi）
　地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター　(研究所)・がん先進治療開発研究部・共同研究員
研究者番号：70728203

(2)研究分担者
（　　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
（　　　）

研究者番号：

(4) 田中　伸幸（TANAKA, Nobuyuki）
地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター　(研究所)・がん先進治療開発研究部・部長
研究者番号：60280872