

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10787

研究課題名(和文) 非小細胞肺癌CSC特異マーカーの同定及び肺癌根治療法の開発

研究課題名(英文) Identification of CSC-specific markers for non-small cell lung cancer and development of lung cancer root therapy

研究代表者

劉 大革 (Liu, Dage)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：30314941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： 進行期肺癌の治療成績は未だ不良であり，進行期肺癌に対する新たな治療法の開発が急務である．近年，癌幹細胞(CSC; cancer stem cell)の概念が導入されたことで，癌の発生，転移，再発の機構に関する理解が進んできて，治療標的に対する考え方も変わった．腫瘍の排除と再発の防止には癌幹細胞の根絶が必須であり，癌幹細胞は癌治療の重要な標的となっている．本研究は，上皮間葉移行化(EMT; Epithelial-mesenchymal transition)誘導により，癌幹細胞同定・分離の困難な非小細胞肺癌に対する短期間で効率的に癌幹細胞株の確立し，癌根治を目指す新しい治療の基盤データを得た．

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により，EMT誘導で本来癌幹細胞の同定・分離の困難な非小細胞肺癌に対する癌幹細胞株の確立が短期間かつ高い効率的にできると期待できる．確立した癌幹細胞株を他分野の研究者に提供することもでき，癌幹細胞の制御機構の解明を加速させる．また，本研究の成果は，肺癌だけでなく，消化器癌や婦人科癌など多くの癌腫に応用でき，癌の発生や転移機序への理解を深める，より効率的な新規癌根治治療法の開発に貢献することができる．

研究成果の概要(英文)： The treatment results for advanced stage lung cancer are still poor, and there is an urgent need to develop new treatments for advanced stage lung cancer. In recent years, the introduction of the concept of cancer stem cells (CSCs) has led to a better understanding of the mechanisms of cancer development, metastasis, and recurrence. Eradication of cancer stem cells is essential for tumor elimination and prevention of recurrence, and cancer stem cells have become important targets for cancer treatment. In this study, by inducing epithelial-mesenchymal transition, we established a cancer stem cell line for non-small cell lung cancer, which is difficult to identify and isolate cancer stem cells, and obtained basic data for new cancer treatment aiming at radical cure of cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：非小細胞肺癌 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

本邦の非小細胞肺癌の約 3 分の 2 は進行期肺癌である。進行期肺癌の治療の主体は化学療法であるが、治療成績は未だ不良である。そのため、新たな治療の開発が急務である。近年、癌幹細胞(CSC; cancer stem cell)の性状を解明しそれを標的とする開発研究が世界的に注目されている。非小細胞肺癌においても自己複製能と分化能を有する癌幹細胞が存在すると考えられている。癌に対する抗癌化学療法や放射線療法に対して、癌幹細胞は正常幹細胞と同様に細胞周期の静止期にあり、薬剤排出能も高く抵抗性を有すると考えられる。化学療法は癌幹細胞から複製されていく細胞に対してのみ作用し、癌幹細胞が残存することで再発を引き起こすと認識され、治療標的に対する考え方も変わった。腫瘍の排除と再発の防止には癌幹細胞の根絶が必須であり、癌幹細胞は癌治療の重要な標的となっている。進行期肺癌に対する根絶治療法の開発のために、この癌幹細胞を選択的に作用する薬剤が必要である。そのためには、まず実験的癌幹細胞を同定・確立し、癌に特異的な標的分子を同定していく必要がある。"次世代"医療の基本とされた癌幹細胞の分離・精製・同定は精力的に進められている。

現在、癌細胞株や臨床材料(生検材料、手術摘出標本など)を使用し癌幹細胞を分離するのが一般的である。しかし、実際には細胞株や臨床材料における癌幹細胞の数は 10%以下とされ、これらの材料から癌幹細胞を確立することは成功率が低く、困難である。さらに、癌幹細胞のみを単離する簡便な方法はなく、正常幹細胞の分離・濃縮方法としてこれまでに開発され発展してきた技術により、肺癌幹細胞に特異的なマーカーがなく肺癌幹細胞株の樹立が未だ満足できるレベルに達していない。

2. 研究の目的

本研究は、TGF- β と TNF- α による上皮間葉移行(EMT; Epithelial-mesenchymal transition)化誘導により、癌幹細胞同定・分離の困難な非小細胞肺癌に対する短期間で高効率に癌幹細胞株の確立し、癌根治を目指す新しい治療の基盤的データを得ることを目指す。

3. 研究の方法

手術摘出肺腫瘍を使用し、組織破碎・分散を行い、腫瘍細胞を初代培養する。

初代癌細胞に対し、TGF- β & TNF- α による EMT 誘導し肺癌癌幹細胞を含むスフェロイドの発生を能動的に促進する。

分画された細胞を比較細胞と共に免疫不全マウスに植付け、肺癌癌幹細胞株を同定する。

癌幹細胞、癌細胞及び正常肺組織で Micro array 解析等比較実験を行い、癌幹細胞の特異因子を同定する。

同定された癌幹細胞特異因子を基礎的、臨床的に検証する。症例を蓄積し、有意な特異因子同定する。

この特異因子すなわち幹細胞標的分子を対象とした標的分子抑制ベクターを作製する。担癌実験動物において標的分子抑制ベクターを用いた遺伝子治療の評価を行う。

4. 研究成果

平成 29 年から癌細胞株を用いて、TGF- β 、TNF- α による EMT を誘導し癌幹細胞作成の最適条件を探した。また、新しい技術を応用した 3 次元培養の併用により、効率的に肺癌癌幹細胞株の樹立を目指して、細胞株において、癌幹細胞の誘導の可能性を確認した。手術摘出標本から 3 次元培養により腫瘍初期培養しながら TGF- β & TNF- α などにより EMT を誘導し、癌幹細胞により形成したスフェロイドを能動的に形成させた。無血清培地 DMEM/F12 で培養した LUDLU 癌細胞株に TGF- β と TNF- α を投入することにより、10 日目という早い時期から癌幹細胞に特有のスフェロイドを既に確認しており、幹細胞 marker の PSF1 免疫染色により誘導された癌幹細胞を確認した EMT の誘導による癌幹細胞作製の可能性を確認していた。

平成 30、31 年度は、29 年と同様、異なる組織型の肺癌標本から、癌幹細胞株を誘導し、肺癌癌幹細胞株の樹立し、症例を増やした。癌幹細胞と癌細胞株及び元の腫瘍周囲の正常肺組織を用いて、抽出 RNA による Micro array 解析統計解析により癌幹細胞に有意な特異因子の同定を行なった。Micro array 解析で得られた候補因子の中から MCL1、SLC7A11/xCT について機能的・臨床的に検討した。MCL-1 とは様々な細胞において細胞死（アポトーシス）を抑制する働きを持つことが知られているタンパクで、ノックアウトマウスの解析から、正常血液幹細胞などの幹細胞自己再生に必須の分子であることも明らかになっている。MCL-1 タンパクは BCL-2 ファミリータンパクのひとつで、さまざまがん細胞で発現していることが知られ、癌細胞の抗癌剤に対する多剤耐性にも関わっている。また、MCL1 は既存の幹細胞マーカーである多能性幹細胞転写因子 NANOG 及 OCT4 の発現と関連癌幹細胞治療の標的

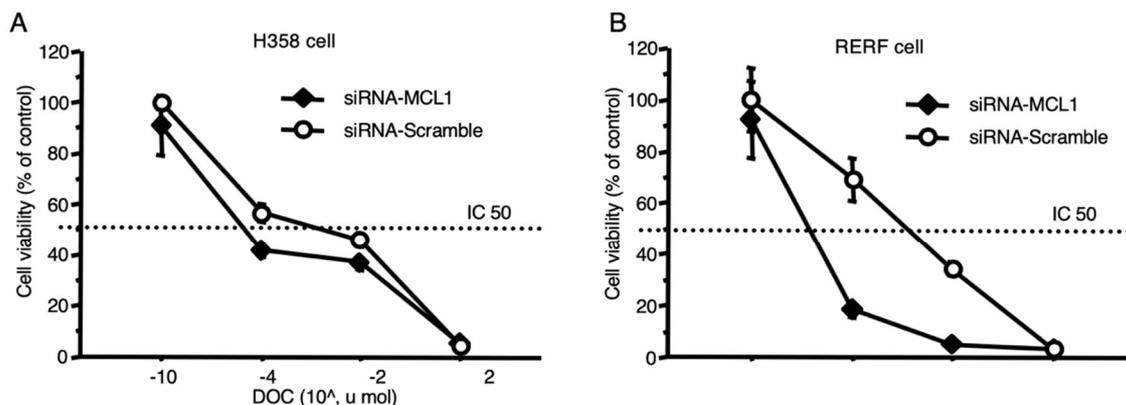


Figure 1. Inhibition of MCL1 increase adenocarcinoma H358 (A) and squamous cell RERF (B) lung cancer cells sensitivity to docetaxel hydrate (DOC).

になる可能性を示唆された(文献 1)。我々は非小細胞肺癌株に置いて MCL1 の抑制は MCL1 遺伝子発現非小細胞肺癌株の増殖抑制と DOC 感受性向上を引き起こすことを証明した(図 1, 文献 2)。更に、MCL1 過剰発現は非小細胞肺癌において予後不良因子であり、新たな治療標的になり得ることを証明した(図 2, 文献 3, 4)。MCL1 は癌幹細胞の標的として、単独抑制でも、あるいは他の抗がん剤と併用した場合でも、実現可能な抗がん戦略となると考え

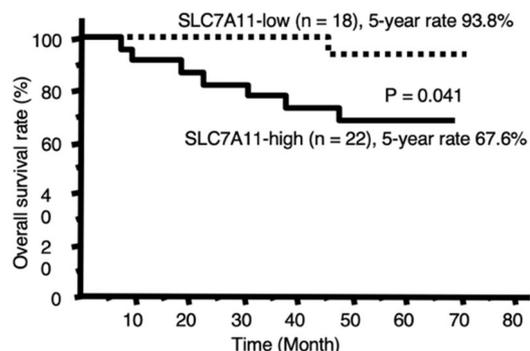


Figure 3. Overall survival of 40 patients with non small cell lung cancer according to SLC7A11 expression status.

られる。

SLC7A11/xCT は細胞膜に位置してシスチン・グルタミン酸トランスポーターで多数の悪性腫瘍に報告された。SLC7A11 発現は小細胞肺癌細胞に癌幹様の特性を与え(文献4),腫瘍細胞に物理プラズマ処理に対する固有耐性が付与されることも報告され(文献5),癌幹細胞の機能を唆されている。我々は SLC7A11/xCT の CSC マーカーとして可能性を機能的,臨床的に探求した。その結果として非小細胞肺癌における SLC7A11/xCT 発現は非小細胞肺癌において予後不良因子と証明し(図3,文献5),更に p53 変異との関連性を見出した(図4,文献6)。

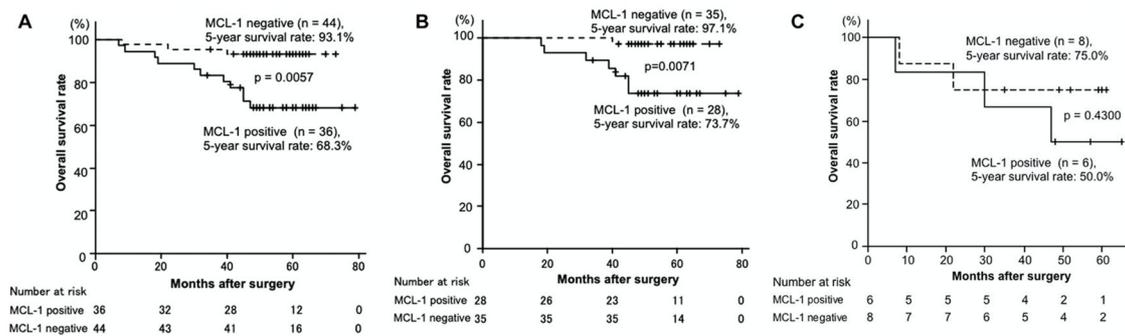


Figure 2. Overall survival of 80 NSCLC patients in relation to MCL-1 status: (A) in total of 80 NSCLC patients; (B) in 63 patients with adenocarcinomas; (C) in 14 patients with squamous cell carcinomas.

我々は EMT を誘導し,癌幹細胞の誘導の可能性を確認した。癌幹細胞と癌細胞株及び元の腫瘍周囲の正常肺組織を用いて,抽出 RNA による Micro array 解析統計解析により癌幹細胞に有意な特異因子を同定した。

学会発表や論文発表に通じて癌根治を目指す新しい治療の基盤的データを蓄積し,進行期肺癌における新たな治療戦略と成りうることを積極的に発信した。

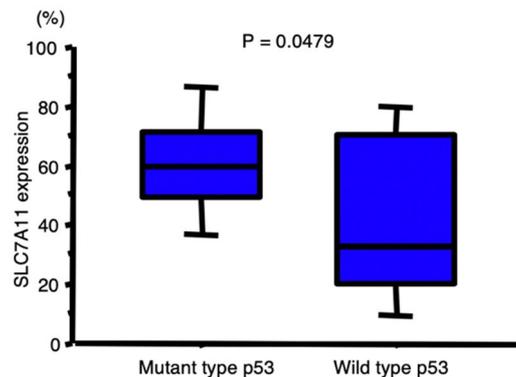


Figure 4. SLC7A11 expression was significantly higher in tumors with mutant p53 than that with wild-p53.

文献.

1. Rasmussen ML, Kline LA, Park KP, et al. A Non-apoptotic Function of MCL-1 in Promoting Pluripotency and Modulating Mitochondrial Dynamics in Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2018;10(3):684-692. doi:10.1016/j.stemcr.2018.01.005
2. Nakano T, Liu D, Nakashima N, et al. MCL-1 expression of non-small cell lung cancer as a prognostic factor and MCL-1 as a promising target for gene therapy. *J Clin Oncol*. 2018;36(15_suppl):e24236-e24236. doi:10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.e24236
3. Nakano T, Go T, Nakashima N, Liu D, Yokomise H. Overexpression of antiapoptotic MCL-1 predicts worse overall survival of patients with non-small

cell lung cancer. Anticancer Res. 2020;40(2):1007-1014.

doi:10.21873/anticanres.14035

4 . Kamenori S, Suina K, Yamasaki J, et al. Abstract 4639: SLC7A11 expression confers cancer stem-like properties in small cell lung cancer cells. Cancer Res. 2019;79(13 Supplement):4639 LP - 4639. doi:10.1158/1538-7445.AM2019-4639

5 . Bekeschus S, Eisenmann S, Sagwal SK, et al. xCT (SLC7A11) expression confers intrinsic resistance to physical plasma treatment in tumor cells. Redox Biol. 2020;30:101423. doi:10.1016/j.redox.2019.101423

6 . **劉 大革**, **中島 成泰**, **中野 貴之**, **張 霞**, **横見瀬 裕保**. 非小細胞肺癌におけるアミノ酸トランスポーターSLC7A11/xCT 発現の臨床意義. 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018-9.

7 . **劉 大革**, **中島 成泰**, **中野 貴之**, **張 霞**, **横見瀬 裕保**. 非小細胞肺癌におけるアミノ酸トランスポーターSLC7A11/xCT 発現と p53 変異との関連. 第 78 回日本癌学会学術総会, 2019-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 NAKANO TAKAYUKI、GO TETSUHIKO、NAKASHIMA NARIYASU、LIU DAGE、YOKOMISE HIROYASU	4. 巻 40
2. 論文標題 Overexpression of Antiapoptotic MCL-1 Predicts Worse Overall Survival of Patients With Non-small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1007 ~ 1014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kita Yusuke, Tetsuhiko Go, Nariyasu Nakashima, Dage Liu, Yoshimasa Tokunaga, Xia Zhang, Takayuki Nakano, Kazuhito Nii, Sung Soo Chang, and Hiroyasu Yokomise.	4. 巻 40(2)
2. 論文標題 Inhibition of Cell-Surface Molecular GPR87 with GPR87-Suppressing Adenoviral Vector Disturb Tumor Proliferation in Lung Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 733-741
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nariyasu Nakashima, Dage Liu, Takayuki Nakano, Xia Zhang, Tetsuhiko Go, Yoshiyuki Kakehi, and Hiroyasu Yokomise	4. 巻 36:15_suppl
2. 論文標題 The clinical significance of autophagy in patients with non small cell lung cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 e24268-e24268
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.e24268	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 MCL-1 expression of non-small cell lung cancer as a prognostic factor and MCL-1 as a promising target for gene therapy	4. 巻 36:15_suppl
2. 論文標題 Takayuki Nakano, Dage Liu, Nariyasu Nakashima, Hiroyasu Yokomise, Kazuhito Nii, Tetsuhiko Go, Shintaro Tarumi, Natsumi Matsuura, Sung soo Chang, Atsushi Fujiwara, and Yoshiyuki Kakehi	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 e24236-e24236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.e24236	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Liu D, Nakashima N, Nakano J, Tarumi S, Matsuura N, Nakano T, Nii K, Tokunaga Y, Yokomise H.	4. 巻 37(5)
2. 論文標題 Customized Adjuvant Chemotherapy Based on Biomarker Examination May Improve Survival of Patients Completely Resected for Non-small-cell Lung Cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2401-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.11591	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Norimura S, Kontani K, Kubo T, Hashimoto SI, Murazawa C, Kenzaki K, Liu D, Tamaki M, Aki F, Miura K, Yoshizawa K, Tangoku A, Yokomise H.	4. 巻 14(2)
2. 論文標題 Candidate biomarkers predictive of anthracycline and taxane efficacy against breast cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cancer Res There.	6. 最初と最後の頁 409-415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/jcrt.JCRT_1053_16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 劉 大革, 中島 成泰, 中野 貴之, 張 霞, 横見瀬 裕保
2. 発表標題 非小細胞肺癌におけるアミノ酸トランスポーターSLC7A11/xCT発現とp53変異との関連
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島 成泰, 横見瀬 裕保, 藤本 周祐, 芳賀 ななせ, 横田 直哉, 加藤 歩, 藤原 敦史, 松浦 奈都美, 垂水 晋太郎, 中野 貴之, 張 性洙, 劉 大革, 呉 哲彦
2. 発表標題 18FDG-PET SUVmaxは原発性肺癌における病理学的脈管侵襲を術前に予測する強力なバイオマーカーである
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野 貴之, 横見瀬 裕保, 呉 哲彦, 劉 大革, 張 性洙, 垂水 晋太郎, 中島 成泰, 松浦 奈都美, 新居 和人, 藤原 敦史, 加藤 歩, 横田 直哉, 芳賀 ななせ, 藤本 周祐
2. 発表標題 抗腫瘍剤関連バイオマーカーの評価は肺癌術後の予後改善に寄与するか
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 劉 大革, 中島 成泰, 中野 貴之, 芳賀 ななせ, 加藤 歩, 横田 直哉, 藤原 敦史, 松浦 奈都美, 垂水 晋太郎, 張 性洙, 呉 哲彦, 横見瀬 裕保
2. 発表標題 非小細胞肺癌におけるオートファジーの臨床的意義
3. 学会等名 第35回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野 貴之, 芳賀 ななせ, 藤本 周祐, 横田 直哉, 加藤 歩, 藤原 敦史, 松浦 奈都美, 中島 成泰, 垂水 晋太郎, 張 性洙, 劉 大革, 呉 哲彦, 横見瀬 裕保
2. 発表標題 非小細胞肺癌におけるMCL-1発現の臨床的意義
3. 学会等名 第35回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 劉 大革, 中島 成泰, 中野 貴之, 張 霞, 横見瀬 裕保
2. 発表標題 非小細胞肺癌におけるアミノ酸トランスポーターSLC7A11/xCT発現の臨床意義
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島 成泰, 劉 大革, 中野 貴之, 吳 哲彦, 横見瀬 裕保
2. 発表標題 非小細胞肺癌におけるオートファジーの臨床的意義について
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野 貴之, 劉 大革, 中島 成泰, 横見瀬 裕保
2. 発表標題 MCI-1の発現は非小細胞肺癌の予後因子である
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nariyasu Nakashima, H.Yokomise, D.Liu, T.Go, S.S.Chang, S.Tarumi, N.Matsuura, T.Nakano
2. 発表標題 intratumoral vessel invasion (vascular and lymphatic invasion) has an adverse effect to the survival of patients with NSCLC and may be predicted by preoperative 18F-FDG PET
3. 学会等名 26th ESTS2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 劉 大革, 中島 成泰, 中野 貴之, 喜田 裕介, 徳永 義昌, 張 霞, 吳 哲彦, 黄 政龍, 横見瀬 裕保.
2. 発表標題 非小細胞肺癌における抗癌剤耐性遺伝子を標的とした遺伝子治療の基礎研究
3. 学会等名 .第76回日本癌学会学術総会,
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	上野 正樹 (Ueno Masaki) (30322267)	香川大学・医学部・教授 (16201)	