

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K16412

研究課題名（和文）肺癌幹細胞の解析に基づく新規治療戦略の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapy based on the analysis of lung cancer stem cells.

研究代表者

坂入 祐一（Yuichi, Sakairi）

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30551949

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：癌幹細胞により、その治療抵抗性から再燃・再発をきたすメカニズムが知られているが、肺癌では同定されていない。本研究は、肺癌における癌幹細胞を同定しその機能を解析することで、新たな治療標的となる分子を同定することを最終目的としている。これまで一部の組織幹細胞が培養後に急激に増殖し、モノクローナルな増殖およびテロメア長の異常伸長がおこる現象を発見している。この変化は肺組織幹細胞における癌幹細胞化であると考えており、これらの細胞の機能解析を通じて、癌幹細胞のさらなる理解と新規治療法の開発が可能であると考えている。肺切除検体から単離しソートした生細胞を採取し、RNAシーケンスにかけ解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義
癌幹細胞の研究により、これまでと異なる軸の新規治療法が開発できる可能性がある。肺癌における癌幹細胞の確定的なマーカーは同定されておらず、そのため肺癌幹細胞は同定されていない。引き続き得られたデータを解析し、癌患者におけるヒト組織幹細胞からの癌化のメカニズムを検討することで新しいアプローチで癌幹細胞の同定・新治療の開発を目指す。

研究成果の概要（英文）：The mechanism by which cancer stem cells cause relapse and recurrence due to their resistance to therapy is known but has not been identified in lung cancer. The ultimate goal of this study is to identify cancer stem cells in lung cancer and analyze their functions to identify new therapeutic target molecules. We have discovered that some tissue stem cells proliferate rapidly after culture, resulting in monoclonal proliferation and abnormal telomere length elongation. We considered these changes to be cancer stem cell transformation of lung tissue stem cells and that further understanding of cancer stem cells and development of novel therapies are possible through functional analysis of these cells. We collected isolated and sorted viable cells from lung resection specimens and analyzed them by RNA sequencing.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌の治療は困難である

現在、悪性腫瘍は日本の死因で一位を占め、増加の一途をたどっている。とくに肺癌は平成 27 年度の死亡者数は 74,378 人と悪性新生物になかで最も多く (総務省統計局: <http://www.stat.go.jp/data/nihon/24.htm>)、癌死の 20% を占める重要な疾患である。近年、従来の抗癌剤治療に代わり EGFR や ALK といった遺伝子変化をターゲットとする分子標的療法や、腫瘍免疫にかかわる PD-1/L1 を阻害する免疫治療など新規治療法が開発されているが、肺癌はいまだ薬物治療のみで根治を得ることは困難な疾患である。

(2) 癌幹細胞

大腸癌や乳癌など、さまざまな固形腫瘍で癌幹細胞が同定されている。しかし肺癌に関しては、癌幹細胞は完全に同定されていない。癌幹細胞はその定義から、従来の抗癌剤治療に抵抗性であり、正常の幹細胞と同じように自己複製能をもつ細胞群であると考えられている。すなわち、癌幹細胞が癌細胞の供給源となり腫瘍の増大に寄与している一方で、かつ治療に抵抗性であることからこの癌幹細胞の存在が根治への最大の障壁になっていることが想定される。このように従来の肺癌治療において薬物治療のみでは根治困難である一因は肺癌幹細胞によるものが想定され、肺癌幹細胞の同定および制御が可能となれば肺癌根治への足がかりとなることが期待される。

2. 研究の目的

肺切除検体から肺癌幹細胞を探求する

3. 研究の方法

(1) 細胞の単離

術前に研究同意を文書で得られた患者を対象に、癌部および非癌部それぞれを対象として、術後ただちに清潔野において単細胞への分離を行った。Collagenase、Elastase および DNase 処理により、単細胞の懸濁液を得て、Lysis buffer を用いて溶血させた後、十分に洗浄したうえで CD45 および DAPI で染色し、CD45 陰性かつ DAPI 陰性となる生きた細胞をソートして単離した。

(2) RNA-seq (RNA 抽出/ライブラリ構築/シーケンシング)

単離した肺細胞より RNA を抽出する。抽出の過程で DNA のコンタミネーションによるバイアスを十分に除去するために、繰り返し DNase 処理を行い純度の高い RNA を採取する。また細胞選別過程で劣化した RNA からでもシーケンス用ライブラリの作成が可能な TruSeq RNA Access kit を用いてそれぞれの検体においてライブラリ構築を行う。この際、各検体における RNA 含有量の評価をバイオアナライザーを用いて行い、分量量の RNA を用いてライブラリを作成する。次世代シーケンサー (Illumina, HiSeq2000) による mRNA シーケンスを行った。

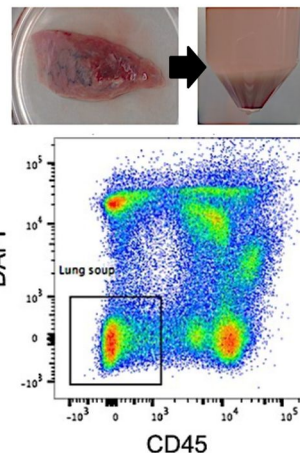
(3) 肺癌幹細胞と背景肺の関係

正常肺だけでなく、慢性閉塞性肺疾患や特発性肺線維症といった、難治性慢性肺疾患を背景にもつ肺癌患者も対象とし、単離した病変部と背景肺を比較して遺伝子発現プロファイルの違いを検証した。

4. 研究成果

(1) 細胞の単離

研究同意の得られた患者より、術後の切離肺から新鮮肺検体を採取した。採取した肺はただちに化学的に分解し、単離細胞として回収した。CD45 および DAPI を用いたフローソートにより、混在している血球細胞と死細胞を除去して生きた肺細胞のみを採取した (右図)。細胞数は少なく、さらなるソートを行うには検体量の制限があり、ここまでの選別で留めてシーケンスに移行した。上記を癌部、非癌部でそれぞれ行い細胞を採取した。



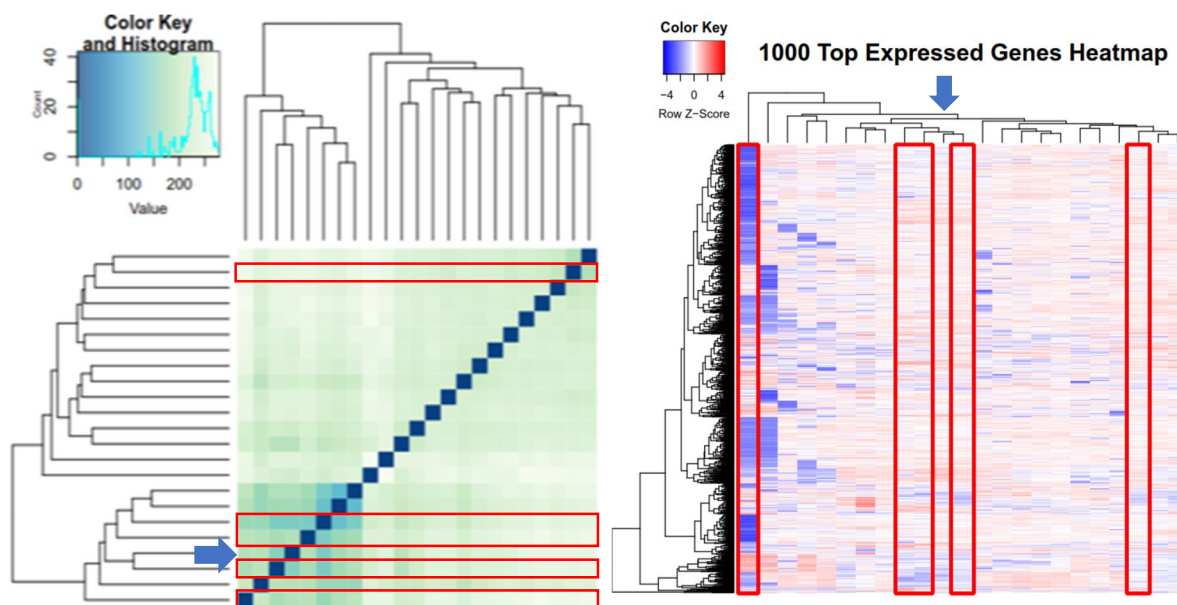
(2) RNA-seq

得られた細胞より RNA を抽出し、3'UTR シーケンシングの技術を応用して、細胞の単離やソートを経て劣化のみられた RNA から効率的にライブラリを作成し次世代シーケンサーによる RNA 発現解析を行った。

6 症例より癌 5 検体を含む 23 検体からソートし細胞採取が可能であったが、RIN スコアは 2~8.9 と幅広い質の RNA が採取された。低スコアの RNA であっても、解析に耐えうる量のリード数は確保された。約 17% の検体ではデータの質が悪かったものの、平均

4973664.609 ± 1092999.99 リードを得て、その結果をもとにクラスター化し、ヒートマップを作成することができた（下図：癌検体は赤枠）

癌から得られた生細胞は肺細胞とは異なる集団を形成していた一方で、背景肺の細胞の一部は癌に近い位置にクラスターがあり（青矢印）、癌に近い発現プロファイルが確認された。



なお Covid-19 感染症の時期と重なったこともあり、肺検体を安全に処理し実験を継続することが困難であり、症例の蓄積に難渋した。得られたデータは引き続き解析を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------