

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590918

研究課題名(和文)

肺非小細胞癌におけるサイド・ポピュレーションの解析による肺癌幹細胞特性の研究

研究課題名(英文)

Functional analysis of cancer stem cell/ side population in non-small lung cancer cells

研究代表者

近藤 征史 (Kondo Masashi )

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00378077

研究成果の概要(和文)：

癌幹細胞の機能解析は、発癌過程や治療抵抗性に関与しているため、非小細胞肺癌の早期診断や治療抵抗性を克服するために重要である。本研究において、癌幹細胞の性質を持つ細胞集団を同定して、それらに関連する分子を見つけることを試みた。肺癌細胞において、無血清で足場非依存の培養条件による sphere の形成により幹細胞の性質をもつ細胞が選択できる可能性が示唆された。また、epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) が幹細胞の性質に関与して、細胞の生存に重要な役割を果たすことが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：

Functional analysis of cancer stem cell is very important to establish the method of early detection and/or effective therapy for the non-small cell lung cancer since stem cells seem to be involved carcinogenesis and the resistance for the chemotherapy. In this study, we try to identify the cell populations that have cancer stem cell property and important molecule related with stem cells. We found that the formation of sphere in serum free and anchorage-dependent culture condition was promising for the selection of stem cells population, and that epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) play the important roll in survival of cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：EGFR 癌幹細胞 非小細胞肺癌

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞には正常組織細胞と同様に、幹細胞の性質を持った少数の細胞集団 (cancer stem cell、癌幹細胞) 存在が明らかになりつつある。多くの癌において、cancer stem cell は細胞の分化を表す細胞の表面マーカーを用いて分離

されている。染色性の違いにより分離した細胞集団はサイド・ポピュレーション (side population, SP) と呼ばれ、多くの癌において分離・解析され、その細胞集団は、ヌードマウスにおける細胞増殖能が高く、ABCトラ

ンスポーター等の発現が増加しているなどの stem cell の性質を有することが報告されている。また、それ以外の幹細胞マーカーで癌幹細胞の分離を試みられている。

肺癌患者で当初は化学療法や放射線療法に感受性があり治療により腫瘍が縮小しても、ほとんどの場合は再発する。特にゲフィチニブ、エロチニブなどの上皮成長因子受容体 (EGFR) のチロシンリン酸化阻害剤 (EGFR-TKI 剤) は、EGFR に機能獲得型の変異を持つ肺癌に高い奏効率を示し、完全緩解や長期間の腫瘍抑制効果をもたらすが、多くの場合再び腫瘍が増大する (EGFR-TKI 剤への耐性化)。その機序として、EGFR 遺伝子に薬剤耐性になる変異を新たに生じることや、肝細胞増殖因子の受容体である MET に遺伝子増殖が生じることが報告されている。

近年、肺癌においても癌幹細胞の分離がなされており、SP が分離された SP では、ABC トランスポーターの発現が増加しており、薬剤耐性になることが示された (Ho MM et al. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res.* 67:4827-33. 2007)。しかし、肺癌においても SP および癌細胞は不明な点が多い。本研究では、SP の分離・解析によりその生物学的特性を明らかにすることを目的とする。本研究により、新しい肺癌治療戦略の展開が期待される。

## 2. 研究の目的

SP 細胞もしくは cancer stem cell と想定されている細胞集団を分離し、その細胞集団が正常組織における幹細胞の性質 (高い増殖能、分化能など) を有するかどうかを明らかにする。さらに、幹細胞の性質 (表面マーカーや遺伝子発現の変化) を利用して臨床検体における簡便な SP 細胞の検出

法もしくは定量法を開発し、SP 細胞と抗がん剤の感受性や予後などとの関連を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 肺癌細胞からの SP 細胞もしくは幹細胞の性質をもつ集団もの単離

SP の分離は、細胞を色素である hoechst33342 で染色し、染色性の違いをフローサイトメーター (FACS) により分離する (Proc Nalt Acad Sci U S A. 101:781-786. 2004, *Cancer Res.* 67:4827-33. 2007)。hoechst33342 のトランスポーターの阻害剤である reserpine をコントロールとして、SP の分離を行う。その他、幹細胞マーカーとなる細胞表面の分子において、分離を試みる。さらに、細胞を血清無添加で、なおかつ非接着の状態 で培養して、sphere を形成させて、幹細胞の性質をもつ細胞が特異的に増殖するかを検討した。

(2) 癌幹細胞をもつ細胞集団の評価

① 分化マーカーや ABC トランスポーターの発現の検討

ABCG2, ABCA2, MDR1 などの ABC トランスポーターの発現を免疫染色と RT-PCR 法で確認する。

② 抗がん剤の感受性

抗癌剤の薬剤感受性を検討する (MTT アッセイ法)。

(3) 幹細胞の性質に関与する遺伝子の肺癌発生過程に関与の検討

① epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) の検討

細胞株での発現を RT-PCR 法、ウェスタンブロット法で発現を評価する。細胞間での発現の違いをフローサイトメトリーで検討する。siRNA により EpCAM の発現低下をさせ、足場依存および非依存の細胞

増殖を検討する。

## ② ZEB1 遺伝子

癌幹細胞に関連する epithelial-mesenchymal transitions(EMT)を制御する遺伝子のひとつである ZEB1 遺伝子の検討をした。発現や増殖に関する影響を検討した。

### (4) 臨床検体からの癌幹細胞の性質を有する細胞の選択的な培養

肺癌患者より、胸水を採取して、細胞を血清無添加で、なおかつ非接着の状態に培養して、sphere を形成させて、幹細胞の性質をもつ細胞が特異的に増殖するかを検討した。

## 4. 研究成果

### (1) SP 細胞の分離

EGFR 遺伝子変異をもつ肺癌細胞株から色素 (Hoechst33342) の排泄能の違いにより、幹細胞の性質を持つ細胞集団 (サイド・ポピュレーション) をより分離しようと試みた。しかし、乳癌、脳腫瘍などの細胞株と違い、肺癌においては、幹細胞の性質を持つ細胞集団の分離はできなかった。そのため、細胞株を、血清無添加で、なおかつ非接着の状態に培養して、幹細胞の性質をもつかを検討した。NCI-H157、HCC401 などの多くの細胞株では、上記の培養条件にて sphere を形成することが判明した。(図1)

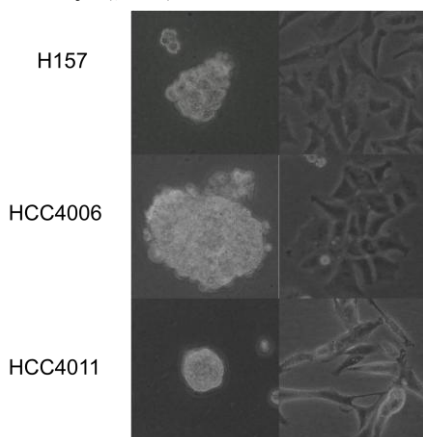


図1 sphere の形成

肺癌細胞株において、足場非依存の状態に培養すると左段のごとく、細胞が球形状に発育する。右段は、通常の培養条件による細胞の形態を示す。

この方法で、選択的に培養した細胞集団が、幹細胞の性質をもつか検討した。

(2) 癌幹細胞をもつ細胞集団の評価 sphere を形成する細胞集団と親株との EGFR 阻害剤および他の抗癌剤の感受性を比較したが、有意な差異は認められなかった。幹細胞の性質と関連している遺伝子発現 (ABCG2、OCT4、MYC、p63 など) を検討したが、親株と比較して有意な差は認められなかった。しかし、接着因子である epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) の発現は、sphere の状態で低下する傾向を認めた。

(3) 幹細胞の性質に関与する遺伝子の肺癌発生過程に関与の検討

### ① EpCAM

肺癌細胞株において、EpCAM の発現やその機能を検討した。18 細胞株で RT-PCR 法にて検討した結果、EGFR 遺伝子の変異がある細胞株で、EpCAM の発現が高い傾向があった。細胞間で発現量の違いを検討するために、フローメトリーによる個々の細胞の EpCAM の発現を検討して、肺癌細胞 NCI-H460 では、細胞間において、発現の差を認めた。この細胞株において EpCAM が幹細胞のマーカである可能性が示唆された。しかしながら、磁気ビースにより、EpCAM 発現の強い細胞集団と弱い細胞集団を分離して、薬剤感受性や sphere の形成能の違いを検討したが、現在のところ有意な差をみいだしていない。次に EpCAM が癌細胞の生存自体に関与し

ているかを検討するため、細胞株に EpCAM に対する siRNA を合成して、ノックダウンをおこなった。EpCAM の発現低下をさせると、足場依存および非依存の細胞増殖が、複数の細胞株において抑制されることが明らかになった (図 2)。細胞増殖の抑制の機序は、アネキシンや細胞周期による解析によりアポトーシスによることが明らかになった。

## ② ZEB1 遺伝子

epithelial-mesenchymal transitions (EMT) が幹細胞と密接に関連しているが、最近知られてきている。EMT 制御する遺伝子のひとつである ZEB1 遺伝子が、EpCAM を制御することを悪性中皮種細胞において見いだした。ZEB1 遺伝子が発癌過程に関与しているかを肺癌および悪性中皮腫において検討した。ZEB1 遺伝子が肺癌細胞株や悪性中皮腫株において、過剰発現していることを見だし、ZEB1 遺伝子をノックダウンすることにより、細胞増殖能が低下することを見いだした。

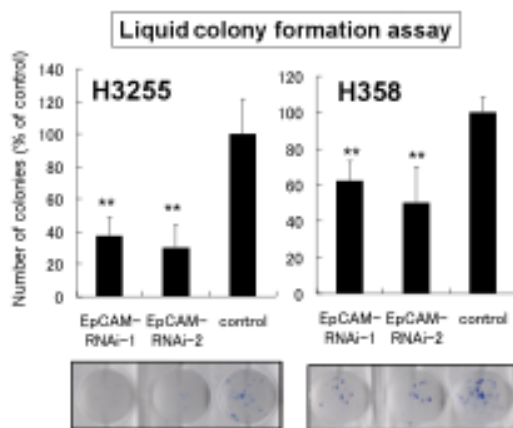


図 2 EpCAM 遺伝子のノックダウンによる細胞増殖の抑制

(4) 臨床検体からの癌幹細胞の性質を有する細胞の選択的な培養

2 例の肺癌患者の癌性胸膜炎による胸水より癌細胞の培養をおこない、sphere の形成を認めた。今後、症例数を増やして、継続的に培養を可能にして、マイクロアレイおよびヌードマウスに移植して、幹細胞の性質を保持できるかと検討していく予定である。

まとめ

本研究において、幹細胞の性質に関与すると思われる EpCAM が、肺癌の発生過程において重要な役割を担っていることが明らかになった。癌幹細胞の分離のために血清無添加で、なおかつ非接着の状態で培養して、sphere 形成が有用であることが示唆され、今後はこの手法において、細胞株および胸水などの臨床検体より、幹細胞の性質をもつ細胞の分離が期待される。

## 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 5 件)

(1) Ichikawa M, Suzuki R, Kataoka K, Noda Y, Shindoh J, Matsumoto S, Tanikawa Y, Suzuki K, Baba K, Shindo Y, Kondo M, Imaizumi K, Kume H, Hasegawa Y, Takagi K, Taniguchi H Second-line weekly paclitaxel in resistant or relapsed non-small cell lung cancer treated with docetaxel and carboplatin: a multi-center phase II study. Lung Cancer. 69 (3):319-22 2010 査読有り

(2) Usami N, Yokoi K, Hasegawa Y, Taniguchi H, Shindo J, Yamamoto M, Suzuki R, Imaizumi K, Kondo M, Shimokata K Phase II study of carboplatin and gemcitabine as adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small cell lung cancer: a report from the Central Japan Lung Study Group, CJLSG 0503 trial. Int J Clin Oncol. 15:583-7 2010 査読有り

(3) Shimokata T, Ando Y, Yasuda Y, Hamada A, Kawada K, Saito H, Matsuo S, Kondo M, Imaizumi K, Hasegawa Y. Prospective evaluation of pharmacokinetically guided

dosing of carboplatin in Japanese patients with cancer. Cancer Sci. Cancer Sci. 101:2601-5. 2010 査読あり

(4) Takeyama Y, Sato M, Horio M, Hase T, Yoshida K, Yokoyama T, Nakashima H, Hashimoto N, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD, Kondo M, Hasegawa Y. Knockdown of ZEB1, a master epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung cancer cells. Cancer Lett. 296:216-24. 2010 査読あり

(5) Goto Y, Shinjo K, Kondo Y, Shen L, Toyota M, Suzuki H, Gao W, An B, Fujii M, Murakami H, Osada H, Taniguchi T, Usami N, Kondo M, Hasegawa Y, Shimokata K, Matsuo K, Hida T, Fujimoto N, Kishimoto T, Issa JP, Sekido Y. Epigenetic profiles distinguish malignant pleural mesothelioma from lung adenocarcinoma. Cancer Res. 69:9073-82. 2009 査読あり

〔学会発表〕(計4件)

(1) EMT 制御因子 ZEB1 のノックダウンは肺がん細胞の足場非依存性増殖を抑制する  
竹山佳宏, 佐藤光夫, 堀尾美穂子, 長谷哲成, 吉田健也, 小栗知世, 関戸好孝, 近藤征史, 長谷川好規  
第51回日本肺癌学会 広島 2010年11月4日

(2) 腫瘍 EMT 制御因子 ZEB1 のノックダウンは肺癌細胞の増殖を抑制する  
竹山佳宏, 佐藤光夫, 堀尾美穂子, 長谷哲成, 吉田健也, 小栗知世, 関戸好孝, 近藤征史, 長谷川好規  
第50回日本呼吸器学会学術講演会 京都 2010年4月24日

(3) Knockdown of ZEB1, a master epithelial mesenchymal transition (EMT) inducing gene, suppresses growth of pleural mesothelioma cell lines  
Mihoko Horio, Mitsuo Sato, Yoshihiro Takeyamal, Tetsunari Hase, Kenya Yoshidal, Yoshitaka Sekido, Masashi Kondo, and Yoshinori Hasegawa ワシントン, アメリカ癌学会年次総会 2010年4月19日

(4) Knockdown of ZEB1, a master EMT inducing gene, suppresses, anchorage-independent cell growth of lung

cancer cells

Mitsuo Sato, Yoshihiro Takeyamal, Mihoko Horio, Tetsunari Hase, Kenya Yoshidal, Harunori Nakashima, Naozumi Hashimoto, Yoshitaka Sekido, Masashi Kondo, and Yoshinori Hasegawa ワシントン, アメリカ癌学会年次総会 2010年4月19日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 征史 (Kondo Masashi )  
名古屋大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 00378077

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし