

機関番号：34417

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791338

研究課題名（和文） 癌幹細胞ニッチの検索

研究課題名（英文） Identification of niche of lung cancer stem cell

研究代表者

金田 浩由紀 (KANEDA HIROYUKI)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：20411522

研究成果の概要（和文）：平成21年度の研究では、免疫組織学的手法により肺癌幹細胞の局在を検討したが、非小細胞肺癌のCD133陽性率は非常に低かった。しかし、その後のソーティングによるCD133陽性細胞の検出では、平均9.1%であった。次に、Side population（SP）細胞による検討を行った。平成22年度の研究では、SP細胞と非SP細胞との遺伝子背景の比較を行ったが、ソートされる細胞数が少なかった。肺全体での発癌率に局在があると仮定し、その検討を行ったが、特に多発肺癌では右上葉に有意に発癌率が高く、癌幹細胞の偏りが存在することが示唆された。また、特定の遺伝子がこの現象に関与する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：In 2009, immunohisto-chemical examination to identify lung cancer stem cells using CD133 antibody showed that CD133 positive cells in lung cancer were very rare. However, flow cytometry examination revealed that percentage of sorted CD133 positive cells was 9.1% on average. In 2010, examination with sorted side population cells did not work well because of low rate of sorted cells. To examine our hypothesis that location of carcinogenesis in whole lung has bias, we reviewed clinical characteristics and site of lobe of the tumor in lung cancer patients who had multiple tumors. Right upper lobe had significantly more tumors than other lobes in multiple lung cancer patients, suggesting that something related with carcinogenesis highly occur more in right upper lobe. Gene mutation analysis of those patients with multiple tumors suggested some specific gene might be related with those sort of the carcinogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：癌幹細胞、ニッチ、肺癌、薬剤抵抗性、免疫染色

1. 研究開始当初の背景

幹細胞とは、ある特定の組織や臓器を構成する成熟細胞への多分化能と自己複製能の

両方の性質を併せ持つ細胞として定義される。各組織が長期にわたり恒常性を維持するためには、幹細胞の自己複製と細胞周期の静止状態が精密に制御されることが重要であ

り、それには幹細胞自体のプログラムに加え、幹細胞周囲の特殊な微小環境「ニッチ」との相互作用が重要な役割を果たしている。ニッチという概念は、もともとは骨髄移植された造血幹細胞が骨髄や脾臓などの造血臓器に特異的に移動し、造血を再構築する現象について説明したものである (Schofield R. *Blood Cells* 1978;4:7-25)。ニッチは幹細胞の支持細胞およびサイトカインや細胞外マトリックス等の幹細胞の挙動を制御する因子によって構成され、幹細胞の自己複製および分化・増殖を制御している (Arai F, Suda T. *Ann NY Acad. Sci* 2007;1106:41-53)。一方で、近年癌細胞の中に存在するごく少数の細胞集団が、正常の幹細胞と同じように、分化と自己複製を繰り返し癌構成細胞を供給し続けるという癌幹細胞の概念が提唱され、確認されつつある。

癌幹細胞の存在は、白血病細胞の研究以後、固形癌組織においても階層性モデルが成立することが示唆されている。CD133をマーカーとして脳腫瘍や大腸癌の幹細胞が同定された。癌幹細胞のふるまいが癌全体の活動性、薬剤抵抗性に関与していることが推測され、癌幹細胞の特性を明らかにすれば、臨床的意義は大きいと考えられる (Donnenberg VS, et al. *J Clin Pharmacol* 2005) (Bao S, et al. *Nature* 2006)。

今回われわれは、癌幹細胞にも分化と自己複製を制御する役割を果たす「癌幹細胞ニッチ」ともいべき微小環境が存在すると仮定した。このように考えると癌の薬剤抵抗性とは、抗癌剤治療中に癌幹細胞が癌幹細胞ニッチでの制御下に生き残ること、と考えることができる。癌幹細胞ニッチの具体的な局在や分子生物学的背景を明らかにすることは臨床的意義が大きく、癌幹細胞ニッチを治療のターゲットとして捉えることにより癌治療に革命がもたらされるものと考えられる。

2. 研究の目的

正常幹細胞の研究から予想される癌幹細胞の概念からすると、癌における癌幹細胞の役割は非常に重要で、癌のふるまいそのものを決定する中心的な存在であることが考えられる。また、従来の抗癌剤治療は癌を **homogenous** で **clonal** なものと考え、多くの癌細胞を殺すことに主眼があった。しかし、癌幹細胞の治療という発想の転換により、治療抵抗性の克服などが期待される。一方、造血幹細胞領域において幹細胞を制御する微小環境「ニッチ」の存在が示され、幹細胞制御に於ける重要性が確認されつつある。そこで癌幹細胞においても癌幹細胞ニッチというものの存在を仮定した。この存在はまだ概念的なものであり、癌幹細胞領域においては

確認されていないが、今回の研究はこれを検討するものである。

肺癌組織での検討：

ヒトでは造血幹細胞ニッチに関して最もよく研究されている。それによると骨芽細胞や血管内皮細胞等がニッチを構成する細胞として注目されている。肺組織における組織幹細胞は明確には同定されていないが、血管周囲や細気管支周囲に具体的な存在場所を推定している。また肺癌組織においてもそれらと同様の場所に癌幹細胞ニッチを構成しているものと予想している。マーカーを用いた染色ではそれらの場所が染色されることを期待する。

3. 研究の方法

平成 21-22 年度

肺癌組織での検討：

臨床検体の切片を用いて免疫組織学的染色を行い、肺癌の癌幹細胞の局在を調べることによるニッチの局在を検討する。

(1) 肺癌への通常の治療として行われる肺切除を予定している患者へ、文書を用いて研究内容を説明し、同意を得られた場合に患者の治療として行われた腫瘍組織の一部を本研究に使用する。

(2) 現在まで癌幹細胞のマーカーである可能性として報告されている以下の分子を用いて、腫瘍切片の免疫組織学的染色を行う。
・CD133 : (Eramo A, et al. *Cell Death and Differentiation* 2008; 15: 504-14)

(3) 局在の特定が難しければ、多重免疫染色を行い、癌幹細胞の局在を再検討する。

(4) 既存構造 (肺泡、気管支や血管等) との関係により、癌幹細胞の局在の共通する特徴を検討する。

4. 研究成果

(1) 平成 21 年度

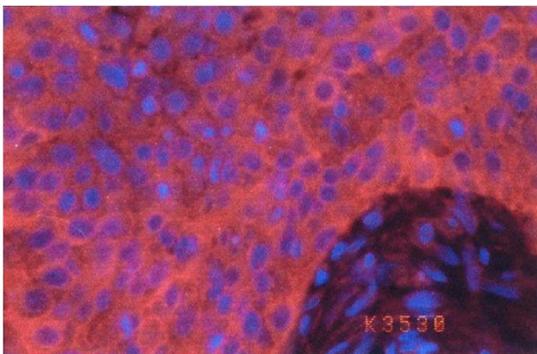
本研究では、臨床検体の切片を用いて免疫組織学的染色を行い、肺癌の癌幹細胞の局在を調べることによるニッチの局在の検討を行った。現在まで癌幹細胞の分子マーカーであるとして報告されている中から、CD133 は脳腫瘍や大腸癌で報告された後、肺癌でも分子マーカーとして報告されている。以前の報告では非小細胞肺癌患者での切除標本における CD133 の発現は非常に低いことが示唆されていた。そこで、術前化学療法を行った症例での治療抵抗性の腫瘍を検討することにより CD133 の発現を観察しようと仮説した。

肺線癌への通常の治療として行われる肺切除を予定している患者 5 例へ、文書を用い

て研究内容を説明し、同意を得られた場合に患者の治療として行われた腫瘍組織の一部を本研究に使用した。また同じ症例において、最近 EGFR チロシンキナーゼ阻害剤投与の効果予測として臨床的な意義の高い EGFR の発現についても免疫染色を行った。CD133 と EGFR との関係を見るために2重染色も計画した。

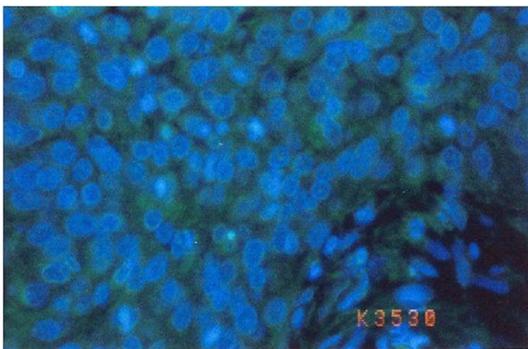
EGFR の発現は5例中4例で見られ、発現のあった症例では 14.7%から 98.9%の発現率であった。平均発現率 49.3%。患者背景として、術前化学療法による臨床病理学的抗腫瘍効果 (EF) は 1a:3 例、1b:1 例、2:1 例であったが、EGFR 陽性率との相関は認めなかった。

図 1. EGFR 陽性細胞



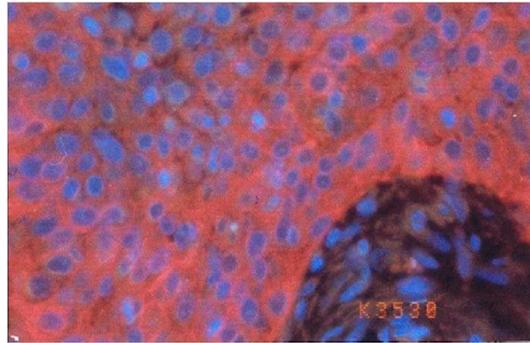
CD133 の発現の検討では、全 5 例とも免疫組織学的な発現を認めなかった。CD133 陽性率は検出限界以下である可能性が示唆された。

図 2. CD133 陽性細胞



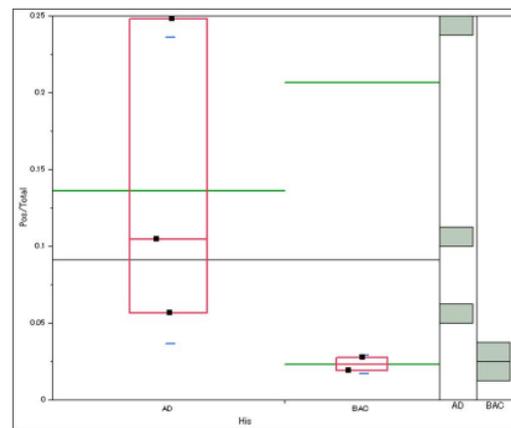
以前の報告では、非小細胞肺癌患者での免疫組織学的検索による CD133 陽性細胞の検出率が非常に低いことが指摘されていたが、術前化学療法後の手術症例で、癌幹細胞が活動的であると推測される状況でも CD133 陽性細胞の検出は難しかった。

図 3. CD133 と EGFR の 2 重染色



次に CD133 陽性細胞のソーティングを行い陽性細胞と陰性細胞との臨床病理学的、遺伝子学的差異を検討した。

図 4. 浸潤性腺癌と細気管支肺胞上皮癌との CD133 陽性細胞の割合の比較



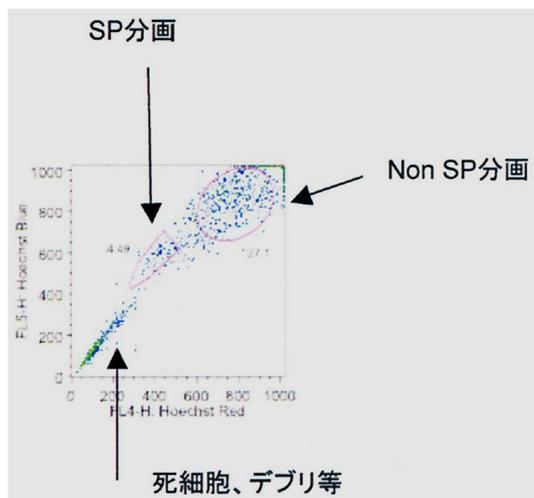
肺腺癌の CD133 陽性細胞の割合は 1.8%から 24.8%であった (平均 9.1%)。肺腺癌が細気管支肺胞上皮癌である場合 (平均 CD133 陽性細胞率: 2.3%) には、それ以外の腺癌 (平均 CD133 陽性細胞率: 13.6%) に比較して、統計学的有意でないものの陽性細胞の割合は低い傾向がみられた ($P=0.22$)。

CD133 陽性細胞と CD133 陰性細胞との遺伝子背景の差異を検討するため、それぞれソーティングされた細胞の EGFR 遺伝子変異、P53 遺伝子変異、KRAS 遺伝子変異を測定した。EGFR 遺伝子変異は、exon 21 L858R、exon 18 G719A、exon 19 K747-S752del、P753S が見られた。P53 遺伝子変異は、exon 7 A248T、exon 5 C135A が見られた。KRAS 遺伝子変異は、TGT (Cys)、GAT (Asp) が見られた。しかし、いずれの症例も CD133 陽性細胞と陰性細胞との遺伝子変異の差を認めなかった。

EGFR をマーカーとしてソーティングを行い、EGFR 陽性細胞と陰性細胞との比較を行ったが、CD133 と同様、陽性細胞と陰性細胞との遺伝子変異の差は認めなかった。

次に、ヘキスト染色により分画される SP (Side Population) 細胞は肺癌においても癌幹細胞を含むと考えられている。

図 5. SP 分画によるソーティング



肺切除を予定している患者から同意を得られた症例の腫瘍組織の一部を用いて SP 細胞のソーティングを行った。

(2) 平成 22 年度

平成 21 年度に続き、肺癌手術患者の肺癌組織から SP (Side Population) 細胞のソーティングを行い、遺伝子変異の測定を行った。測定した遺伝子変異は、肺癌の発生に関与する EGFR、Kras、p53 とした。

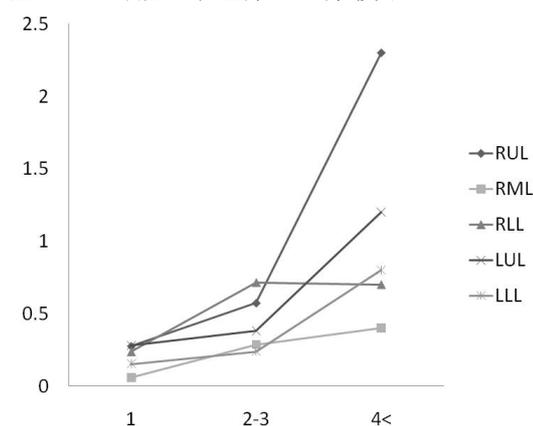
ソーティングされた SP 分画の細胞数は 3079 細胞から 5026 細胞であった。これらのソートされた SP 細胞とそれ以外の細胞との遺伝子変異の差異を検討しようとしたが、遺伝子変異の測定時の PCR が上手く働かなかった。この原因として細胞浮遊液作成過程に問題がある可能性があったが、主として細胞量が不足していると考えられた。

肺は右は上葉、中葉、下葉と別れ、左は上葉、下葉と分かれている。癌幹細胞の局在を検討するため、肺癌、特に多発肺癌に注目し、その局在を検討した。2006 年 4 月から 2010 年 12 月までに手術を施行した患者中、①単発肺癌 294 例、②2-3 個多発肺癌 21 例、③4 個以上多発肺癌 10 例に分け、その肺葉の局在を検討した。

右上葉には単発例では平均 0.3 個、病変数が 2-3 個の症例では平均 0.6 個、病変数が 4 個以上の症例では平均 2.3 個であった。多発すればするほど、右上葉に集積される傾向が見られた。

(RUL: 右上葉, RML: 右中葉, RLL: 右下葉, LUL: 左上葉, LLL: 左下葉)

図 6. 肺癌の右上葉での集積率



多発する場合には特に右上葉に肺癌の発生頻度が高く、肺癌発生を促進する何らかの要因があると考えられた。次に、多発肺癌に焦点を当て、肺癌発生に遺伝子背景を検討した。4 個以上の病変を有する症例の肺癌組織をマイクロダイセクションを行い、腫瘍組織のみを抽出し、遺伝子変異の測定を行った。

表 1. 遺伝子変異結果

	Site of Lobe	EGFR mutation	KRAS mutation	P53 mutation
111	RUL	Exon 21: L858R	Wild type	Wild type
121	LLL	Wild type	Wild type	Exon8: codon262
122	LLL	Exon 21: L858R	Wild type	Wild type
511	LLL	Wild type	Wild type	Wild type
521	LLL	Wild type	Wild type	Wild type
522	LLL	Wild type	Wild type	Wild type
711	RUL	Exon 21: L858R	Wild type	Wild type
712	RUL	Wild type	Wild type	Wild type
713	RUL	Wild type	Wild type	Wild type
811	RUL	Exon 21: L858R	Wild type	Wild type
812	RUL	Exon 21: L858R	Wild type	Wild type
813	RUL	Wild type	Wild type	Wild type

EGFR に関して、Exon21 L858R の変異を認めた病変が 12 病変中 5 個であり、残りは Wild type であった。Kras に関しては全例 Wild type であった。12 病変中 7 個が右上葉であったが、右上葉に存在する病変では Exon21 L858R の変異が多い傾向であり、多発肺癌の発癌に関与する可能性が示唆された。

以上より、肺癌幹細胞は右上葉に多く局在する可能性が示唆され、発癌に特定の遺伝子変異が関与する可能性が示唆された。

まとめ

平成 21 年度の研究では、免疫組織学的手法により肺癌幹細胞の局在を検討したが、非小細胞肺癌の CD133 陽性率は非常に低かった。しかし、その後のソーティングによる CD133 陽性細胞の検出では、平均 9.1% の陽性率で

あった。CD133 による局在の検討は困難であったため、Side population (SP) 細胞による検討を行った。平成 22 年度の研究では、SP 細胞と非 SP 細胞との遺伝子背景の比較を行ったが、ソートされる細胞数が少なかった。肺全体での発癌率に局在があると仮定し、その検討を行ったが、特に多発肺癌では右上葉に有意に発癌率が高く、肺全体の中もおそらく癌幹細胞の偏りが存在することが示唆された。多発肺癌の遺伝子学的背景の検索では、特定の遺伝子がこの現象に関与する可能性が示された。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 浩由紀 (KANEDA HIROYUKI)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：20411522

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし