

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890011

研究課題名（和文） 骨髄由来間葉系幹細胞を用いた肺癌幹細胞標的新規治療法の開発

研究課題名（英文） Establishment of new strategy for targeting lung cancer stem cells by using bone marrow-derived mesenchymal stem cells

研究代表者

兼平 雅彦 (KANEHIRA MASAHIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：90374941

研究成果の概要（和文）：肺癌細胞株 A549 は、骨髄由来間葉系幹細胞（BMMSCs）との共培養により、幹細胞のプールである SP 分画の割合が減少した。また、Shh、BMP4、及び Muc5AC の発現が上昇した。このことから、BMMSCs は A549 の癌幹細胞を分化させている可能性が示唆された。次に、BMMSCs から産生される SP 分画を減少させる因子を探索したところ、BMMSCs は Fgf10 産生を亢進し、中和抗体により BMMSCs の SP 分画減少効果は消失した。

研究成果の概要（英文）：Side population in A549 decreased by co-culturing with bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BMMSCs). Moreover, expression levels Shh, BMP4 and Muc5AC in A549 were increased. These data suggest that BMMSCs would drive tumor stem cells in A549 toward differentiated. Moreover, production of Fgf10 was promoted in existence of A549, and neutralization of Fgf10 cancelled the SP decreasing effect of BMMSCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,040,000	312,000	1,352,000
2010 年度	890,000	267,000	1,157,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,930,000	579,000	2,509,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：呼吸器内科学

キーワード：肺癌 癌幹細胞 骨髄由来間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

骨髄由来間葉系幹細胞（Bone marrow-derived mesenchymal stem cells；以下 BMMSCs）は、骨髄に存在する脂肪細胞、軟骨細胞ならびに骨芽細胞への分化能を有する細胞として発見された。しかし今日では、骨髄のみならず、臍帯血、月経血、滑膜、肺、海綿骨骨梁部、皮膚、歯髄などに存在することが報告されている。また、骨格筋細胞、

心筋細胞、肝細胞、神経細胞など、胚葉を越えた種々の細胞への分化能を有することが報告されており、胚性幹細胞（ES 細胞）、造血幹細胞、iPS 細胞にならび、再生医学の分野で注目されている細胞である。一方で、癌組織は癌実質と間質（stroma）より構成されるが、間質は癌の支持組織として働き、癌細胞へ増殖能ならびに転移能を賦与することが知られている。間質を構成する細

胞として、癌関連線維芽細胞、マクロファージ、血管内皮細胞等が知られているが、骨髄由来細胞の存在が示唆されており、近年、BMMSCs は癌細胞へ増殖能ならびに転移能を賦与する間質細胞 (stromal cell) として機能するという報告が相次いでなされている。

2. 研究の目的

近年、癌研究において、癌は均一な細胞集団ではなく、“癌幹細胞”を頂点とした種々の分化段階の細胞より構成されるヘテロな細胞集団であるという新しい概念が導入されている。BMMSCs が癌細胞へ増殖能ならびに転移能を賦与する間質細胞として機能する一方で、BMMSCs は骨髄において造血系幹細胞の未分化能を維持することは古くから知られている。そこで本研究では、BMMSCs 存在下での癌細胞の挙動を癌幹細胞の観点から明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験は主に、BMMSCs と肺癌細胞株 A549 の共培養と、A549 ならびに BMMSCs 単独培養を比較することで行なった。BMMSCs と A549 の挙動をそれぞれ解析するため、両細胞をトランスウェル (コーニング社; 図 1) の上層と下層にフィルターを隔てて共培養した。その後、経時的に A549 を回収し、UV レーザーを搭載したフローサイトメトリー MoFlo XDP (ベックマンコールター社) を用いて SP (Side population; 蛍光色素 Hoechst33342 に染まらない細胞集団で癌幹細胞のプールと考えられている) 分画を指標に癌幹細胞の増減を解析した。また、A549 ならびに BMMSCs を経時的に回収し、種々の分子の発現を Western blotting によりタンパク質レベルで、real time PCR により mRNA レベルで解析した。

図 1



4. 研究成果

(1) 肺癌細胞株 A549 は BMMSCs と共培養することで、SP 分画の割合が有意に減少した (図 2)。このことから、BMMSCs は A549 中に存在する癌幹細胞を何らかの因子

により枯渇させている可能性を予想した。発生期の肺胞上皮細胞の分化・成熟には、肺の間葉組織 (間充織) より産生される種々の成長因子に関わることが報告されているが (図 3)、本研究では、BMMSCs が肺胞上皮細胞の発生時の分化・成熟における間葉組織と同様の機能を有することで A549 の分化を促進していると予想し、肺胞上皮細胞の分化に関わる成長因子の増減をタンパク質ならびに mRNA レベルで解析した。その結果、Shh (Sonic Hedgehog) の発現がタンパク質レベルで、BMP4 (Bone morphogenetic protein 4) ならびにムチンの一種である Muc5AC の発現が mRNA レベルで上昇していることを明らかにした (図 4)。このことから、BMMSCs は A549 中に存在する癌幹細胞を枯渇させると同時に、分化の方向へドライブさせている可能性が示唆された。

図 2

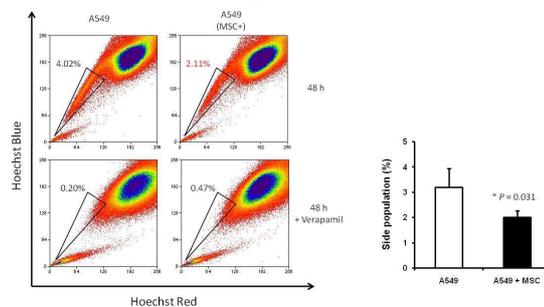


図 3

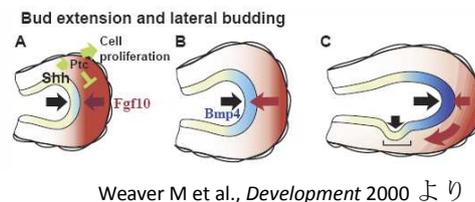
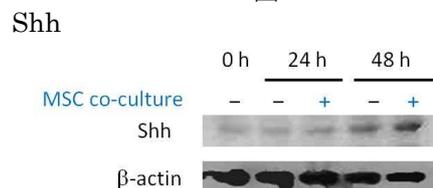
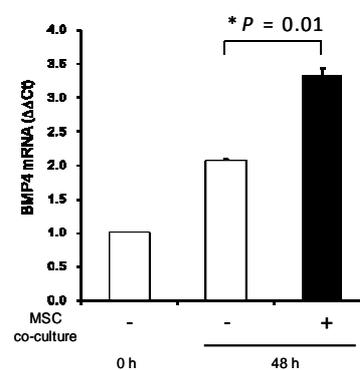


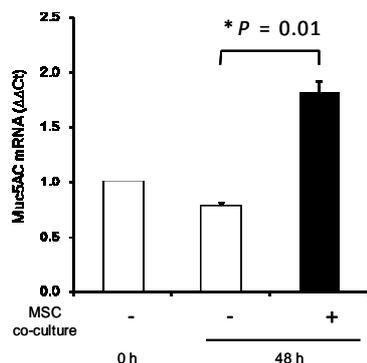
図 4



BMP4



Muc5AC



(2) 発生期の肺胞上皮細胞の分化ならびに成熟には、間葉組織より産生される Fgf10 (Fibroblast growth factor 10) が重要な働きをすることが報告されている。そこで、BMMSCs の Fgf10 の発現を調べたところ、BMMSCs は A549 存在下で Fgf10 の発現をタンパク質レベル、mRNA レベルいずれにおいても上昇させることを明らかにした (図 5)。さらに BMMSCs による A549 の分化促進における Fgf10 の機能を、Fgf10 の中和抗体を加えることにより確認したところ、BMMSCs による A549 の SP 分画減少能は消失した (図 6)。このことから、BMMSCs は発生期の肺の間葉組織と同様に Fgf10 産生を介して肺胞上皮細胞を分化させる機能を有していることが明らかになった。そして、Fgf10 が A549 の癌幹細胞を枯渇させ、分化を促進させている可能性が示唆された。

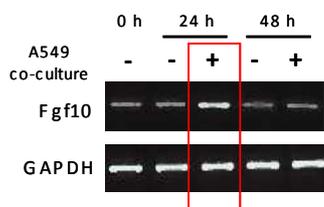
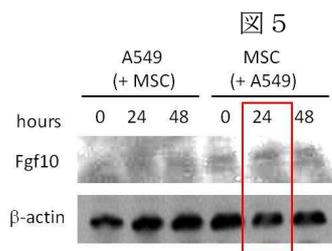


図 5

図 6

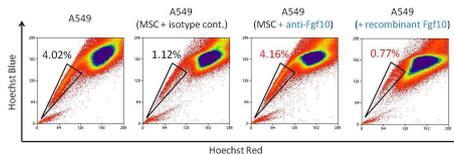
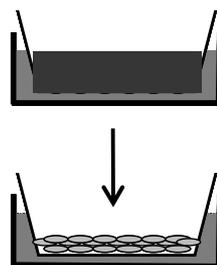


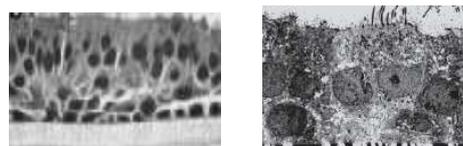
図 7



※ALI (Air-Liquid Interphase) Culture の概略

トランスウェルの上層で A549 をコンフルエントになるまで培養する。コンフルエントになった後、上層より培地を抜き、気層への暴露を行うとともに、下層に分化誘導培地を加え分化誘導を行なう。分化能は細胞表面への粘液の産生や、電子顕微鏡像ならびに免疫染色による肺胞上皮構造の再構築を指標に評価する (図 8)

図 8



(4) 今後、Fgf10 による癌幹細胞枯渇効果に加え、各種抗癌剤の併用による抗癌剤への感受性の増大の有無について in vitro、in vivo の両面から詳細に検討していく予定である。同時に、Fgf10 の癌幹細胞枯渇効果が、一旦退縮した癌の再発 (再増殖) を防止することができるかについても検討していく予定である。

(5) 本研究により、BMMSCs が肺癌細胞株 A549 の癌幹細胞を枯渇させると同時に分化を誘導すること、加えて、BMMSCs より産生される Fgf10 がその機能 (の一部) を担うことが明らかとなった。BMMSCs により A549 が分

化の方向にドライブされたことは、SP 減少効果（癌幹細胞の枯渇）による結果なのか否かは今後の解析が必要であると思われた。また、Fgf10 は A549 の SP 分画減少には十分なであったが、分化の誘導に関する役割を今後明らかにする予定である。癌幹細胞は盛んな薬剤排出能と低分裂能を有することから、癌細胞に対し抗癌剤への抵抗性を賦与すると同時に、癌の再発に関わっていることが報告されている。本研究により、肺癌において Fgf10 が癌幹細胞を枯渇させると同時に、癌の分化を促進できる可能性があるという新たな知見が得られた。このことは、Fgf10 が肺癌の化学療法において、抗癌剤への感受性を増大させると同時に再発を防止できるという新たな可能性を示唆するものである。これまでに癌細胞を分化させる治療法は急性骨髄性白血病における ATRA (All trans Retinoic Acid) 療法のみであったが、本研究は肺癌の化学療法において新たな system を開拓する一助になるものと期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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) 研究代表者

兼平 雅彦 (KANEHIRA MASAHIKO)
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：90374941

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：