

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16527

研究課題名(和文) 肺癌の幹細胞化と治療抵抗性のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of lung cancer stem cell transformation and treatment resistance

研究代表者

本野 望 (MOTONO, Nozomu)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：30634901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：異なる腺癌細胞株でのTeashirt homolog 2(TSHZ2)の発現の差を検証し、pDsRed-monomer-C1-TSHZ2で処理されたPC9細胞株ではTSHZ2の発現は亢進していたが、siRNA-TSHZ2で処理されたA549細胞株ではTSHZ2の発現は減弱していた。次に、PC9細胞株でTSHZ2を過剰発現させたところ、細胞増殖が著しく抑制された。さらに、pDsred-monomer-C1-TSHZ2で処理したPC9細胞株ではアポトーシスに陥った細胞数は有意に多かった。このことから、TSHZ2の高発現群で細胞増殖が抑制され、予後が良好であることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

予後不良を引き起こす因子が癌幹細胞の活性化に関与するとの仮説を立てて、肺癌の多くを占める肺腺癌を標的とし、癌の浸潤・増殖および予後に影響を及ぼす因子を解析した。TSHZ2の発現低下による増殖能の活性化、アポトーシスの抑制を確認した。以前の研究でSPHK1が肺癌の浸潤部のfibroblastで高発現することで増殖能が活性化すること、SPHK1高発現例は予後不良となる傾向も認めている。今後、これらの因子が肺癌の癌幹細胞の活性化に寄与するかを検証・解明し創薬につなげることができれば、治療抵抗性の肺癌の治療成績を劇的に向上させる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To verify the differential expression of Teashirt homolog 2(TSHZ2) in different adenocarcinoma cell lines, PC9 and A549 cell lines were treated and TSHZ2 expression was assessed by Western blotting. TSHZ2 expression was upregulated in PC9 cell lines treated with pDsRed-monomer-C1-TSHZ2, whereas TSHZ2 expression was attenuated in A549 cell lines treated with siRNA-TSHZ2. Overexpression of TSHZ2 in PC9 cell lines significantly suppressed cell proliferation compared with cells treated with pDsred-monomer-C1-empty. Furthermore, cells treated with pDsred-monomer-C1-TSHZ2 formed only about 100 clones over the next 14 days, which was significantly less than the others. In addition, when the effect of TSHZ2 expression on apoptosis was evaluated by flow cytometry, the number of apoptotic cells was significantly higher in the PC9 cell line treated with pDsred-monomer-C1-TSHZ2 compared to the control group.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 幹細胞 スフィンゴリン脂質 TSHZ2

1. 研究開始当初の背景

肺癌は世界において癌死の首座を占める臨床上の最重要疾患であり、今後も増加が予想されている。癌細胞の特徴は無限の増殖と浸潤・転移能である。増殖性に対する制御に関して、抗癌剤に加え、近年では driving mutation や angiogenesis に着目した分子標的治療の開発が精力的に展開されている。また、免疫療法の進歩も著しく、肺癌の治療成績は向上している。しかしながら、治療効果はある一定期間に限定され、効果を占めず群も限定されているのが現状である。原因として、治療抵抗性の癌幹細胞による自己複製能・多分化能と、それに伴う癌組織の不均一性が考えられる。また、浸潤・転移は複数のステップから構成される複雑な現象であり、癌の増殖抑制における driving mutation のようにピンポイントで制御可能な点がこれまで明らかでなかったためと考えられる。複数の異なるパスウェイの統合に関わる細胞膜構成成分であるスフィンゴリン脂質の細胞膜での再配分・細胞骨格再構成や、セリンプロテアーゼインヒビター(serpin)やマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)による癌の移動・浸潤能亢進が治療抵抗性を生じ、さらにそれらの因子が肺癌幹細胞の活性化および増殖を促進するのでは？という仮説に至り、新たな転移制御法確立に向け、その検証が必要となった。

2. 研究の目的

これまでに研究してきた抗酸化酵素(PRD4)や核内蛋白(TSHZ2)の肺癌における発現と作用機序および癌幹細胞化への関与を探索するのが目的である。PRDX4をはじめとする機能分子による癌浸潤抑制および癌幹細胞の不活化という新たな観点から、これまでにない肺癌治療が確立できることが期待される。また、肺癌の浸潤・転移能の獲得、さらに幹細胞化の機序を解明することはこれまでの肺癌研究での報告はなく独創的であり、治療抵抗性の肺癌の治療成績を劇的に向上させる可能性がある。さらに、肺癌幹細胞における知見は、多臓器のがんに対する制御法の確立への応用へと発展することが期待される。

3. 研究の方法

(1)肺腺癌における TSHZ2 発現の検証

PC9 および A549 細胞株を pDsRed-monomer-C1-TSHZ2 あるいは SiRNA-TSHZ2 で処理し、ウエスタンブロット法により TSHZ2 の発現を評価した。

(2) 肺腺癌における TSHZ2 の発現と細胞増殖・遊走・アポトーシスとの関連の評価

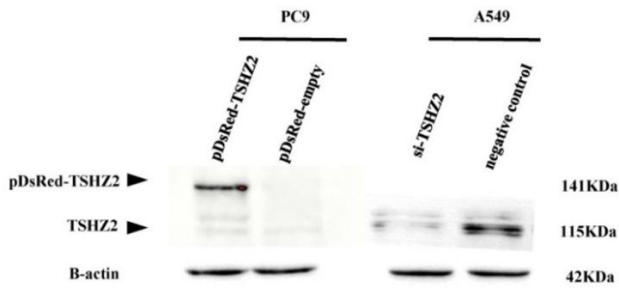
PC9 および A549 細胞株を用い、細胞増殖・遊走・アポトーシスへの影響を CCK8 アッセイおよびクローン形成アッセイにより評価した。

4. 研究成果

(1) 肺腺癌における TSHZ2 発現の検証

異なる腺癌細胞株での TSHZ2 の発現の差を検証するため、PC9 および A549 細胞株を pDsRed-monomer-C1-TSHZ2 あるいは siRNA-TSHZ2 で処理し、ウエスタンブロット法により TSHZ2 の発現を評価した。pDsRed-monomer-C1-TSHZ2 で処理された PC9 細胞株では TSHZ2 の発現は亢進していたが、siRNA-TSHZ2 で処理された A549 細胞株では TSHZ2 の発現は減弱していた (図 1)。

図1 ウエスタンブロット法



(2) 肺腺癌における TSHZ2 の発現と細胞増殖・遊走・アポトーシスとの関連の評価

PC9 および A549 細胞株を用い、細胞増殖・遊走・アポトーシスへの影響を CCK8 アッセイおよびクローン形成アッセイにより評価した。PC9 細胞株で TSHZ2 を過剰発現させたところ、pDsred-monomer-C1-empty で処理した細胞と比較して細胞増殖を著しく抑制した (図 2)。さらに pDsred-monomer-C1-TSHZ2 で処理した細胞はその後 14 日間で 100 程度のクローン形成にとどまり、他と比較し著明に少なかった (図 3)。

図2 TSHZ2発現による細胞増殖抑制

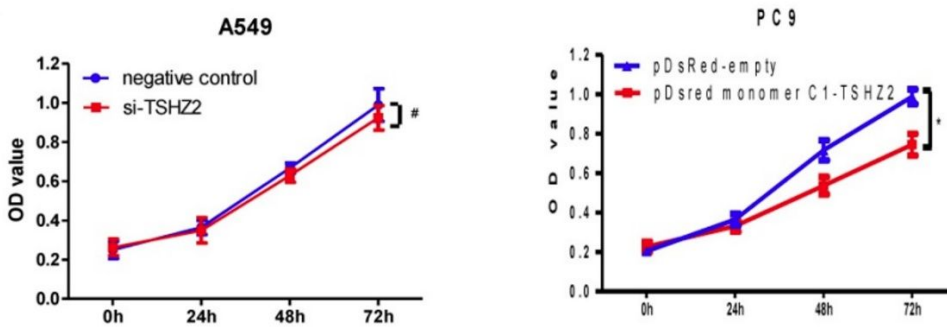
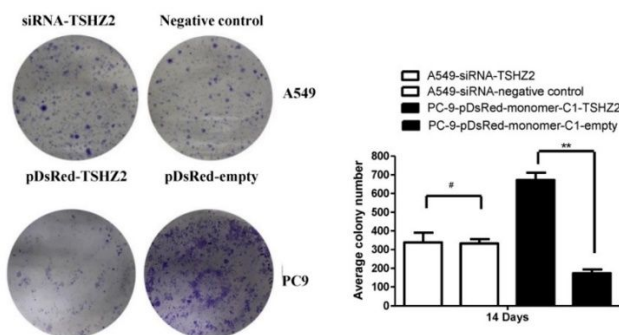


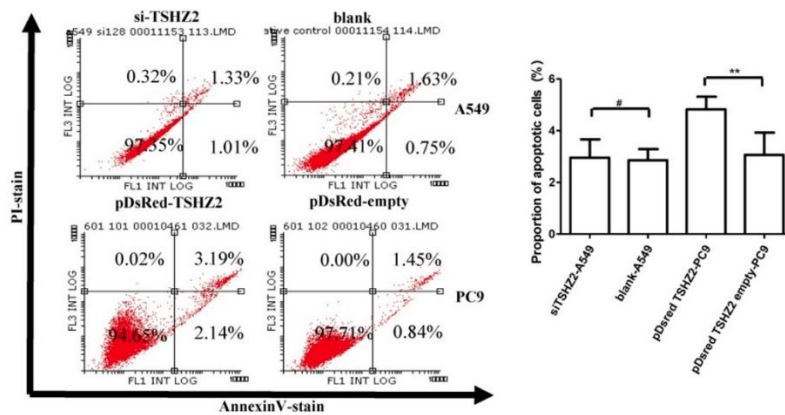
図3 クローン形成アッセイ



次に、TSHZ2 発現によるアポトーシスへの影響をフローサイトメトリーで評価した。pDsred-monomer-C1-TSHZ2 で処理した PC9 細胞株ではコントロール群と比較し、アポトーシスに陥った

細胞数は有意に多かった (図 4)。

図4 フローサイトメトリー



予後不良を引き起こす因子が癌幹細胞の活性化に関与するとの仮説を立てて、肺癌の多くを占める肺腺癌を標的とし、癌の浸潤・増殖および予後に影響を及ぼす因子を解析した。TSHZ2 の発現低下による増殖能の活性化、アポトーシスの抑制を確認した。過去の研究で SPHK1 が肺癌の浸潤部の fibroblast で高発現することで増殖能が活性化すること、SPHK1 高発現例は予後不良となる傾向を認めている。今後、これらの因子が肺癌の癌幹細胞の活性化に寄与するかを検証・解明し創薬につなげることができれば、治療抵抗性の肺癌の治療成績を劇的に向上させる可能性がある。

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
---------	---------