

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：33303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20726

研究課題名（和文）In silico解析を活用したEGFRシグナル非依存的な肺がん幹細胞の新規治療標的の探索

研究課題名（英文）Exploring novel therapeutic targets for EGFR signaling-independent lung cancer stem cells using in silico analysis

研究代表者

堀江 哲寛（HORIE, Tetsuhiro）

金沢医科大学・総合医学研究所・助教

研究者番号：00965139

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：肺がんの再発や転移の原因の一つとして、「がん幹細胞（CSC）」の存在が指摘されている。CSCは既存の治療法に対して抵抗性を持ち、根治にはCSCの除去が重要だが、CSCの幹細胞性制御機構はほとんど明らかとなっていない。また、一部の肺腺がん患者で原因遺伝子の特性が不明である。本研究では、EGFR遺伝子に変異を持たない非小細胞性肺がんに着目し、CSCの新規機能制御因子を探索した。ヒト肺がん組織のシングルセルRNAシーケンス解析から、CSCで発現が顕著に上昇している遺伝子Xを発見した。この結果を、培養細胞を用いてバリデーションした結果、Xはタンパク質レベルでもCSCで高発現していることを確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺がんは世界で最も患者数が多いがんである。近年、様々な治療薬が用いられているものの、多くの患者で再発・転移が認められており依然として予後が悪いがんである。その原因としてがん幹細胞（CSC）の存在が指摘されている。CSCは多くのがん細胞を生み出すことができるため、CSCを除去することががんの完治につながると考えられている。しかしCSCは既存の薬物治療や放射線療法に対して抵抗性を持つことから、CSCを標的とする新たな治療薬の開発が期待されている。本研究では、新たな治療標的として遺伝子Xを提唱した。Xの阻害剤はすでに開発されていることから、これらの化合物が新たな抗がん剤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Cancer stem cells (CSCs) have been identified as one of the causes of recurrence and metastasis, which is a problem in the treatment of lung cancer. CSCs are resistant to existing therapies, and removal of CSCs is important for complete cure, but the mechanisms of regulating stemness are largely unknown. In addition, the characteristics of the driver genes are unknown in some lung adenocarcinoma patients. In this study, we focused on non-small cell lung cancers without mutations in the EGFR gene and searched for novel regulators of CSC function. From single-cell RNA sequencing analysis of human lung cancer tissues, we found gene X, whose expression is markedly upregulated in CSCs. Validation of these results using cultured cells confirmed that X is also highly expressed in CSCs at the protein level.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん幹細胞 バイオインフォマティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺がんは世界で最も患者数が多いがんであり、集学的治療が用意されているにも関わらず患者数は依然として増加傾向にある。肺がんは再発率・転移率が高いことが知られているが、その原因として「がん幹細胞」の存在が指摘されている。少数のがん幹細胞から多くのがん幹細胞が産生されるため、がん幹細胞の除去が肺がんの根治に重要であると考えられる。しかし、がん幹細胞は既存の治療法に対して抵抗性を持つことから、がん幹細胞を標的とした新たな治療薬の開発が求められている。また、多くの肺がん患者では *EGFR* 遺伝子の変異が認められている一方、一部の肺がん患者では原因遺伝子の特性が分かっておらず、分子標的薬を含む効果的な治療薬が存在しないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、特に *EGFR* 遺伝子に変異が認められない肺がんに着目し、肺がん幹細胞の新規幹細胞性制御因子の探索を通して、肺がん幹細胞を標的とした新規治療戦略を提唱することを目的とした。

3. 研究の方法

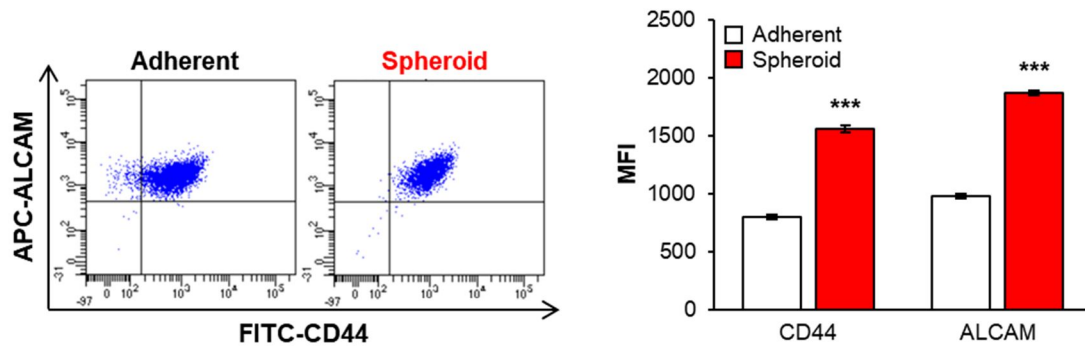
公共データベースにデポジットされている、ヒト肺がん組織のシングルセル RNA シークエンスデータを再解析することで、がん幹細胞で発現が上昇している遺伝子を網羅的に探索した。臨床的意義や分化との関連について検討するため、見つかった遺伝子について生存解析や trajectory 解析を行った。最後に、これらの遺伝子が実際にがん幹細胞で高発現しているかどうかを評価するため、ヒト肺がん細胞株 A549 細胞を用いた *in vitro* 実験を実施した。

4. 研究成果

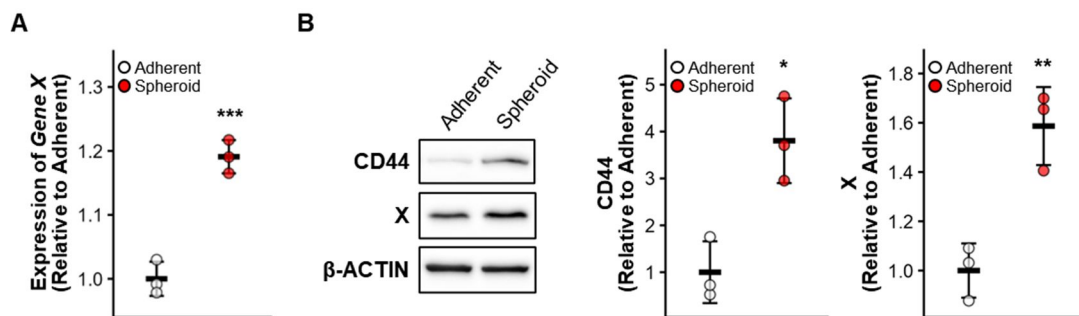
はじめに、公共データベースにデポジットされている 2 種類のヒト肺がん組織のシングルセル RNA シークエンスデータから、*EGFR* 遺伝子に変異を持たない患者のデータを選択して再解析した。(がん)幹細胞に関連する遺伝子セットを用いた single-sample gene set enrichment analysis によって、がん細胞をがん幹細胞とそれ以外のがん細胞に分類した。このとき、肺がん幹細胞では、代表的な肺がん幹細胞マーカーである *MYC* や *EPCAM*、*CD44* の発現が有意に高かったことから、この方法で肺がん幹細胞とがん細胞を区別できていることを確認できた。続いて、肺がん幹細胞で有意に発現が上昇している遺伝子を網羅的に探索したところ、2 種類のデータセットで共通して発現上昇していた遺伝子が 15 あった。

臨床的意義について検討するため、The Cancer Genome Atlas データベースに収載されている肺がん患者のデータを用いて生存解析を行ったところ、前述の 15 遺伝子のうち、遺伝子 X の発現が高い患者群では有意に生存率が低下していることが分かった。さらに trajectory 解析を行ったところ、肺がん幹細胞が分化していくにつれて遺伝子 X の発現が低下していくことが明らかとなった。

ここまでのバイオインフォマティクス解析の結果をバリデーションするため、*EGFR* 遺伝子に変異を持たないことが報告されているヒト肺がん細胞株 A549 細胞を用いた *in vitro* 実験を行った。これまでに、A549 細胞を無血清培地中で浮遊培養することで幹細胞としての性質を獲得することが知られている。同様の方法で培養した結果、通常の接着培養と比較して、がん幹細胞マーカーである *ALCAM* や *CD44* の発現が有意に上昇していることがフローサイトメトリーによって明らかとなった【図 1】。続いて、接着培養細胞と浮遊培養細胞それぞれから mRNA を回収し、リアルタイム PCR によって遺伝子 X の発現を調べた結果、浮遊培養細胞で有意に上昇していることが分かった【図 2A】。同様にタンパク質を回収してウエスタンブロッティングを行ったところ、タンパク質レベルでも X の発現が浮遊培養細胞で有意に上昇していた【図 2B】。



【図 1】接着培養細胞 (Adherent) と浮遊培養細胞 (Spheroid) のフローサイトメトリーの結果 (MFI: mean fluorescence intensity, *** $P < 0.001$)



【図 2】(A) 接着培養細胞 (Adherent) と浮遊培養細胞 (Spheroid) での遺伝子 X の発現量 (B) 接着培養細胞と浮遊培養細胞での CD44 (がん幹細胞マーカー) と X の発現量 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

本研究より、X が肺がん幹細胞の新規マーカーであり、X を標的とした薬剤が肺がんに対する新規治療薬となることが期待される。これまでの報告から、X に対する阻害剤が既に複数開発されており、これらの化合物が肺がん幹細胞を除去できるかどうかを今後検討していく予定である。

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