

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501281

研究課題名(和文)細胞分化系列の理解に基づく肺癌幹細胞の形成維持機構の解析

研究課題名(英文)Cell lineage-related mechanisms involved in lung cancer stem cell development.

研究代表者

長田 啓隆(Osada, Hirotaka)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学部・室長

研究者番号：30204176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌細胞株からSphere形成細胞を樹立し、遺伝子発現解析や腫瘍原性解析によりこのSphere形成細胞が癌幹細胞としての特性を持つことが確認された。また神経内分泌マーカーも発現しており、Sphere形成に伴う細胞分化系列の可塑性も示唆された。更に神経内分泌分化系列を誘導するASH1をTet誘導システムで発現させるとSphere形成の促進も一部の細胞株で見られ、ASH1シグナルと肺癌幹細胞形成との関連性も示唆された。またASH1に制御されるlincRNAの肺癌幹細胞形成への寄与も示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sphere-forming cells were initially established from several different lung cancer cell lines, after which expression profiling and tumorigenesis assay findings indicated their cancer stem cell properties. In addition, expression of neuroendocrine-related genes in these cells suggests a possible association between sphere formation and cell lineage plasticity. Furthermore, neuroendocrine-inducing ASH1 has also been found to promote sphere formation in some cell lines, suggesting the involvement of ASH1 signaling in development of cancer stem cells.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：肺がん 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は自己複製能と分化能をもつ幼若細胞であるが、終末分化した細胞から多能性幹細胞が誘導される iPS 細胞の発見から、分化の可塑性・幹細胞の誘導性が注目されている。また近年、癌組織中にも癌幹細胞が存在し、自己複製能・分化能・腫瘍形成能を持つと考えられおり、更に浸潤・転移にも関与し、治療抵抗性であり、癌の治療において非常に重要と考えられている。さらに癌幹細胞も iPS 細胞のように、より分化した癌細胞から脱分化により誘導されることが示唆され、癌細胞の分化の可塑性・癌幹細胞の誘導性が注目されている。

したがって難治性癌である肺癌の治療戦略においても、肺癌幹細胞の検討は非常に重要である。しかしこの肺癌の癌幹細胞を検討する上で、正常肺組織の幹細胞が未だ詳細には解明されていないことが問題となる。肺胞上皮細胞等に分化する末梢肺幹細胞が存在すると考えられる一方、神経内分泌 (neuroendocrine, NE) lineage である PNEC (pulmonary NE cell) も自己複製能を有する幹細胞と考えられている。

このように正常気道上皮には非神経内分泌 lineage と神経内分泌 lineage の 2 種類の細胞系列が存在し、肺癌もこの非神経内分泌 lineage の幹細胞を発症母地として腺癌・扁平上皮癌等が、PNEC を発症母地として小細胞肺癌等の悪性度の高い神経内分泌肺癌が発症すると考えられる。

このような中、申請者はこの神経内分泌分化系列の肺癌と非神経内分泌分化系列の肺癌との癌幹細胞レベルでの関係や、肺癌細胞の分化の可塑性を検討するために、PNEC の発分化に必須な神経内分泌分化誘導分子 ASH1 (achaete scute complex homolog 1, ASCL1) を神経内分泌分化を有しない肺腺癌に導入した。すると、細胞分化の転換が起こり神経内分泌肺癌が誘導されると同時に、細胞形質の変化・造腫瘍能の亢進等が起こり、癌幹細胞類似の分化段階へ移行することを見出している (Osada et al. Cancer Res. '08、一部未発表)。又、ASH1 が神経内分泌肺癌の増殖に関与することを見出している (Osada et al. Cancer Res. '05)。ASH1 のシグナルは神経内分泌肺癌の増殖に非常に重要な機能を果たすと考えられる。このような申請者の知見は最近の他施設からの報告からも支持され、ASH1 が癌幹細胞維持にも重要であると考えられる (Jiang et al. Cancer Res. 69: 845, 09)。しかし、まだ全貌解明には至っていない。

2. 研究の目的

以上のような背景から、本研究では神経内分泌肺癌を中心に肺癌の癌幹細胞の形成維持機構を解明し、その知見を肺癌の治療に応用

していくことを目的とする。この目的のために、申請者が既に神経内分泌肺癌の増殖において重要な役割を担うと報告している神経内分泌分化の誘導因子 ASH1 のシグナルにも注目しつつ、具体的には、以下の 3 点を中心に解明していくことを目的とする。

肺癌由来 Sphere 細胞の癌幹細胞としての特性の検討：肺癌細胞株より Sphere 形成細胞を作成し、その癌幹細胞としての性質を、自己複製能・分化能・腫瘍形成能・浸潤転移能・細胞表面マーカー・遺伝子発現 signature 等多方面から検討し、肺癌幹細胞の特性を解明していく。

ASH1 signal と肺癌幹細胞との関連の検討：肺癌幹細胞の誘導・維持に神経内分泌分化が関与する可能性を考え、現在確立している ASH1 のテトラサイクリン (Tet) 誘導システムを用いて、各肺癌細胞株で ASH1 を誘導して、神経内分泌肺癌の癌幹細胞の誘導維持機構と ASH1 シグナルの機序を検討する。

ASH1 に制御される miRNA 及び lincRNA の検討：ASH1 により発現誘導及び発現抑制される miRNA・lincRNA を見出しており、これらの機能と、肺癌の増殖進展及び肺癌幹細胞形成への寄与を検討する。

3. 研究の方法

Sphere 培養

肺癌細胞株を既報の方法 (Bertolini et al. PNAS 106 16283, 2009) に沿って EGF, bFGF を添加した DMEM/F12 培地で培養し、Sphere 形成細胞を得た。

Expression profiling

Sphere 形成細胞から RNA 抽出し、Agilent 社の protocol に沿って、cRNA probe を作成した。それを Expression microarray (Agilent) にハイブリシ、遺伝子発現解析をした。

IVIS を用いた腫瘍原性解析

Sphere 形成細胞にレンチウイルスを用いて luciferase 遺伝子を導入し、その後、ヌードマウス (KSN Slc-nu/nu) に Sphere 形成細胞 1.5×10^6 を移植した。移植 30 日後に luciferin を腹腔内投与し、IVIS システム (Caliper-PerkinElmer) にて腫瘍量を定量した。

Tet 誘導性レンチウイルス作成

Tet 誘導性を持つレンチウイルスベクター CSIV-TRE-RfA-CMV-KT (理化学研究所バイオリソースセンター三好浩之氏より分与) に ASH1 cDNA を挿入した。このベクターを packaging ベクターと共に 293T 細胞へ導入してレンチウイルスを作成し、肺癌細胞株へ感染させた。感染した肺癌細胞株に

doxycycline (Dox)を添加し、ASH1 の発現を誘導した。

siRNA transfection

目的の lincRNA に対する double strand siRNA 及び対照 siRNA を購入 (一部は委託合成) し、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)を用いて、細胞内へ導入した。

Side population (SP)分画定量

肺癌細胞株に Hoechst 33342 を添加し、375nm の Near UV レーザーを用いた FACS 解析にて、SP 分画を定量した。

4. 研究成果

最初に肺癌幹細胞候補としての肺癌 Sphere 形成細胞を培養し、その特性を検討した。13 個の肺癌細胞株と 1 個の正常気道上皮由来細胞株で Sphere 培養を行い、約 2/3 の細胞株で Sphere 形成細胞を得た (図 1)。癌幹細胞マーカーの検討では、一部で CD133 発現誘導・ALDH 活性亢進がみられた (図 2)。

図 1 . Sphere の誘導性と可逆性。

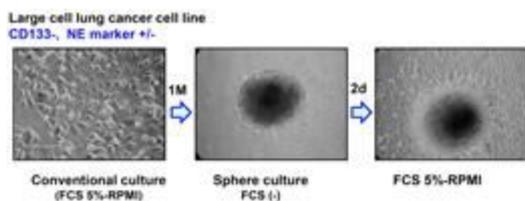
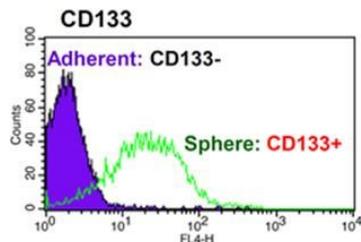
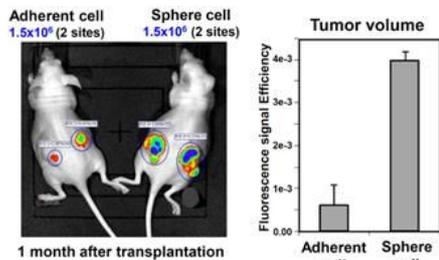


図 2 . Sphere 細胞に於ける CD133 の発現。



次に得られた Sphere 形成細胞の中から代表的な Sphere 形成細胞を選択し、免疫不全マウスに移植したところ、Sphere 細胞で造腫瘍能の亢進が見られた (図 3)。

図 3 . Sphere 細胞の腫瘍原性解析。



また、この代表的 Sphere 形成細胞から RNA を抽出して microarray を用いて網羅的な遺伝子発現 profile を解析した。その結果

Sphere 形成細胞では、幹細胞関連遺伝子の SOX2 や LIN28B の発現亢進が見られた (図 4)。また Wnt 及び Hedgehog シグナルは幹細胞性維持に関わると考えられているが、これらのシグナル伝達にかかわる遺伝子群の発現亢進が見られ、この Wnt 及び Hedgehog シグナルの活性化が示唆された (図 5)。

図 4 . Sphere 細胞における幹細胞関連遺伝子の発現。

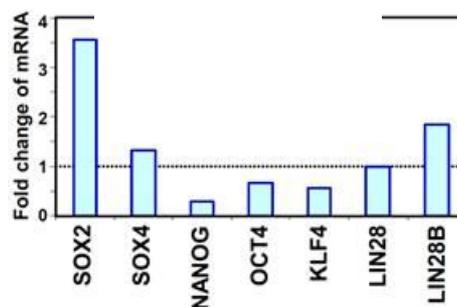
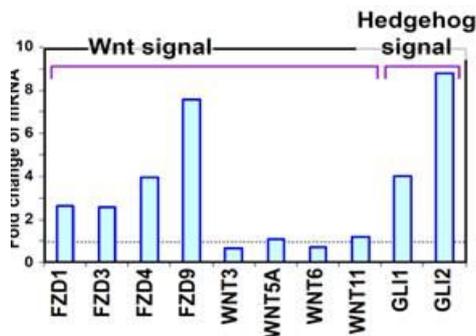
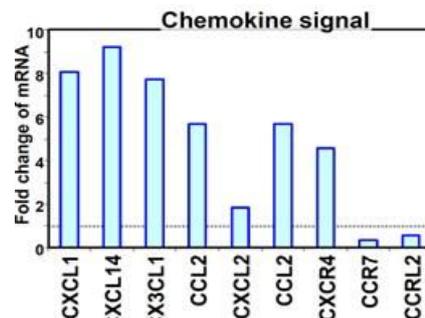


図 5 . Sphere 細胞における Wnt 及び Hedgehog シグナルの活性化。



また、多数のサイトカイン及びサイトカイン受容体の発現亢進も見られており (図 6)、これらの分子の幹細胞性維持への関与は、今後検討したい。

図 6 . Sphere 細胞におけるサイトカイン及びサイトカイン受容体の発現。



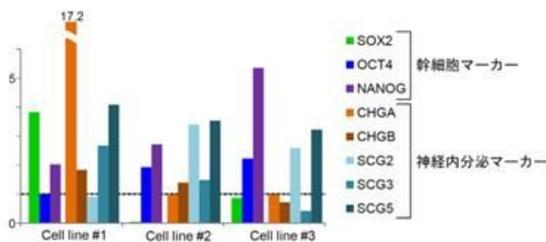
これらの結果は、今回検討した Sphere 形成細胞が癌幹細胞様の特性を持つことを示した重要な所見である。

一方、Sphere 形成における肺癌細胞分化系列の関与を検討するために、神経内分泌分化を誘導する ASH1 遺伝子の Tet 誘導ベクターを作成して、細胞分化系列の異なる (腺癌・扁平上皮癌・大細胞癌) 肺癌細胞株 5 種・正常

気道上皮由来細胞株 2 種に導入して Sphere 形成を行い、ASH1 シグナルと Sphere 形成能との関連を検討した。その結果、2 種類の細胞株で Sphere 形成が促進され、1 種類の細胞株では抑制が見られた。残り 4 種類では著明な差異は見られなかった。部分的にはあるが、神経内分泌分化と Sphere 形成能との関連が示唆された。このような結果は、肺癌幹細胞誘導において ASH1 が関わる細胞分化系列の重要性及び細胞株毎の多様性を示唆している。

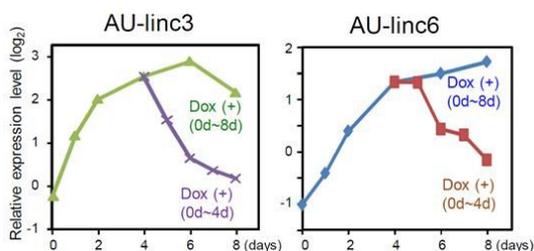
前述の Sphere 細胞に加えて更に 2 種類の Sphere 細胞を追加し、再び microarray による遺伝子発現 profile 解析を進めた。新たに検討した Sphere 細胞でも SOX2, OCT4(POU5F1), Nanog 等の幹細胞マーカーとされる遺伝子の発現亢進が見られた。このような遺伝子発現 profile から、新たに検討した Sphere 細胞も癌幹細胞の性質を持つことが示唆された。また、神経内分泌マーカーの発現亢進も見られ、Sphere 形成に伴い部分的にであれ細胞分化系列のシフトが起こっていることが示唆された(図 7)。

図 7 . 3 種類の Sphere 細胞における幹細胞及び神経内分泌に関連する遺伝子群の発現。



同時に遺伝子発現 profile の中で、蛋白をコードしない lincRNA 群の発現も検討した。検討した 3 種の Sphere 細胞では発現上昇する lincRNA が約 800 個見出され、この中のおよそ 30% の lincRNA が、共通して発現上昇していることが判明した。また神経内分泌分化を誘導する転写因子 ASH1 によって発現制御される lincRNA 群を見出し、機能解析を進めているが、これら ASH1 により制御される lincRNA の中でも、Sphere 細胞で共通して発現亢進している lincRNA として、ASH1-upregulated lincRNA-3 (AU-linc3) 及び AU-linc6 (Lab name)を同定した(図 8)。

図 8 . AU-linc RNA の ASH1 による発現誘導性。



次に、AU-linc3 及び AU-linc6 のノックダウンを行った。これら AU-linc の発現が亢進し

た Sphere 細胞の親細胞である肺癌細胞株に AU-linc3 及び AU-linc6 に対する siRNA を導入し、癌幹細胞との関連が想定されている SP 分画に対する作用を検討した。すると AU-linc のノックダウンにより、SP 分画が AU-linc3 で最大 40%、AU-linc6 で最大 80% の減少が見られた(図 9, 図 10)。対照として、癌幹細胞維持に関与することが知られている YAP1 及び TAZ のノックダウンを行い、SP 分画が同様に減少することを確認した。これらの結果により、肺癌幹細胞の形成・維持に、lincRNA が関与する可能性が示唆された。同時に ASH1 シグナルが lincRNA を介して肺癌幹細胞の形成・維持に関与する可能性も示唆され、本研究の目的である神経内分泌という肺癌の細胞系列と肺癌幹細胞形成との関連が示唆された。今後、この AU-linc3 及び AU-linc6 の機能解析を更に進め、肺癌幹細胞の形成・維持における役割を解明したい。

図 9 . siAU-linc3 及び siAU-linc6 による SP 分画の減少。

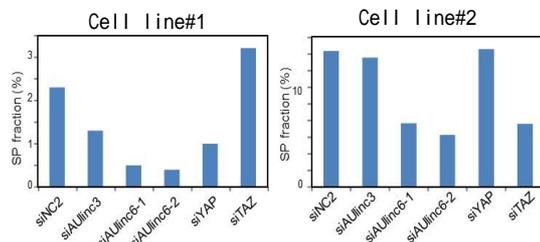
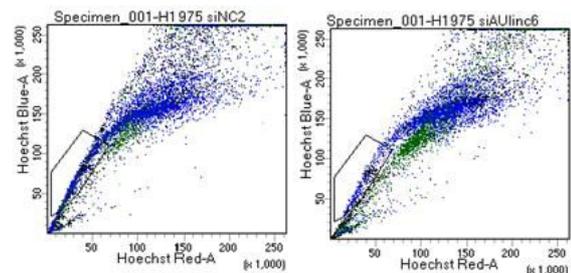


図 10 . siAU-linc6 による SP 分画の減少を示す FACS 解析。左: 対照 siRNA、右: siAU-linc6-1



以上の解析結果より、肺癌由来 Sphere 細胞の癌幹細胞としての特性が確認され、ASH1 シグナルと肺癌幹細胞との関連性も示唆された。更に ASH1 に制御される lincRNA の肺癌幹細胞形成への寄与を示唆する結果も得られた。したがって本研究の当初の目的をほぼ達成できたと考えている。

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 19 件)

1. Tanaka I, Osada H, Fujii M, Fukatsu A, Hida T, Horio Y, Kondo Y, Sato A, Hasegawa Y, Tsujimura T, Sekido Y. LIM-domain protein

- AJUBA suppresses malignant mesothelioma cell proliferation via Hippo signaling cascade. **Oncogene**. 査読有 (in press).
2. Fernandez-Cuesta L, Plenker D, Osada H, Sun R, Menon R, Leenders F, Ortiz-Cuaran S, Peifer M, Bos M, DaBler J, Malchers F, Schottle J, Vogel W, Dahmen I, Koker M, Ullrich RT, Wright GM, Russell PA, Wainer Z, Solomon B, Brambilla E, Nagy-Mignotte H, Moro-Sibilot D, Brambilla CG, Lantuejoul S, Altmuller J, Becker C, Nurnberg P, Heuckmann JM, Stoelben E, Petersen I, Clement JH, Sanger J, Muscarella LA, la Torre A, Fazio VM, Lahortiga I, Perera T, Ogata S, Parade M, Brehmer D, Vingron M, Heukamp LC, Buettner R, Zander T, Wolf J, Perner S, Ansen S, Haas SA, Yatabe Y, Thomas RK. CD74-NRG1 fusions in lung adenocarcinoma. **Cancer Discovery**. 査読有 4: 415-22, 2014
 3. Fukatsu A, Ishiguro F, Tanaka I, Kudo T, Nakagawa K, Shinjo K, Kondo Y, Fujii M, Hasegawa Y, Tomizawa K, Mitsudomi T, Osada H, Hata Y, Sekido Y. RASSF3 downregulation increases malignant phenotypes of non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**. 査読有 83: 23-9, 2014.
 4. Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Gao W, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Murakami S, Tanaka Y, Joh T, Sato S, Takahashi S, Wakita T, Zhu J, Issa JP, Kondo Y. Hepatitis virus infection affects DNA methylation in mice with humanized livers. **Gastroenterology**. 査読有 146: 562-72, 2014.
 5. Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, Fujii M, Kondo Y, Usami N, Taniguchi T, Yokoi K, Osada H, Sekido Y. Membranous expression of activated leukocyte cell adhesion molecule contributes to poor prognosis and malignant phenotypes of non-small-cell lung cancer. **J Surg Res**. 査読有 179: 24-32, 2013.
 6. Yamaguchi T, Yanagisawa K, Sugiyama R, Hosono Y, Shimada Y, Arima C, Kato S, Tomida S, Suzuki M, Osada H, Takahashi T. NKX2-1/TITF1/TTF-1-Induced ROR1 is required to sustain EGFR survival signaling in lung adenocarcinoma. **Cancer Cell**. 査読有 21: 348-61, 2012.
 7. Mizuno T, Murakami H, Fujii M, Ishiguro F, Tanaka I, Kondo Y, Akatsuka S, Toyokuni S, Yokoi K, Osada H, Sekido Y. YAP induces malignant mesothelioma cell proliferation by upregulating transcription of cell cycle promoting genes. 査読有 **Oncogene**. 31: 5117-22, 2012.
 8. Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, Fujii M, Kondo Y, Usami N, Yokoi K, Osada H, Sekido Y. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) promotes malignant phenotypes of malignant mesothelioma. **J Thorac Oncol**. 査読有 7: 890-899, 2012.
 9. Fujii M, Toyoda T, Nakanishi H, Yatabe Y, Sato A, Matsudaira Y, Ito H, Murakami H, Kondo Y, Kondo E, Hida T, Tsujimura T, Osada H, Sekido Y. TGF- β synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. **J Exp Med**. 査読有 209: 479-94, 2012.
 10. Shinjo K, Okamoto Y, An B, Yokoyama T, Takeuchi I, Fujii M, Osada H, Usami U, Hasegawa Y, Ito H, Hida T, Fujimoto N, Kishimoto T, Sekido S, Kondo Y. Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with distinct clinical characters of lung adenocarcinoma. **Carcinogenesis**. 査読有 33: 1277-85, 2012.
 11. Katsushima K, Shinjo K, Natsume A, Ohka F, Fujii F, Osada H, Sekido Y, Kondo Y. Contribution of microRNA-1275 to Claudin 11 expression via polycomb-mediated silencing mechanism in human glioma stem-like cells. **J Biol Chem**. 査読有 287: 27396-27406, 2012.
 12. Suda K, Tomizawa K, Osada H, Maehara Y, Yatabe Y, Sekido Y, Mitsudomi T. Conversion from the “oncogene addiction” to “drug addiction” by intensive inhibition of the EGFR and MET in lung cancer with activating EGFR mutation. **Lung Cancer**. 査読有 76: 292-9, 2012.
 13. Elshazley M, Sato M, Hase T, Takeyama Y, Yamashita R, Yoshida K, Toyokuni S, Ishiguro F, Osada H, Sekido Y, Yokoi K, Usami N, Shames DS, Kondo M, Gazdar AF, Minna JD, Hasegawa Y. The circadian clock gene BMAL1 is a novel therapeutic target for malignant mesothelioma. **Int J Cancer**. 査読有 131: 2820-31, 2012.
 14. Okamoto Y, Sawaki A, Ito S, Nishida T, Takahashi T, Toyota M, Suzuki H, Shinomura Y, Takeuchi I, Shinjo K, An B, Ito H, Yamao K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Kataoka H, Joh T, Sekido Y, Kondo Y. Aberrant DNA methylation associated with aggressiveness of gastrointestinal stromal tumour. **GUT**. 査読有 61: 392-401, 2012.
 15. Osada H and Takahashi T. let-7 and miR-17-92: Small-sized major players in lung cancer development. **Cancer Sci**. 査読有 102:9-17, 2011.
 16. Nishikawa E, Osada H, Okazaki Y, Arima C, Tomida S, Tatematsu Y, Taguchi A, Shimada Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Toyokuni S, Sekido Y, Takahashi T. miR-375 is activated by ASH1 and inhibits YAP1 in a lineage dependent manner in lung cancer. **Cancer Res**. 査読有 71: 6165-6173, 2011.
 17. Murakami H, Mizuno T, Taniguchi T, Fujii M, Ishiguro F, Fukui T, Akatsuka S, Horio Y, Hida T, Kondo Y, Toyokuni S, Osada H, Sekido Y. LATS2 is a tumor suppressor gene of malignant mesothelioma. **Cancer Res**. 査読有 71: 873-883, 2011.

18. Suda K, Tomizawa K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Maehara Y, Yatabe Y, Sekido Y, Mitsudomi T. Epithelial to mesenchymal transition in an EGFR-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib. **J Thorac Oncol**. 査読有 6: 1152-1161, 2011.

19. Ju HX, An B, Okamoto Y, Shinjo K, Kanemitsu Y, Komori K, Hirai T, Shimizu Y, Sano T, Sawaki A, Tajika M, Yamao K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Ito H, Takeuchi I, Sekido Y, Kondo Y. Distinct profiles of epigenetic evolution between colorectal cancers with and without metastasis. **Am J Pathol**. 査読有 178: 1835-1846, 2011.

〔学会発表〕(計 5件)

1. Osada H, Yagi K, Yanagisawa K, Akatsuka J, Tatematsu Y, Kato S, Yatabe Y, Ono K, Sekido Y, Takahashi T. Functional analysis of CLCP1 as potential target for lung cancer diagnostics and therapeutics. 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Oral Session), Yokohama, October 3-5, 2013.

2. Osada H, Yagi K, Yanagisawa K, Akatsuka J, Tatematsu Y, Kato S, Yatabe Y, Ono K, Sekido Y, Takahashi T. Analysis of CLCP1, a potential target for lung cancer diagnostics and therapeutics. 36th Molecular Biology Society of Japan (Poster Session), Kobe, December 3-6, 2013.

3. Osada H, Yagi K, Yanagisawa K, Akatsuka J, Tatematsu Y, Kato S, Yatabe Y, Ono K, Sekido Y, Takahashi T. Functional analysis of CLCP1 as a potential target for lung cancer diagnostics and therapeutics. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Oral Session), Sapporo, September 19-21, 2012.

4. Osada H, Nishikawa E, Arima C, Okazaki Y, Tomida S, Tatematsu Y, Taguchi A, Shimada Y, Yanagisawa K, Toyokuni S, Sekido Y, Takahashi T. Roles of ASH1-miR-375 pathway in development of lung cancers with neuroendocrine features. 102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (Poster). Orlando, USA, April 2-6, 2011.

5. Osada H, Takahashi T. Roles of ASH1-regulated miRNAs and lincRNAs in lung cancer development. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Symposium), Nagoya, October 3-5, 2011.

〔図書〕(計 1件)

長田 啓隆、高橋 隆. microRNA 発現異常と発癌 実験医学増刊 29 (2): 56-61, 2011

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ:

http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/03bunshi_shuyo/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 啓隆 (OSADA HIROTAKA)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学部・室長

研究者番号: 30204176

(2) 研究分担者 無

(3) 連携研究者 無