

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2016

課題番号：24659404

研究課題名(和文) 上皮成長因子受容体遺伝子変異による発癌マウス肺からの幹細胞の同定

研究課題名(英文) Identification of stem cells from oncogenic mouse lungs by epithelial growth factor receptor gene mutation

研究代表者

佐藤 晃子(久本晃子)(SATO, AKIKO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30623532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：申請者の研究室で樹立されたEGFR遺伝子変異(マウスEGFRExon19 delE748-A752とヒトEGFRExon21L858R)をそれぞれ導入した遺伝子改変マウス()と野生型C57BL/6マウス()により生まれた胎仔を用い、分担研究者熊本大学伊藤隆明教授の指導で胎仔肺を摘出し器官培養を行った。肺の発生の過程における発癌を直接確認した。今後は胎仔肺の肺癌組織の一部を用いて培養にEGFR-TKIを添加し、EGFR-TKI感受性の変化についてMTTアッセイ法やWestern Blotting法や免疫染色などを用いて検討することを予定している。

研究成果の概要(英文)：We used fetuses born by genetically modified mouse () and wild type C57BL/6 mouse () which introduced EGFR gene mutation (mouse EGFRExon 19 delE 748 - A 752 and human EGFRExon 21 L 858 R) respectively established in the applicant 's laboratory, Researcher Fetal lung was excised and organ culture was carried out under the guidance of Professor Takaaki Ito of Kumamoto University. Carcinogenesis in the process of lung development was confirmed directly. In the future, we plan to add EGFR-TKI to a culture using a part of the lung cancer tissue of fetal lung and investigate changes in EGFR-TKI susceptibility using MTT assay, Western blotting method, immunostaining etc.

研究分野：肺癌

キーワード：BASCs EGFR遺伝子変異改変マウス 器官培養

1. 研究開始当初の背景
癌幹細胞という概念は長らくその実体は不明であったが、ヒト急性骨髄性白血病細胞を免疫不全マウスに移植して白血病を発生させることができるのは CD34⁺CD38⁻ の分画に存在する細胞だけであることを報告 (Nature 367:645-648, 1994) によりその存在が明らかにされた。その後固形がんにおいて乳癌幹細胞が CD24⁻CD44⁺ の分画に存在すること (PNAS 100:3983-3988, 2003)、また脳腫瘍においては CD133⁺ 分画に癌幹細胞が存在することが報告されている (Nature 432:396-401, 2004)。さらに前立腺癌、大腸癌、頭頸部扁平上皮癌、膵臓癌、胃癌などにおいても腫瘍幹細胞の候補が報告されている。

肺癌における幹細胞についての報告としては、2001年に、活性型 K-ras によるマウス肺発癌モデルでは、腫瘍細胞の大部分は肺胞型上皮細胞のマーカー Surfactant Protein (SP) C が陽性であるが、一部にクララ細胞のマーカーである CCA も陽性な double positive cell (DPC) が存在することが示唆された (Gene Dev 15:3243-3248, 2001)。2005年に Kim らは DPC が正常マウス肺において、細気管支肺胞管結合部に存在し、気管支肺胞障害に抵抗性を示し再生過程で増加すること、造血幹細胞などの表面マーカーを用い、Sca-1⁺CD45⁻Pecam⁻CD34⁺ として濃縮可能で、自己複製能とクララ細胞や型・型肺胞上皮への分化能を持つことを見出し細気管支肺胞上皮幹細胞 (Bronchioalveolar Stem Cells: BASCs) と命名した (Cell 121:823-835, 2005)。すなわち、マウス肺発癌モデルで活性型 K-ras の発現を誘導すると、発癌の初期に BASCs が過形成し、BASCs が肺腺癌の起源となっている可能性が示唆された。Curtis らは EGFR T790M-L858R 遺伝子変異導入マウスでは Sca-1 陰性細胞に、p53 欠失 K-ras 変異肺癌においては Sca-1 陽性細胞に BASCs マーカーを意味する tumor propagating capacity (TPC) が高いことを報告し、genotype により細胞表面マーカーが異なることを報告している (Stem Cell 7, 127-133, 2010)。side population (SP) 細胞とは DNA 結合色素である Hoechst33342 が ABC トランスポーターにより細胞外に排出さ

れることで生じる分画である。組織幹細胞は様々な ABC トランスポーターを高発現しており、SP 細胞中に濃縮している。種々の癌や癌細胞株にも SP 細胞が検出され幹細胞様の性質を示すことが報告されてきた。Ho らは肺癌細胞株を用いて SP 細胞と non-SP 細胞の解析を行い、SP 細胞には肺癌幹細胞が濃縮され肺癌治療の重要な標的となりうる可能性を示唆した (Cancer Res 67:4827-4833, 2007)。Eramo らは肺癌組織において免疫組織学的染色で CD133 陽性細胞を検出し、FACS で肺癌検体すべてに存在することを示し (Cell Death Differ 15:504-514, 2008)、CD133 陽性細胞が自己複製能、多分化能の性質を持つ肺癌幹細胞であることを示した。

以上から

Exon 19 del EGFR および EGFR Exon 21 L858R 遺伝子改変マウスにも、K-ras 遺伝子改変マウスと同様に BASCs が存在する。

BASCs は Exon 19 del EGFR および Exon 21 L858R 肺癌の起源に関与するとの仮説をたて研究を開始した。

2. 研究の目的

幹細胞は自己複製能と多分化能をもつ細胞であり、臓器に特異的な組織の幹細胞が必要に応じて自己複製と分化を繰り返すことにより臓器機能が維持されている。癌は正常な制御から逸脱した組織であるが、癌組織においても癌種特異的な幹細胞の存在が明らかにされている。この「癌幹細胞」は組織幹細胞と同様に自己複製能を有して癌細胞を供給し、癌組織を維持する。臨床においては癌幹細胞がしばしば治療抵抗性を示すため、再発の主たる要因と考えられることであり、癌幹細胞を除去することにより再発のない治療が期待できると考えられている。申請者らは、上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異陽性肺癌マウスモデルを樹立し、発癌予防、薬剤感受性、耐性機序の解析を現在も行っているが、本研究では EGFR 遺伝子改変マウスを利用し、癌幹細胞を同定およびそれを制御することにより、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の根治を最終目標とする。

3. 研究の方法

- 申請者らはII型肺胞上皮に特異的に遺伝子発現させることが可能なSP-Cプロモーターを利用し、EGFR遺伝子変異(マウス Egfr Exon 19 del E748-A752, ヒト EGFR Exon 19 del E746-A750 に相当, ヒト EGFR Exon 21 L858R)を導入した遺伝子改変マウスを樹立・報告している(Cancer Sci 2008, Cancer Res 2009)。この遺伝子改変マウスは肺に自然発癌する腫瘍を形成し、癌死する。腺腫様過形成 腺癌の経過を観察でき、EGFR遺伝子変異に起因する発癌モデルとして有用と考えられる。この肺癌マウスモデルを利用して、肺腺癌の自然経過観察、発癌予防、またEGFR遺伝子変異をもつ肺癌に対する薬剤感受性および耐性機序の解析を施行した。このEGFR遺伝子改変マウスから細胞株を樹立し、がん幹細胞を樹立・同定・機能解析するため本研究を立案した。今回はEGFR Exon 19 del 導入マウスモデル1とEGFR Exon 21 L858R 導入マウスモデルを用いる。熊本大学伊藤隆明教授(研究分担者)との共同研究で遺伝子改変マウスの胎仔肺を摘出し器官培養を開始し、発癌までのプロセスを観察した。また、EGFR遺伝子改変マウス肺の Sphere colony assay を開始し細胞株の樹立を試みた。現在も樹立に向けて実験中であるが、細胞株が樹立されれば、その細胞株を自動磁気細胞分離装置にて、CD45 および CD31 の depletion を行った後、FACSAria セルソー

ターを用いて、Sca-1 と CD34 のマーカーを用いて分離を行う予定である。すなわち、Sca-1⁺ CD34⁺、Sca-1⁺ CD34⁻、Sca-1⁻ CD34⁺、Sca-1⁻ CD34⁻の細胞を得たのち、それぞれ cloning しその表面マーカーが保持されていることを確認し、それら4つの細胞群のうち、幹細胞の性質(自己複製能, 多分化能, 腫瘍形成能, 薬剤抵抗性)を有するものを同定する予定である。単離した細胞群をそれぞれ NOD/SCID マウスの皮下に移植して腫瘍増殖能を確認することも予定している。薬剤抵抗性については、ATP-binding cassette(ABC)トランスポーター ABCG2 高発現の報告があり、本研究でも multi-drug-resistant protein (MRP), breast cancer resistant protein(BCRP)1 についても研究を進めている。

・胎仔肺の器官培養

実験に使用するマウスは、EGFR遺伝子変異導入マウスのオスと野生型 C57BL/6 マウスのメスを交配させ、妊娠確認後、胎齢14日時点で妊娠マウスを腹腔内麻酔のち頸椎脱臼にて安楽死させ、帝王切開により胎仔を摘出する。胎仔肺のみを摘出して6穴のディッシュに培地を1.5ml入れその上にフィルターカップを置いて器官培養を開始し、以後胎仔肺の観察を行う。胎仔の genotype については胎仔頭部の組織を用いてDNA抽出を行い、EGFR遺伝子変異を有する個体かどうかをPCRにて確認する。胎仔肺に肺癌組織を認め、その一部を用いて培地に

EGFR-TKI を添加し、腫瘍増殖が抑制できるかどうかを肉眼的に確認した。また EGF, FGF, HGF, PlGF, VEGF などの増殖因子をそれぞれ培地に添加し、EGFR-TKI の感受性の変化について MTT アッセイ法や Western Blotting 法や免疫染色などを用いて検討を行った。今後は細気管支肺胞管結合部に蛍光免疫を行い BASCs の存在を確認する予定である。

・ Sphere colony assay

EGFR 遺伝子改変マウス(3 週令)の肺を用いてスフィアアッセイ (Sphere assay) を行う。EGFR 遺伝子改変マウスを腹腔内麻酔のち頸椎脱臼にて安楽死させ、取り出した肺を細断し小シリンジに入れる。小シリンジに PBS + collagenase/dispase を加え、37 度でインキュベートする。ピペットで攪拌を繰り返し、100 μ m、40 μ m のフィルターに通す。以上より得られた検体をプレート表面に特殊加工して上皮細胞が決して接着しない特殊プレートを用いて、培養を開始し、浮遊細胞の培養を行った。

4 . 研究成果

分担研究者熊本大学伊藤隆明教授の指導で

EGFR 遺伝子変異導入マウスの胎仔肺を摘出し器官培養を行い、肺の発生の過程における発癌を直接確認した。今後は胎仔肺の肺癌組織の一部を用いて培養に EGFR-TKI を添加し、EGFR - TKI 感受性の変化について MTT アッセイ法や Western Blotting 法や免疫染色などを用いて検討を行った。研究代表者が 2 度の育児休暇を取得したため、研究自体が大幅に遅れ

ており今後も研究は続けていく予定である。

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 佐藤 晃子 (SATO Akiko)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：30623532

(2)研究分担者 木浦 勝行
(KIURA Katsuyuki)
岡山大学・大学病院・教授
研究者番号：10243502

(3)研究分担者 伊藤 隆明 (ITOU Takaaki)
熊本大学・大学院生命科学研究部
(医)・教授
研究者番号：70168392