

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700990

研究課題名(和文) PTPRZ1による肺小細胞がん幹細胞維持および分化の分子制御機構解明

研究課題名(英文) Role of PTPRZ1 to maintain cancer stemness in small-cell lung carcinoma

研究代表者

牧野嶋 秀樹 (Makinoshima, Hideki)

独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・研究員

研究者番号：30510573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：肺小細胞がんは進行が速く予後悪性のがんであり、新規で有効な治療法の開発が要望されている。受容体型チロシンフォスファターゼPTPRZ1が肺小細胞がんを高率に発現し、PTPRZ1が肺小細胞がんの腫瘍形成に重要であり、肺小細胞がん幹細胞の新規機能性マーカーになりうる可能性を見出した。そこで、膜タンパク質であるPTPRZ1を機能性幹細胞マーカーとして細胞を単離し、肺小細胞がん幹細胞の維持・増殖・分化に関するPTPRZ1の機能の解明を目指した。その結果、細胞表面マーカーを使用した細胞分離は成功したが、肺小細胞がん細胞の特徴として、単離した細胞の状態からの培養が難しいことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Because small-cell lung carcinoma (SCLC) is still a disease with a poor prognosis and limited treatment options, there is an urgent need to develop targeted molecular agents for this disease. We screened cell lines and paraffin-embedded tissues from a variety of pathological phenotypes to examine PTPRZ1 expression. Here we show that PTPRZ1 is highly expressed in SCLC cell lines and exists in human SCLC tissues. In addition, we found that PTPRZ1 actually has an important oncogenic role in tumor progression in the murine xenograft model. These results imply that PTPRZ1 could be a feasible cell-surface marker to isolate cancer stem cells of SCLC. To test this idea, we established to separate PTPRZ1 positive cells (PTPRZ1+) from PTPRZ1 negative cells (PTPRZ1-) using anti-PTPRZ1 antibody. However, isolated SCLC cells were technically impossible to maintain cell culture in vitro. Therefore, we could not characterize whether PTPRZ1+ cells might have a feature of cancer stem cells.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍細胞学

キーワード：がん幹細胞 チロシンフォスファターゼ 肺小細胞がん PTPRZ1

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺がんは日本においてがん死の第一位で、肺小細胞がんは肺がん患者全体の15%程度であるが、増殖・進行が速く、早期に全身転移をきたす予後不良な疾患である。肺小細胞がんは、他のがんと比較して薬物療法や放射線療法に対する感受性が高く、少なくとも一度は腫瘍の縮小に成功する症例が多い。しかし、肺小細胞がんに対する治療薬の選択数は少なく、30年前に比べて新たな薬剤は開発されず、治療後の再増悪や治療抵抗性が未だに臨床上的大きな課題となっている。

(2) 肺腺がんに見られる受容体型チロシンリン酸化酵素の恒常的な活性化遺伝子変異などのドライバーがん遺伝子は、肺小細胞がんでは未発見である。そのため、副作用が少なく特異性の高い分子標的治療薬の開発は進んでいなかった。そのため、新たな治療戦略を開発する必要があった。化学療法や放射線療法に抵抗する特性を保持するがん幹細胞を単離し、肺小細胞がん幹細胞の特性を解明して分子基盤を構築することは、臨床上也大きな意味を持つ可能性がある。

2. 研究の目的

肺小細胞がんの治療に用いられるファーストラインの治療薬に対する治療抵抗性・再増悪時に、予後は極めて悪く、有効な治療法は現在ない。そこで、化学療法や放射線療法に抵抗する特性を保持する肺小細胞がん幹細胞をターゲットにした薬剤を開発できれば、新たな治療法や根治治療の開発につながると期待される。これまでのがん幹細胞研究では、脳腫瘍や乳がんなどで研究されている CD44 や CD133 などがん幹細胞マーカーが同定されている。しかし、肺小細胞がんにおける細胞表面に存在するがん幹細胞マーカーは、明確に定義されていない。

PTPRZ1 は受容体型チロシンフォスファターゼであり、細胞外に炭酸脱水素酵素と細胞外マトリックス結合ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内にチロシンフォスファターゼドメインを保持している。正常脳・神経や脳腫瘍で遺伝子発現が知られていたが、我々は神経内分泌腫瘍由来の肺小細胞がん細胞株において、PTPRZ1 mRNA が高いレベルで発現していることを我々は見出した。さらに、臨床検体病理組織の免疫染色法により、肺小細胞がん(60%陽性)を含む神経内分泌腫瘍組織で高率にPTPRZ1タンパク質が発現していることを明らかにした。

上記背景とこれまでの研究成果を基に、研究期間内に以下の解明を目指した。PTPRZ1 をがん幹細胞の機能性マーカーとして細胞を単離、あるいはその他がん幹細胞マーカーで細胞を分離し、肺小細胞がん幹細胞維持や増殖におけるPTPRZ1の機能解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 他肺小細胞がん細胞株、他shRNAsを用いて、ゼノグラフトモデルにおける腫瘍形成能を確認した。

(2) フローサイトメトリーやマグネットビーズ等を使用し、PTPRZ1陽性細胞と陰性細胞を分離し、がん幹細胞の特徴である高い腫瘍形成能、薬剤抵抗性、サイドポピュレーション細胞を検証した。また、それぞれの細胞におけるPTPRZ1の発現量を測定した。

(3) PTPRZ1以外の、他のがんで知られてきたがん幹細胞マーカーを使用して、マーカー陽性細胞と陰性細胞を分離し、それぞれの細胞群でがん幹細胞の特性を検討することを試みた。それぞれの細胞におけるPTPRZ1の発現量を測定した。

(4) PTPRZ1の肺小細胞がん幹細胞維持、細胞増殖、分化における役割の解明を目指した。PTPRZ1のノックダウンあるいは過剰発現による細胞周期や神経内分泌マーカーの変化を、チロシンリン酸化を介したシグナル伝達経路に着目して検証した。

4. 研究成果

(1) 受容体型チロシン脱リン酸化酵素PTPRZ1が肺小細胞がんを高率に発現し、肺小細胞がん幹細胞の新規機能性マーカーになりうる可能性を見出した。マウス移植モデルにおいて、PTPRZ1が肺小細胞がんの腫瘍形成に重要であることを確認する目的で、まず実験を行った。NCI-H69細胞に異なるshRNAのセット、PTPRZ1が発現している異なる小細胞がん細胞株 NCI-H1930細胞を使用し、腫瘍形成能を検討した。NCI-H69細胞において、PTPRZ1の発現を抑制すると、皮下腫瘍の形成能は低下した(図1)。

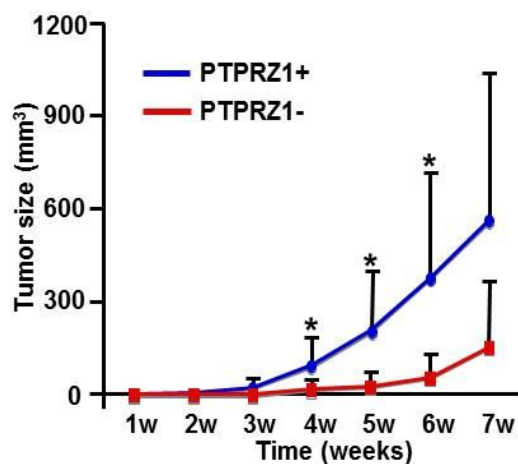


図1. NCI-H69の腫瘍形成能

NCI-H1930 細胞を使用して、shRNA で PTPRZ1 の発現を抑制すると、腫瘍サイズが H69 株と同様に減少した (図 2)。形成された皮下腫瘍で、抗 PTPRZ1 抗体を使用して免疫染色を行うと、PTPRZ1 の発現が確認された。これらの結果は、PTPRZ1 が肺小細胞がんの腫瘍形成に重要であり、肺小細胞がん幹細胞の維持・増殖に機能を担っていることを示唆する。

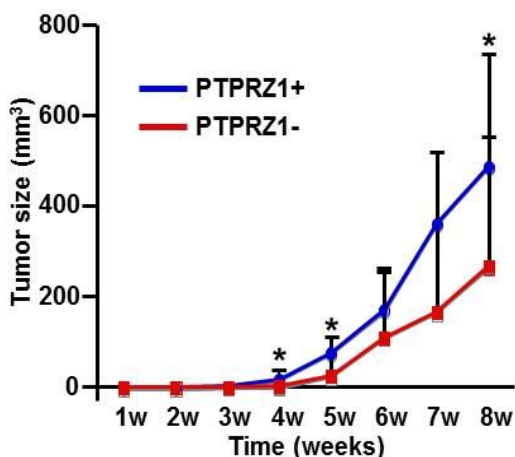


図2. NCI-H1930の腫瘍形成能

(2) マグネットビーズを使用し、PTPRZ1 陽性細胞と陰性細胞を分離する方法が、他のフローサイトメトリーを使用する方法よりも、PTPRZ1 陽性細胞が単離可能であった。マグネットビーズで PTPRZ1 陽性細胞と陰性細胞を分離し、それらの回収した細胞から RNA を抽出、RT-PCR 法により PTPRZ1 の発現を確認した。その結果、細胞表面マーカー PTPRZ1 の +/- に依存して、PTPRZ1 mRNA の発現に約 2 倍の相違を認められた (図 3)。この結果は、PTPRZ1 を細胞表面マーカーとして使用し、細胞の分画が可能であることを示唆した。

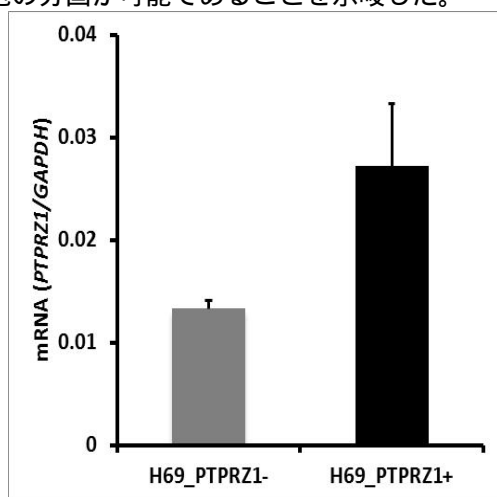


図3. PTPRZ1 による分離と mRNA の発現

引き続き、がん幹細胞の特徴である高い腫瘍形成能、薬剤抵抗性、サイドポピュレーション細胞を検証する予定であった。しかし、単離した細胞は、PTPRZ1 +/- に関係なく培養が不可能であった。他のがんで知られてきた

がん幹細胞マーカーを使用して、マーカー陽性細胞と陰性細胞の分離を試みたが、細胞が死滅してしまう問題は同様であった。シングルセルサスペンションの状態、細胞を分離する方法は、肺小細胞がんに関しては困難であることが判明した。

(3) 肺小細胞がんの新規治療法の開発には、さらなる継続的な研究が必要である。最近、我々の研究グループから、肺小細胞がんのゲノム解析に関する論文が発表された。その結果は、PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達経路に含まれる分子の遺伝子に変異が多く見つかった。さらに、PI3K の活性型変異を保持した肺小細胞がん細胞株に、PI3K の阻害を行うと、明らかな増殖低下を引き起こした。これらの結果は、PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達経路が、肺小細胞がんの分子標的治療薬の有効なターゲットなることを示唆している。

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1件)

Makinoshima H, Ishii G, Kojima M, Fujii S, Higuchi Y, Kuwata T, Ochiai A. PTPRZ1 regulates calmodulin phosphorylation and tumor progression in small-cell lung carcinoma. BMC Cancer、査読有、2012、12: 537.
doi: 10.1186/1471-2407-12-537.

[学会発表](計2件)

牧野嶋秀樹、石井源一郎、小嶋基寛、藤井誠志、樋口洋一、桑田健、土原一哉、落合淳志
受容体型チロシン脱リン酸化酵素PTPRZ1による肺小細胞がん進展の制御機構とがん幹細胞マーカーの可能性、第36回日本分子生物学会年会(神戸)、2013年12月

牧野嶋秀樹、石井源一郎、小嶋基寛、藤井誠志、樋口洋一、桑田健、落合淳志
神経内分泌腫瘍で過剰発現する PTPRZ1 の肺小細胞がん進展における機能解析、第 71 回日本癌学会学術総会(札幌)、2012年9月

[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

牧野嶋 秀樹 (MAKINOSHIMA, Hideki)

国立がん研究センター・臨床開発センター・研究員

研究者番号：30510573

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：