

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791480

研究課題名(和文) NOGマウス上での肺癌幹細胞高度濃縮腫瘍構築モデルの確立と肺癌幹細胞の同定

研究課題名(英文) Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenografts as model for enrichment of cancer stem cell, and identification of lung cancer stem cell.

研究代表者

中川 隆行(Nakagawa, Takayuki)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん幹細胞研究部・研究員

研究者番号：10626261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌の新しい治療法を開発を目標として、以下の事を行った：1)NOGマウス皮下でヒト肺癌組織を継代し、がん幹細胞が濃縮された腫瘍構築モデルを確立する。2)がん幹細胞が濃縮された腫瘍組織と由来組織を網羅的に解析し、がん幹細胞に特異的に発現する分子を同定する。15腫瘍がNOGマウス皮下で2代以上の継代を経て生育可能であった。手術摘出標本とマウス皮下の腫瘍の組織は類似しており、継代可能な腫瘍は安定した腫瘍発育が認められた。がん幹細胞関連分子としてnon-coding RNAのHOTAIRに着目した。ヒト肺癌においてHOTAIR高発現例は悪性例が多く、術後無再発期間が有意に短縮していた。

研究成果の概要(英文)：In order to develop the new therapeutic strategy for non-small cell lung cancer (NSCLC), I tried to establish patient-derived NSCLC xenografts on the NOG mice and explore the molecules involved in the characteristics of cancer stem cell. We established 15 passagable xenograft lines. A comparison of the histology of original sample with xenografted tumors revealed the similar histologic architecture of the primary and xenograft tumor. As cancer stem cell related molecule, I focused on large non-coding RNA HOTAIR. As expected, the expression of HOTAIR was found especially in aggressive NSCLC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：胸部外科学

キーワード：肺癌 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

本邦での肺癌の死亡者数は 2005 年の統計で全がん死の 19%を占め、男性の全がん死の中で 1 位、女性では大腸がん・胃がんに次ぎ 3 位である。肺がんの原因の 1 つとされる喫煙率が減少傾向にあるにもかかわらず、肺がん検診の普及や画像診断の進歩で現在でも肺がんは増加傾向にある。近年肺がんの治療は、EGFR 変異症例に対する Gefinitib 投与が大規模臨床試験により有意差をもって予後の改善が報告されたことが大きな話題となった。さらに現在 EML4-ALK4 変異に対する ALK 酵素活性阻害剤などの新規分子標的薬が試みられつつある。しかしそれらを用いても切除困難な進行肺がんや切除後再発肺がんを根治することはできず、延命は限定的であり依然として予後不良である。その理由として種々の抗癌剤・分子標的薬の治療により、一時的な腫瘍抑制効果があるものの、耐性機序により病変の進展や他臓器への転移により進行しがん死に至る。肺がん症例の多くは切除困難な進行肺がんであり、また切除例でも再発は少なく今後も治療の中心が抗癌剤・分子標的薬であることには変わりはない。最近の研究から、抗癌剤や放射線療法に対する耐性やがんの進展・転移が、がん幹細胞によってもたらされていることが示唆されている。

私はこれまで 30 例以上のヒト非小細胞肺がん組織を超免疫不全マウス (NOG マウス) に皮下移植を行い、NOG マウス皮下でのヒト非小細胞肺癌構築モデルの確立を試みてきた。最初の移植から腫瘍が生着して 15 mm 程まで成長するには 20~30 週程度かかるものの、その少量のがん切片からさらに NOG マウス皮下で数代継代していくと、15 mm 程の腫瘍を 6 週程度で形成するようになった。移植継代されている腫瘍は病理組織学的に由来のがん組織同様の形態を維持しており、腫瘍形成能も高くなっていることから、がん幹細胞様細胞が濃縮されていることが推察される。この

ように、免疫不全マウス皮下で継代可能な非小細胞肺がん幹細胞濃縮モデルが確立されつつある。現在、当研究所ではこの濃縮モデルを複数維持し、分配し継代することで同一系統を複数確立することや腫瘍組織より細胞を分離して凍結保存させ必要な時に腫瘍を再生させることも可能となっている。今後、さらに NOG マウス皮下での継代を重ねるに従って、がん幹細胞の濃縮が高まることが期待され、究極のがん幹細胞研究モデルになり得ると思われる。私はこのモデルを用いて非小細胞肺がん幹細胞を制御する分子を同定し、肺がん幹細胞を標的とした新しい画期的な治療法を開発することを構想するに至った。

2. 研究の目的

非小細胞肺がんの新しい治療法を開発することを目標として期間内に以下のことを行うことを目的とする。1) 超免疫不全 NOG マウス皮下でヒト肺がん組織を十代以上継代することにより、がん幹細胞が高度に濃縮された腫瘍構築モデルを確立する。2) がん幹細胞が高度に濃縮された腫瘍組織と由来組織において、RNA、microRNA、non coding RNA の発現をアレイによって網羅的に解析し、がん幹細胞に特異的に発現する分子を同定する。

3. 研究の方法

(1) 免疫不全マウスを用いたがん幹細胞が高度に濃縮された腫瘍構築モデル

手術によって摘出された肺がん組織を免疫不全マウス (NOG マウス) に移植し、様々な組織型・分化度・変異の症例対応したモデルを確立させる。またモデルを十代以上継代させ、がん幹細胞が高度に濃縮された腫瘍を形成させる。

(2) 確立されたモデルにおける腫瘍再現性の確認

免疫不全マウスに移植され形成した腫瘍が由来するがんと類似した特徴を持つこと

は病理組織にて確認しているが、もともとの由来したがんを継代して維持・管理されたモデルについて、継代を重ねることや経時的な変化について解析検討する。

(3) がん幹細胞に特異的に発現する分子の同定

由来腫瘍と十代以上NOGマウス皮下で継代した腫瘍からRNAを抽出する。抽出したRNAを用い、アレイによって網羅的遺伝子発現を解析する。継代した腫瘍ではがん幹細胞が濃縮されていることが想定されるため、そこで特異的に発現するRNAとマイクロRNAをはじめとしたnon coding RNAを抽出する。これら分子が実際にヒト組織で発現しているかRT-PCRで検討する。着目した分子の機能を肺癌細胞株上で検討する。

4. 研究成果

(1) 免疫不全マウスを用いたがん幹細胞が高度に濃縮された腫瘍構築モデルと腫瘍再現性

NOGマウス皮下で2代以上継代可能だったものをline化と定義した。line化した肺癌株は15株であった(図1)。組織型で分類すると腺癌10株、扁平上皮癌1株、腺扁平上皮癌1株であった。そのうち、10代以上継代できたものは1株、8代以上継代可能であったものが2株だった。

手術摘出組織とマウス皮下で生育した組織を比べると、全例で非常に類似した組織像を呈していた。また、line化した株では継代時の腫瘍定着が確実であった。



図1 NOGマウス皮下腫瘍の形成

マウス右背側皮下に腫瘍の形成がみられる。

一方、腫瘍形成速度に関しては、株によって継代のたびに早くなるもの、変化のないもの、その都度形成速度の異なるものがあった。このことは、癌幹細胞様性質をもつ tumor initiating cellにも多様性があることを意味した。

(2) がん幹細胞に特異的に発現する分子の同定

十代以上継代できた腫瘍が少なかったため、がん幹細胞性に関与する分子に関しては文献的に候補を絞った。私はlarge non-coding RNAのHOTAIRという分子に着目した。

非小細胞肺癌77例の癌部と同患者の非癌部肺組織におけるHOTAIRの発現を定量的RT-PCRで解析し、臨床病理学的因子との関連を検討した。非癌部に比べHOTAIRが2倍以上の高発現がみられた肺癌組織は17例(22.1%)であり、低発現例に比べ有意に、腫瘍径が大きく、T因子、N因子、病理病期が進行し、脈管侵襲を示す例が多く認められた。また高発現例で術後無再発期間が有意に短縮していた(図2)

さらに肺癌脳転移6例と比較検討すると、原発巣に比べ転移巣で有意にHOTAIRの発現が高値であった。

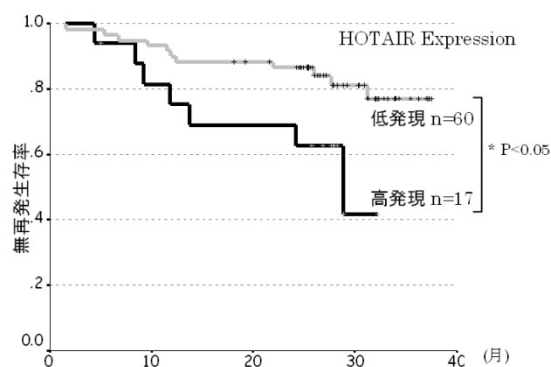


図2. HOTAIRの発現と無再発期間

肺腺癌細胞株A549に組み換えベクターを導入しHOTAIRを強制発現させ、細胞増殖能、細胞遊走能を検討した。HOTAIRの導入により細胞増殖能は抑制され、細胞遊走能は亢進した。逆にsiRNAを用いてHOTAIRの発現を抑制すると細胞増殖能は促進され、細胞遊走能は抑制された。免疫不全マウスへの皮下移植モデルでは腫瘍形成に差を認めなかったが、尾静注による転移モデルではHOTAIR強制発現株で肝転移・骨転移を増加させる傾向を認めた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

① Nakagawa T, Endo H, Yokoyama M, Abe J, Tamai K, Tanaka N, Sato I, Takahashi S, Kondo T, Satoh K. Large noncoding RNA HOTAIR enhances aggressive biological behavior and is associated with short disease-free survival in human non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 436: 319-24, 2013.

② Endo H, Shiroki T, Nakagawa T, Yokoyama M, Tamai K, Yamanami H, Fujiya T, Sato I, Yamaguchi K, Tanaka N, Iijima K, Shimosegawa T, Sugamura K, Satoh K. Enhanced expression of long non-coding RNA HOTAIR is associated with the development of gastric cancer. *PLoS ONE* 8: e77070, 2013.

[学会発表] (計1件)

- ① 中川隆行、田中伸幸、菅村和夫、佐藤郁郎、佐藤賢一. 非小細胞肺癌におけるHOTAIRの発現と転移.
第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19-21日 (札幌)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川隆行 (NAKAGAWA, Takayuki)

研究者番号: 10626261