

平成 27 年 4 月 13 日現在

機関番号：81303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670611

研究課題名(和文) 肺癌根治を目指した人工肺癌幹細胞株の作製と微小環境を標的とした制御

研究課題名(英文) Generation of artificial lung cancer stem cells and its regulation by microenvironment in order to develop the effective therapeutic strategy for lung cancer.

研究代表者

阿部 二郎 (Abe, Jiro)

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)・その他部局等・特任研究員

研究者番号：10573686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：非小細胞肺癌幹細胞を標的とした新しい治療法を開発することを目標として、人工肺癌幹細胞株の作製を試みた。がん幹細胞関連分子としてlarge non-coding RNAのHOTAIRに着目し、肺癌細胞株A549に遺伝子導入した。HOTAIRの導入により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、細胞遊走能も減弱した。免疫不全マウスへの皮下移植モデルでは腫瘍形成能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。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) stem cell, we tried to establish artificial cancer stem cell line. As cancer stem cell related molecule, we focused on large non-coding RNA HOTAIR. Lung cancer cells (A549) showed increased cellular migration in HOTAIR dependent manner. In addition, the expression of HOTAIR was found especially in aggressive NSCLC and was significantly correlated with shorter disease free survival, suggesting that HOTAIR might be involved in the property of cancer stem cell of NSCLC.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 人工がん幹細胞 HOTAIR

## 1. 研究開始当初の背景

本邦において、肺癌は最も死亡数の多い癌である。2010年の厚生労働省の人口動態調査死亡統計によると、男性は50,395人、女性は19,418人が肺癌で命を失っている。肺癌発症の原因の1つとされる喫煙率が減少傾向にあるにもかかわらず、現在でも肺癌は増加傾向にある。近年肺癌の治療は、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癌や切除後再発肺癌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。肺癌症例の多くは切除困難な進行肺癌であり、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。従って、肺癌患者の予後を飛躍的に延長させるためには、抗癌剤・分子標的薬耐性の源となる“肺癌幹細胞”に対する治療戦略を練る必要がある。癌組織は多様な細胞集団によって構成されている。その中で、通常の癌細胞と異なりごく少数の細胞でも癌を生体内で再構築できる細胞群の存在が示され、癌幹細胞と呼ばれている。癌幹細胞の特徴として: 1)自己複製能; 2)多分化能; 3)不均等分裂; 4)高い腫瘍形成能; 5)細胞周期G0期に存在、などの性質を有することが挙げられる。さらに、癌の転移、抗癌剤や放射線療法に対する耐性は、この癌幹細胞がもたらしていることが示唆されている。従って、この癌幹細胞が最も効率の良い癌の治療標的となることを意味するとともに、この細胞を根絶させない限り癌の根治はあり得な

い。現在、癌幹細胞だけを抽出する方法はなく、特定の細胞表面マーカーの発現を検出することによって癌幹細胞の濃縮分離が試みられている。例えば、乳癌ではCD24<sup>+</sup>-CD44<sup>+</sup>細胞群、神経膠芽腫ではCD133<sup>+</sup>細胞群に癌幹細胞様細胞の濃縮が示されているのをはじめ、様々な癌種で異なった細胞表面マーカーが用いられている。しかし、従来報告されているマーカーを使用した細胞分離では様々な問題点があり、長期間の実験に用いるのが困難である。そのため、癌幹細胞を標的とした治療法を開発するためには、癌幹細胞の個々の性質を自在に、かつ長期間安定的に表現する癌幹細胞モデルが必要である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は肺癌幹細胞を標的とした画期的な治療法を開発することを最終目標としてがん幹細胞モデルを人工的に作製すること、すなわち人工肺癌幹細胞株を樹立することである。

## 3. 研究の方法

### 1) ヒト人工肺癌幹細胞の作製

手術によって摘出された肺組織を細切してコラゲナーゼ処理を行った後、肺胞上皮細胞のみ分離培養する。その後、レンチウイルスベクターを用いてテロメラーゼ逆転写酵素(TERT)を導入し不死化する。上記で作製した正常上皮細胞に、K-ras 遺伝子、不活性型p53をレンチウイルスベクターを用いて導入する。細胞の癌化は、各遺伝子導入後、soft agar assayでのコロニー形成、免疫不全マウス皮下での腫瘍形成能にて評価する。癌化遺伝子の導入だけでは癌化はするものの、すべての細胞が癌幹細胞の性質を得るのは困難と推測される。そこで、癌幹細胞の性質の基盤となる可能性のあるEMT誘導遺伝子群とWarburg効果誘導遺伝子群を導入していく。

## 2) 人工癌幹細胞の検証

上記で作製した人工癌幹細胞株の癌幹細胞としての性質を確認するために以下のことを行う。1) sphere assay を行い、継代を続けても同様の sphere 形成能が維持できるかを検討し自己複製能を確認する。

2) 細胞を免疫不全マウス皮下に移植し、10個程度の移植で腫瘍形成能が可能かを検討し、高腫瘍形成能を確認する。3) 細胞をPKH26 でラベルし、免疫不全マウス皮下に移植し腫瘍を形成させる。腫瘍を細切し、コラゲナーゼ処理を施し、single cell に分離する。FACS Aria II にて PKH26 陽性細胞と陰性細胞を分離する。PKH26 は細胞分裂によって色素濃度が減弱し、分裂をしないあるいは少ない癌幹細胞では蛍光強度が強いままで維持される。従って、PKH26 陰性細胞の出現は癌幹細胞以外の細胞が生じたことを意味し、多分化能を持つことを示す。4) 様々な、遺伝子導入の組み合わせごとに上記の癌幹細胞の性質を検証し、どの遺伝子がそれらの性質をもたらすのかを同定するとともに、性質にバリエーションのある人工的癌幹細胞株を樹立する。検証によって、癌幹細胞の性質を表現しない場合は、さらに様々な EMT 関連遺伝子 Warburg 関連遺伝子を多様な組み合わせで導入する。

## 3) 臨床検体における肺癌幹細胞に関わる分子の発現

上記実験を経た上で、あるいは文献的な考察から、肺癌幹細胞特性に関与すると推察した分子について、その発現を臨床検体で確認する。肺癌手術検体より RNA を抽出し、目的の分子の発現を real-time RT-PCR で検索し、臨床因子との関連を検討する。それにより、その分子と幹細胞特性についての関連を考察する。

## 4. 研究成果

### 1) 肺癌幹細胞株の樹立

当初の予定では、正常肺胞上皮細胞株を作製し、その細胞株に遺伝子を導入する予定であった。しかし、正常肺胞細胞株作成が困難であったため、私たちは肺癌細胞株に悪性度を促進する分子を導入することとした。文献的に考察し、large non-coding RNA の HOTAIR という分子に着目し、肺癌細胞株 A549 に導入した。

### 2) 樹立した細胞の癌幹細胞特性の検証

HOTAIR の導入により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。

### 3) 非小細胞肺癌検体における HOTAIR の発現

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 1)。

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。

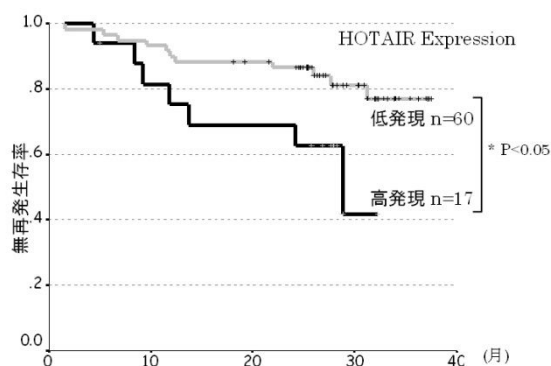


図1 .非小細胞肺癌において HOTAIR 高発現例は術後無再発期間が有意に短縮していた。

## 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)

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. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.101.

〔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 :

出願年月日 :

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

阿部二郎 (ABE, Jiro )

研究者番号 : 10573686

(2)研究分担者

佐藤賢一 (SATOH, Kennichi)

研究者番号 : 10282055