

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293317

研究課題名(和文)肺腺癌浸潤における癌幹細胞の役割についてのiPS細胞技術を用いた研究

研究課題名(英文)The Role of induced lung cancer stem Like cells on invasive activity of lung adenocarcinoma

研究代表者

眞庭 謙昌(MANIWA, YOSHIMASA)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50362778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：体細胞初期化因子を導入したA549細胞において、遺伝子導入後10日～15日目に核/細胞質比の高い小型の細胞からなるコロニーを認めた(iLCSC)。iLCSCのSphere形成能は、もとのA549細胞に比べて著明に高かった。さらにiLCSCを、MSC、HUVECと共に3次元下で混合培養することにより、病理学的評価において、肺癌組織構造と類似したオルガノイド(肺癌オルガノイド)を構築した。特定の因子導入によりiLCSCを誘導できると考えられた。またiLCSCを用いることにより、肺癌組織に類似した肺癌オルガノイドを構築することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We retrovirally introduced three factors (OCT3/4, SOX2, and KLF4) into a lung cancer cell line, A549. We evaluated cancer stem cell properties in terms of their sphere formation ability. These cells formed colonies in 10 to 15 days after transfection. These induced colonies (induced lung cancer stem like cells; iLCSC) were picked up and sub-cultured. These colonies grew larger and gave rise to spindle-shaped cells around themselves. We also assessed lung cancer organoid constructing ability of the parental A549 and iLCSC by co-culture with mesenchymal stem cells (MSC) and human umbilical vein epithelial cells (HUVEC). Sphere forming ability was enhanced in the iLCSC. Co-culture with MSC and HUVEC showed that only the iLCSC were able to construct consolidated organoids in vitro that mimicked bona-fide human lung cancer tissues. We named them "lung cancer organoids". Only the iLCSC could make lung cancer organoids by co-culture with MSC and HUVEC though parental A549 cells could not.

研究分野：Thoracic Surgery

キーワード：lung cancer adenocarcinoma cancer invasion cancer stem cell iPS cell lung cancer organoids

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺腺癌における癌幹細胞に関して これまでに我々は、肺腺癌症例を対象にして各種の癌関連遺伝子について、遺伝子変異などを調べその臨床的意義を解析してきた。同一標本 125 例に対し DNA 損傷応答遺伝子や DNA 複製関連遺伝子など、計 20 種類について遺伝子変異や蛋白活性異常など延べ 24 項目について検索し、臨床病理学的因子との関連を解析した結果、Psf3 が最も強い予後予測因子であることが分かった (Hokka D, et al. Lung Cancer. 2013, 79:77-82)。この Psf3 は胎生期における幹細胞のマーカーとして知られ、我々の検討でも癌組織内で血管周囲の浸潤部位に局在して発現している特徴から、肺腺癌における癌幹細胞マーカーの有力候補と位置付けている。これを足掛かりに、癌幹細胞の存在と浸潤機序への関わりについて研究を推進する着想を得た。

(2) 肺腺癌における癌・宿主相互作用および上皮間葉転換に関して 我々はこれまで、肺腺癌における浸潤部位の成立と進展のメカニズムを明らかにするために、独自に開発した細胞の浸潤を視覚化できる Double-layered collagen gel hemisphere (DL-CGH) 法を用いて研究を行ってきた。その中で、癌・宿主相互作用に注目し、肺腺癌細胞と繊維芽細胞を DL-CGH 内で共培養することにより、癌細胞由来の接着分子 Necl5 が宿主依存性の癌細胞浸潤に重要な役割をもつこと、そしてその際の癌細胞のアメーバ様運動能の出現 (上皮間葉転換) を確認した (Tane S, et al. Exp Mol Pathol. 2013 94:330-5)。癌組織内の微小環境 (ニッチ) における癌・宿主相互作用および上皮間葉転換のメカニズム解明のためのさらなるアプローチの必要性を認識するに至った。

(3) PS 細胞技術の応用による癌幹細胞研究に関して 研究分担者である青井貴之はノーベル賞受賞者の山中伸弥博士のもとで、世界初の iPS 細胞樹立以前からこれまで iPS 細胞に関する研究を進め、iPS 細胞の樹立・培養方法や分化誘導法の技術開発および教育に直接携わってきた。その中で最近、ヒトの大腸癌細胞株に山中因子を導入後、親細胞培養下で培養し、癌幹細胞性が誘導されることを見出し、それを回収することに成功した (Aoi T, et al. under review)。こうして導かれた細胞は、癌幹細胞の獲得・維持の機序の分子メカニズムを調べる上で極めて有用であり、また癌幹細胞をターゲットにした治療の開発につながるものと考えられる。肺腺癌株より同様に誘導される癌幹細胞を用いることは、浸潤・転移成立における癌組織内の微小環境 (ニッチ) での肺癌幹細胞の役割を解明するうえで最適と考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、肺腺癌の進展、とくに浸潤・転移成立における癌幹細胞の役割を明らかに

する。まず、誘導された肺腺癌幹細胞の遺伝子発現プロファイリングによりその特徴を確認するとともに、DL-CGH を用いて 3 次元構造内での分化、浸潤における特性を視覚的に明らかにする。さらに線維芽細胞との共培養とその DL-CGH 内封入により、微小環境 (ニッチ) を実験的に再現することで、癌・宿主相互作用や上皮間葉転換における通常の癌細胞株との特徴の違いを明確にする。その上で、癌幹細胞に特徴的な遺伝子の発現を抑制することで、浸潤能制御のためのターゲットを探索する。これらの検討により、肺腺癌における癌幹細胞マーカーを見出すとともに、癌幹細胞制御のための分子標的を確立する。

3. 研究の方法

(1) iPS 技術を用いて肺腺癌細胞株から人工癌幹細胞を誘導し、その選択的回収を高い効率で行う手法を確立することから開始する。肺腺癌細胞株に山中因子を導入した上で、得られた細胞の中から幹細胞特有の性質を持つものを in vitro および in vivo にて確認し、肺腺癌幹細胞を抽出する。

(2) 得られた肺癌幹細胞について遺伝子発現アレイによる解析を行い、肺癌幹細胞特異的な遺伝子発現を求め、臨床検体でその発現状態を確認することにより、肺癌幹細胞マーカーを確立する。

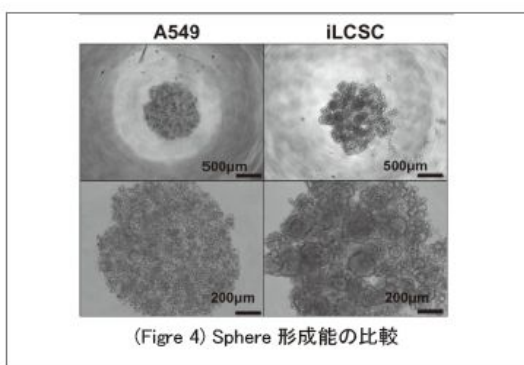
(3) 独自の 3 次元浸潤モデルにて、癌宿主相互作用および上皮間葉転換における肺癌幹細胞の特性を検討する。また上記の肺癌幹細胞特異的な遺伝子の発現制御による特性の変化も調べる。また、マウス皮下腫瘍モデルで癌幹細胞の特性とその変化も調べ、浸潤制御のための分子標的を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 回収に成功した iLCSC と元の A549 細胞の Sphere 形成能及び組織再構築能を比較解析することにより、iLCSC の癌幹細胞としての性質を評価した。回収した iLCSC と元の A549 細胞を、低接着 96-well spindle bottom 上で sphere formation 培地 (serum-free DMEM + 10 ng/ml bFGF + 10 µg/ml human insulin + 100 µg/ml human transferrin + 100 µg/ml BSA) を用いて、 1.0×10^4 個の細胞をそれぞれ播種し、10 日間浮遊培養し、これにより得られた Sphere を形態学的に比較解析した。混合培養による組織再構築能の比較 A549 細胞と iLCSC を、間葉系幹細胞 (MSC)、血管内皮細胞 (HUVEC) と共に 3 次元下で混合培養し、Self-organization により得られるオルガノイドを形態学的、病理学的に比較解析した。病理学的観察は、パラフィン包埋ブロックを作成後、厚さ 5 µm の連続切片を作成、これを Hematoxylin eosin (HE) 染色し、詳細に観察した。さらに詳細に比較するため、免疫組織化学による α -smooth muscle actin (SMA)、Cytokeratin 7 (CK7)

染色を加えた。

(2) 位相差顕微鏡による観察において、Sphere 形成能は iLCSC において著明に高くなっていた。A549 細胞と iLCSC を、MSC と HUVEC と共に 3 次元下で混合培養し、病理学的に HE 染色で観察したところ、iLCSC は元の A549 細胞に比べて、内部構造が明らかに密なオルガノイドを形成した。オルガノイドの病理学的評価を行ったところ、iLCSC から得られたオルガノイドは、肺腺癌組織と同様に、SMA 陽性細胞と共に組織を構築していた。さらに CK7 の染色パターンも肺腺癌組織と類似していた。このようにして iLCSC より得られる Sphere を、肺癌オルガノイドと名付けた。



(3) 本研究にて、体細胞初期化因子を導入した OSK-A549 において、遺伝子導入後 10~15 日にコロニーが出現し、誘導された細胞 (iLCSC) の周囲に、紡錘形の細胞が多数出現することを確認した。癌幹細胞は転移・再発の原因となると考えられているが、癌幹細胞がどのような機序により転移・再発に関わっているのかは、明らかになっていない。肺癌の浸潤部において、繊維芽細胞の増生、上皮間葉転換 (Epithelial mesenchyme transition: EMT) を認めるが、この繊維芽細胞の増生・EMT の有無が手術後の肺癌患者の予後を大きく左右している。我々はこれまでの研究により、iLCSC は EMT を生じた紡錘形の細胞を生み出すことを明らかにしている。さらに本年の研究により iLCSC は、周囲の間葉系幹細胞と共に組織構築する能力が元の A549 細胞に比べて、高くなることを明らかにした。本研究結果は、肺癌の浸潤の過程において、肺癌幹細胞が周囲間葉系幹細胞をリクルートしながら浸潤することを示唆していると考えられた。

(4) 今後の展望として、RNA を抽出・精製し、得られた RNA をマイクロアレイによって解析し、癌幹細胞様特性獲得に関与する遺伝子の候補を抽出する。これらの遺伝子候補の機能解析を細胞生物学的手法により行う。すなわち強制発現やノックダウンによる機能喪失実験によって、肺癌オルガノイド形成に対する効果を評価し、これらの遺伝子候補の関与を明らかにする。さらにその遺伝子(群)の中で、喫煙により体内に取り込まれる各種のケミカルメディエーターの関連について

調べる予定である。

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 1 件)

Scientific reports, in revision

〔学会発表〕(計 3 件)

小川裕行、青井貴之、真庭謙昌、他、特定因子の導入による肺癌幹細胞の誘導と、その上皮間葉転換、浸潤への影響、第 68 回日本胸部外科学会定期学術集会 2015.10.17 神戸

小川裕行、青井貴之、真庭謙昌、他、体細胞初期化因子導入による肺癌幹細胞誘導、第 33 回 日本呼吸器外科学会総会 2016.5.12 京都

Hiroyuki Ogawa, Takashi Aoi, Yoshimasa Maniwa, et al. In vitro construction of lung cancer organoids from induced lung cancer stem like cells, WCLC 2016, 2016.12.4、ウィーン(オーストリア)

〔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
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真庭 謙昌 (MANIWA, Yoshimasa)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：1450188620

(2)研究分担者

青井 貴之 (AOI, Takashi)
神戸大学・大学院科学技術イノベーション
研究科・教授
研究者番号：1450188620

林 祥剛 (HAYASHI, Yoshitake)
神戸大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：1450195820

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()