

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670625

研究課題名(和文) 肺癌幹細胞因子の同定とその特性を標的とした分子標的治療薬の開発

研究課題名(英文) Identification of cancer initiating cell factors and an attempt of drug development

研究代表者

鈴木 元 (SUZUKI, Motoshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80236017

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)：臨床検体を一旦ゼノグラフトとしてマウスに移植、腫瘍サイズを増大した。ゼノグラフト回収後、コラゲナーゼ処理、癌幹細胞培養条件下で培養した。CD166ソーティングによって癌幹細胞を濃縮、1000個の細胞をマウスに移植。腫瘍形成の有無を観察した。ゼノグラフトでCD166陽性細胞に腫瘍形成が観察された。この検体より培養細胞を確立した。同定遺伝子のノックダウンを行い、上記実験を行った。また、644種からなる低分子化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを行い、標的候補タンパク質の酵素活性に対する阻害活性を有する低分子化合物を得た。現在、その化合物を元に最適化を行っている。

研究成果の概要(英文)：We collected clinical lung cancer specimens and transplanted each of in the immune-deficient mice. Xenografts were recovered after tumor formation, collagenase-treated, and sorted for CD166 positive population. In a cell line, the CD166 positive cells successfully formed secondary tumors in mice. We performed database analysis to figure out a gene candidate which may contribute to the cancer initiating cell nature. By using the above cell line, we established a stable cell line that is associated with a knockdown of this gene, and inoculated thousands of cells in mice. Results are forthcoming. We also screened for an inhibitor against this gene product. Among the 2000 candidates, we found a compound that inhibits the activity. To decrease the EC50 value, we started optimization of this compound.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：肺がん がん幹細胞 低分子化合物

### 1. 研究開始当初の背景

近年、癌(腫瘍)幹細胞仮説(Nature, 199; 79, 1963)が白血病、脳腫瘍、乳癌領域などを中心に広く認識されてきた。特にこの10年ほどの知見の蓄積は、癌幹細胞仮説が単に癌研究に新たな領域を加えたというだけでなく、癌組織中で大多数を占める非癌幹細胞、あるいは、培養細胞を用いた研究に基づくこれまでの知識を根底から見直す必要性を提起している。また、癌幹細胞が従来の化学療法に抵抗性を示し、癌治療の障壁となっているという仮説に立てば、癌幹細胞の性質解明が今後の研究、診断、および治療の鍵となる。その一方で、一部の癌においては、癌幹細胞の存在自体に懐疑的な意見も根強く(Nature 456; 593, 2008 など)、癌幹細胞を巡る状況は未だ混沌としていることも事実である。

申請者らはこれまで、主として発癌と転移の観点から肺癌研究を行ってきた。(Cancer Cell 20, 348, 2012; EMBO J 31, 481, 2011; Cancer Res 70, 8407, 2010 など)。この研究手法を肺癌幹細胞研究に応用することで、肺癌の理解と診断、治療法開発に貢献できると考え、手術検体を用いた研究を通じて、肺癌幹細胞マーカータンパク質候補を同定してきた。

### 2. 研究の目的

近年認識されてきた癌(腫瘍)幹細胞仮説は、癌組織中で大多数を占める非癌幹細胞、あるいは、培養細胞を用いた研究に基づくこれまでの知識を根底から見直す必要性を提起している。癌(腫瘍)幹細胞仮説は、血液腫瘍、脳腫瘍、乳癌等一部で先駆的研究が行なわれているが肺癌では立ち遅れている。我々はこれまで、肺癌手術検体を用いた検討より、新規肺癌幹細胞因子候補を見出してきた。本申請ではこのタンパク質の肺癌幹細胞特性に対する機能を明らかにし、この機序に立脚した肺癌幹細胞に対する分子標的治療薬候補のスクリーニングと個体レベルの薬剤評価系開発を行う。

### 3. 研究の方法

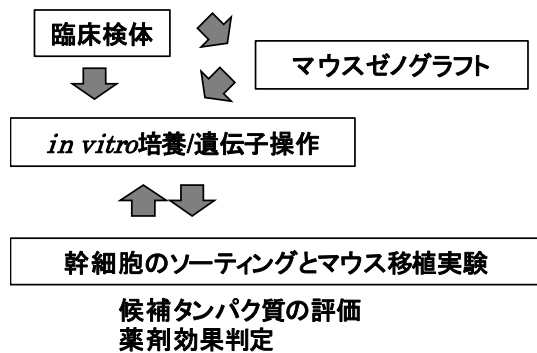
(1) 候補タンパク質の肺癌幹細胞特性に対する機能を明らかにする。

腫瘍形成に対する役割：癌幹細胞の一つの特徴は少数の細胞で腫瘍形成を行うことである。候補遺伝子が癌幹細胞因子か否か決定するため、臨床検体由来肺癌幹細胞を用いて以下の実験を行う。

実験に必要な細胞数を確保するため、臨床検体を一旦ゼノグラフトとしてマウスに移植、腫瘍サイズを増大する。ゼノグラフト回収後、

コラゲナーゼ処理、癌幹細胞培養条件下で培養し候補タンパク質の遺伝子操作をおこなう。その後CD166ソーティングによって癌幹細胞を濃縮、1000個の細胞をマウスに移植。腫瘍形成の有無を観察することで候補タンパク質の癌幹細胞性へ与える影響を調べる(図1)。

図1. マウス移植実験フローチャート



候補タンパク質に対する遺伝子操作実験により、酵素活性から類推されるシグナル変化と表現型変化観察を行う。また、遺伝子操作実験により細胞内シグナル/転写ネットワークに与える影響を調べる。即ち、遺伝子発現プロファイルの取得。mRNA、miRNA 発現解析に基づく標的遺伝子下流の遺伝子群の同定、GSEA 解析法等を用いたパスウェイ解析、その他バイオインフォーマティクス解析を実施することで下流遺伝子群とネットワークを同定する。相関検定においては膨大な数のパラメータを扱う多重検定に起因して誤って有意と判定する危険性を回避するため、Bonferroni 法などによる補正を行う。候補遺伝子のノックダウン、過剰発現条件下に観察される表現型を調べ、癌幹細胞性を規定するメカニズムを明らかにする。

さらに、がん幹細胞性の評価に際して、以下の二つの仮説を考慮する。「従来の化学療法は選択的に非幹細胞群に対して効果があるが、癌幹細胞は抵抗性を示す」、即ち、がん幹細胞に対する分子標的が癌治療の鍵となるという仮説。一方「がん幹細胞を根絶しても非幹細胞群より再びがん幹細胞が出現する」という仮説、即ち、がん幹細胞と非幹細胞は相互移行が可能でありがん根治には両者を並行して根絶する必要があるという仮説。このどちらの仮説が肺がん幹細胞の性質に当てはまるのか検討を行う。

(2) 肺癌幹細胞に対する分子標的治療薬開発を行う。

2000種からなる低分子化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを行う：このため開発したポジティブスクリーニング法あるいは、古典的な生化学的手法を併用し、標的候

補タンパク質の酵素活性に対する阻害剤をスクリーニングする。

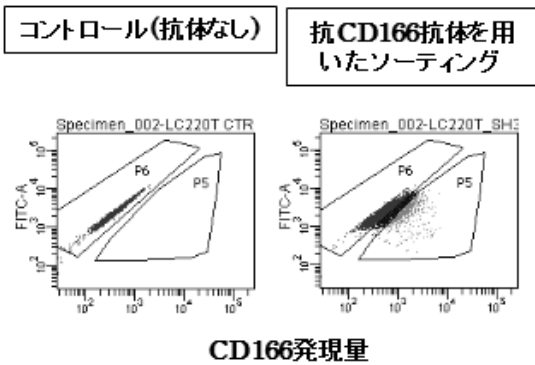
阻害活性を示した化合物に対して、50%阻害値、酵素特異性、細胞毒性、転移能に対する効果を調べる。有望な化合物につき細胞毒性等も考慮してリード化合物を選択。最適化作業を開始する。

肺癌幹細胞研究は歴史が浅く、薬剤に対する評価系が十分に確立していない。スクリーニングされたリード化合物を用いて、マウスにおける治療評価法の確立を目指した実験を開始する。

#### 4. 研究成果

(1) 候補タンパク質の肺癌幹細胞特性に対する機能を明らかにする。

図2. ゼノグラフトからのCD166陽性細胞分取



臨床検体を一旦ゼノグラフトとしてマウスに移植、腫瘍サイズを増大させた。ゼノグラフト回収後、コラゲナーゼ処理、癌幹細胞培養条件下で培養した。CD166 ソーティングによって癌幹細胞を濃縮 (図 2)、1000 個の細胞をマウスに移植。腫瘍形成の有無を観察した。平成 27 年度中に 40 検体、平成 28 年度に 38 検体を用いて実験を実施したところ、1 検体由来の細胞において、培養細胞系出の実験が可能であった。その細胞株においては、CD166 依存的皮下腫瘍形成 (図 3) にくわえ、肺転移モデルとして用いることも可能であ

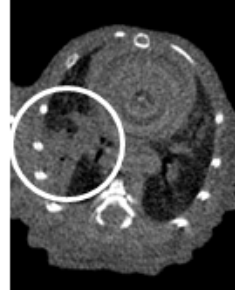
図3: マウスにおけるCD166依存的腫瘍形成



CD166	+	-
腫瘍形成	5/5	0/5

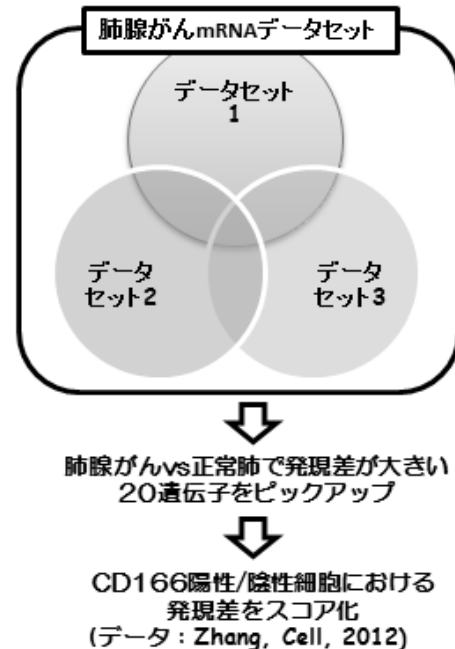
った (図 4)。以上の結果はこの細胞中ががん幹細胞画分を含むことをしめしており、本モデルががん幹細胞モデルとして、薬剤評価も含めた各種研究及び開発に使用できることを示している。

図4. マウス二次腫瘍の肺転移像



ソート後の細胞における mRNA マイクロアレイ解析の実施を試みたところ、得られる mRNA 量が極めて少なく、解析に用いるには困難であった。そこで、公開データベースを用いて、がん幹細胞性と関係がある遺伝子のピックアップを行った。まず、3つの mRNA 発現データベースを用い、肺腺がん細胞と正常肺細胞で発現差の大きい 20 遺伝子をピックアップした。次にそれぞれの遺伝子の CD166 陽性細胞と陰性細胞での発現差をスコア化し、上位 5 遺伝子をリストアップした (図 5)。

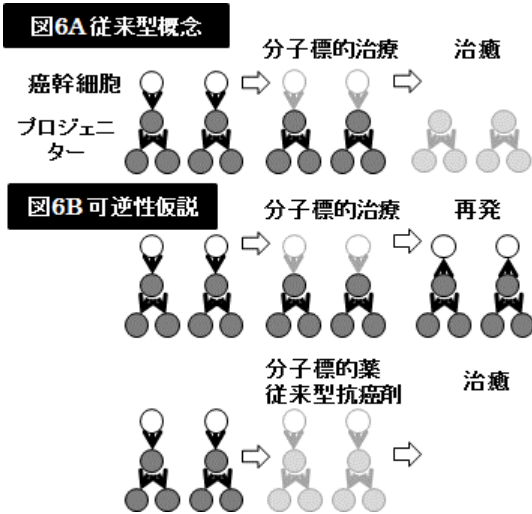
図5. データベース解析



遺伝子名	スコア	機能
TPX2	4.5	がん関連遺伝子 (報告多数)
ABCC3	4.5	がん幹細胞関連因子
CCS1	4.3	未知
CCS2	4.2	未知
FOXA1	4.2	肺がん関連転写因子

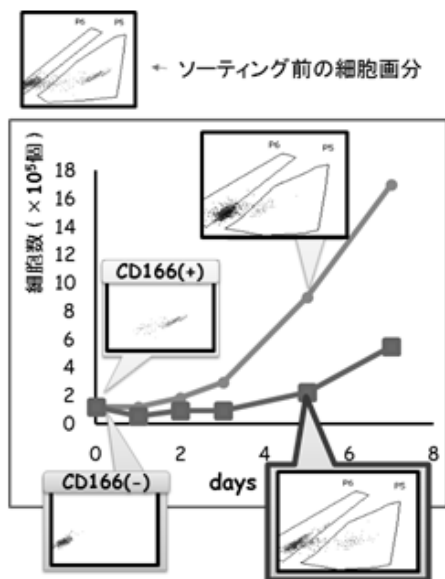
1、2、5 位にがんおよびがん幹細胞に関連する遺伝子がリストアップされており、この解

析方法の妥当性を示していた。一方、3位と4位にあたる遺伝子についてはがんとの関連がほとんど知られていなかった。今回はこのうち CCS1 (Candidate of Cancer Stemness) についてがん幹細胞の可塑性に関する実験を行った。



がん幹細胞の可塑性仮説とはすなわち「従来の化学療法は選択的に非幹細胞群に対して効果があるが、癌幹細胞は抵抗性を示す」という従来型仮説 (図 6A) に対して、「がん幹細胞を根絶しても非幹細胞群より再びがん幹細胞が出現する」という考え方、即ち、がん幹細胞と非幹細胞は相互移行が可能でありがん根治には両者を並行して根絶する必要があるという仮説 (図 6B) である。このどちらの仮説が肺がん幹細胞の性質に当てはまるのか検討を行った。

**図 7. がん幹細胞画分の可塑性**



一般に肺がん細胞は培養条件下で全ての細胞ががん幹細胞マーカーCD166 陽性になり、非対称分裂を行わない。我々は、種々条件検討を行い、培養細胞ががん幹細胞画分と、非

幹細胞画分に分化する条件を発見した。その上で培養肺がん細胞において、CD166 陽性細胞と陰性細胞を FACS にて分離し、それぞれの画分の増殖曲線を調べた。丸プロットが CD166 陽性細胞、四角プロットが CD166 陰性細胞の数を示す。3日目までは CD166 陽性画分の細胞のみ増殖しているように見受けられるが、5日目以降は両者とも増殖が観察された。また、この時点でどちらの画分からも CD166 陽性細胞と陰性細胞の両方が観察された (図 7)。さらに、7日後に細胞をリプレートすると、その増殖速度に差は観察されなかった。この結果は、増殖性の低い CD166 陰性細胞から、陽性細胞が出現することを示している。

さらに、CCS1 ノックダウン細胞 CD166 陽性および陰性画分を FACS にて分取し、それぞれの細胞各 1000 個ずつマウスに接種した。コントロールでは CD166 陰性細胞からも造腫瘍が確認された。これは in vitro 実験と同様に CD166 陰性細胞から陽性細胞への転換が起こったためと考えられる。これに対して、CCS1 をノックダウンした CD166 陰性細胞からは腫瘍形成が確認されなかった (図 8)。このことから CCS1 はマウスにおける造腫瘍性に一定の役割を果たしている可能性が示唆された。一つの可能性として、CCS1 が CD166 陰性細胞から陽性細胞への転換に必要な可能性が考えられる。

**図 8. マウスにおけるがん幹細胞の可塑性**

	CD166 ( + )	CD166 ( - )
Control	2/2	2/2
shCCS1	2/2	0/2



さらに、ゼノグラフトよりの腫瘍の回収条件、細胞培養条件あるいは、ショートヘアピンコンストラクトなどに関して各種条件検討を行った結果、臨床検体由来がん幹細胞を用いた CCS1 遺伝子のノックダウンが可能となった。ノックダウン後の細胞についてはさらに CD166 陽性細胞を FACS にて回収し一定数をマウス皮下及び尾静脈より接種した。通常 1000 個の細胞から腫瘍形成にいたるには数ヶ月要する。このため、マウスにおける腫瘍形成の有無につき現在も観察を継続している。

(2) 肺癌幹細胞に対する分子標的治療薬開発を行う。

実験開始時に予定していた 2000 種の低分子

化合物のうち、そのクオリティーあるいは保管量などを考慮し、644 化合物種を用いて標的候補タンパク質の酵素活性に対する阻害剤をスクリーニングした。1 化合物及びその類縁体で阻害活性を有する化合物が得られた(表 1)、細胞毒性、転移能に対する効果を調べたところ、実験的肺転移モデルにて、転移能を阻害することが明らかとなった。この結果を受けて、これら化合物を元に当初の予定通り最適化作業を開始した。

**表1 候補化合物及びその類縁体の EC50 (μM)**

化合物	A	B	C
EC50	41	54	64

#### 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 8 件)

1. Suzuki M, Cao K, Kato S, Komizu Y, Mizutani N, Tanaka K, Arima C, Tai MC, Yanagisawa K, Togawa N, Shiraishi T, Usami N, Taniguchi T, Fukui T, Yokoi K, Wakahara K, Hasegawa Y, Mizutani Y, Igarashi Y, Inokuchi J, Iwaki S, Fujii S, Satou A, Matsumoto Y, Ueoka R, Tamiya-Koizumi K, Murate T, Nakamura M, Kyogashima M, and Takahashi T. Targeting ceramide synthase 6-dependent metastasis-prone phenotype in lung cancer cells. *J Clin Inv.* 126: 254-265, 2016. 査読あり
2. Yamaguchi T, Lu C, Ida L, Yanagisawa K, Usukura J, Cheng J, Hotta N, Shimada Y, Isomura H, Suzuki M, Fujimoto T, Takahashi T. ROR1 sustains caveolae and survival signaling as a scaffold of cavin-1 and caveolin-1. *Nat Commun.* 7; Article number:10060, 2016. 査読あり
3. Ida L, Yamaguchi T, Yanagisawa K, Kajino T, Shimada Y, Suzuki M, Takahashi T. ROR1, a target of NKX2-1/TTF-1 lineage-survival oncogene, inhibits ASK1-mediated pro-apoptotic signaling in lung adenocarcinoma. *Cancer Science*, 107; 155-161, 2016. 査読あり
4. Mizutani N, Omori Y, Kawamoto Y, Sobue S, Ichihara M, Suzuki M, Kyogashima M, Nakamura M, Tamiya-Koizumi K, Nozawa Y, Murate T. Resveratrol-induced transcriptional up-regulation of ASMPase (SMPD1) of human leukemia and cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 470; 851-856, 2016. 査読あり

5. Nishimoto N, Suzuki M, Izuta S. Effect of pH on the misincorporation rate of DNA polymerase eta. *Biol Pharm Bull*, 2016 in press 査読あり
6. Mizutani N, Inoue M, Omori Y, Ito H, Tamiya-Koizumi K, Takagi A, Kojima T, Nakamura M, Iwaki S, Nakatochi M, Suzuki M, Nozawa Y, and Murate M. Increased Acid Ceramidase Expression depends on Upregulation of Androgen-dependent Deubiquitinases, USP2, in a Human Prostate Cancer Cell Line, LNCaP. *J Biochem.* 158: 309-319 2015 査読あり
7. Mizutani N, Omori Y, Tanaka K, Ito H, Takagi A, Kojima T, Nakatochi M, Ogiso H, Kawamoto Y, Nakamura M, Suzuki M, Kyogashima M, Tamiya-Koizumi K, Nozawa Y, Murate T. Increased SPHK2 Transcription of Human Colon Cancer Cells in Serum-Depleted Culture: The Involvement of CREB Transcription Factor. *J Cell Biochem.* 116: 2227-2238, 2015 査読あり
8. Tai MC, Kajino T, Nakatochi M, Arima C, Shimada Y, Suzuki M, Miyoshi H, Yatabe Y, Yanagisawa K, Takahashi T. miR-342-3p regulates MYC transcriptional activity via direct repression of E2F1 in human lung cancer. *Carcinogenesis.* 36; 1464-1473, 2015. 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

1. Targeting CERS6-dependent Sphingolipid Pathway in Lung Cancer Cells. Motoshi Suzuki, Takashi Murate, Mamoru Kyogashima and Takashi Takahashi. :第 74 回日本癌学会総会、2015 年 10 月 8 日、口演、愛知県名古屋市長古屋国際会議場

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/molcar/jp/>

#### 6. 研究組織 (1) 研究代表者

鈴木 元 (SUZUKI Motoshi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：80236017

#### (2) 研究分担者

福井 高幸 (FUKUI Takayuki)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師  
研究者番号：70463198

若原 恵子 (WAKAHARA Keiko)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師  
研究者番号： 00631433

加藤 省一 (KATO Sei-ichi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号： 30584669

西田 篤司 (Nishida Atsushi)  
千葉大学・大学院薬学研究院・教授  
研究者番号： 80130029