

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08370

研究課題名(和文)悪性中皮腫におけるがん幹細胞の生物学的特性の解明と治療法への応用

研究課題名(英文)Studies on biological properties of cancer stem cells in malignant mesothelioma

研究代表者

佐藤 鮎子 (Sato, Ayuko)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：20419823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫の治療抵抗性には、悪性中皮腫に特化したがん幹細胞(中皮腫幹細胞)が関与している可能性がある。中皮腫細胞株にiPS細胞誘導で使用される初期化因子を導入し、コロニーを形成した細胞を解析すると、スフェロイド形成能が亢進するとともに、細胞増殖能の低下および抗がん剤抵抗性の亢進が認められた。また、初期化因子を導入した細胞では、悪性胸膜中皮腫の再発症例の解析から中皮腫幹細胞関連分子の候補として見出された細胞接着分子の発現が亢進していた。これらの導入細胞ががん幹細胞としての特性を示したことより、中皮腫幹細胞を標的とする新しい診断や治療の開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：It is thought that cancer stem cells in malignant mesothelioma, mesothelioma stem cells, are involved in the resistance to treatment of malignant mesothelioma. When reprogramming factors for induced pluripotent stem cells were introduced into mesothelioma cell lines, colony forming cells appeared. The colony forming cells showed increase of spheroid formation, reduction of proliferation, and increase of resistance to an anticancer drug. In addition, in the colony forming cells, a cell adhesion molecule, which was found as a candidate for mesothelioma stem cell related factor by analyses of tumor specimens from recurrent malignant pleural mesothelioma, was more strongly expressed. Since these cells introduced with reprogramming factors showed characteristics as cancer stem cells, they may be useful to develop new diagnosis and therapy targeting mesothelioma stem cells.

研究分野：人体病理学

キーワード：悪性中皮腫

## 1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫はアスベスト曝露に起因して発生する難治性腫瘍である。日本では、過去に大量のアスベストを使用した影響から、悪性中皮腫の発症が増加していることに加えて、阪神・淡路大震災や東日本大震災における建物の倒壊に関連するアスベスト曝露という新たな問題が発生したことにより、患者数のさらなる増加が見込まれている。悪性中皮腫に対しては、外科手術、化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的治療が行われているが、その治療効果は十分ではなく、中皮腫の治療抵抗性を克服する新たな治療法の開発が求められる。

一方、がん幹細胞は、無限の自己複製能と抗がん剤に対する抵抗性を持つことが知られており、抗がん剤治療により大半のがん細胞が死滅しても、抗がん剤に抵抗性を示すがん幹細胞が残存すると、がん細胞に移行して再発や転移を引き起こすと考えられている (Nat Rev Cancer. 8:755-768, 2008)。悪性中皮腫の高い治療抵抗性にも、がん幹細胞の関与が考えられ、中皮腫細胞株では、CD9、CD24、CD26 などのがん幹細胞マーカーの発現が報告されている (Biochem Biophys Res Commun. 404:735-742, 2011)。しかし、悪性中皮腫のがん幹細胞 (中皮腫幹細胞) の特性や、それらを標的とした治療法に関する研究はほとんど進められてない。

## 2. 研究の目的

本研究は、悪性中皮腫の高い治療抵抗性に関連すると考えられる中皮腫幹細胞に着目し、iPS 細胞誘導因子 (初期化因子) を悪性中皮腫細胞株に導入することによって人工中皮腫幹細胞の樹立を試み、その生物学的特性を解析することによって、中皮腫幹細胞を標的とした治療法の開発につなげることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 人工中皮腫幹細胞の作製

免疫不全マウスに造腫瘍能を示す中皮腫細胞株を初期化因子導入のレシピエント細胞として選別し、マウスレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入に必要なウイルス受容体を発現させた。このうち、MST0-211H は二相型中皮腫に由来することから、上皮型成分あるいは肉腫型成分を反映すると考えられる細胞をクローニングした。得られた細胞 (クローン) の中から、リアルタイム RT-PCR 法を用いて幹細胞関連分子の発現を調べて遺伝子を導入する親株を決定し、iPS 細胞誘導因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4) を導入した。iPS 細胞樹立の手法に従って培養し、幹細胞様コロニーを形成した細胞を人工中皮腫幹細胞の候補とした。

### (2) 中皮腫幹細胞関連分子の探索

新たな中皮腫幹細胞関連分子の同定を目的として、悪性胸膜中皮腫の臨床検体を用いて、化学療法後に残存する抗がん剤抵抗性の腫瘍細胞で強く発現する分子を探索した。見出した分子について、(1) で作製した親株および人工中皮腫幹細胞の候補となるクローンにおける発現を調べ、幹細胞マーカーとしての有用性について検討した。

### (3) 人工中皮腫幹細胞の特性解析

親株と人工中皮腫幹細胞の候補となるクローンを用いて、それぞれにおける幹細胞関連分子の発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて比較した。(2) で得られた中皮腫幹細胞関連分子の発現についても同様に解析するとともに、フローサイトメトリーを用いてタンパク質レベルでの発現を比較した。各クローンの細胞増殖能を調べて親株と比較し、また、スフェロイド形成能を調べて、足場非依存性の細胞増殖能を比較した。さらに、悪性中皮腫の化学療法に用いられているシスプラチンに対する感受性を調べることによって、抗がん剤抵抗性を比較した。

## 4. 研究成果

### (1) 人工中皮腫幹細胞の作製

免疫不全マウスにおいて造腫瘍能を示す MST0-211H を、iPS 細胞誘導因子を導入する中皮腫細胞株の候補としたが、MST0-211H は二相型中皮腫に由来することから、上皮型成分あるいは肉腫型成分を反映すると考えられる細胞をクローニングした。得られたクローンのうち、E-Cadherin の発現が高い上皮様クローンでは、がん幹細胞マーカー CD44 や分化多能性マーカー NANOG の発現が高いのに対して、N-Cadherin の発現が高い肉腫様クローンでは、これらの幹細胞関連分子の発現が低かった。幹細胞関連分子の発現が低い肉腫様クローン (MST0-211H-S1) を親株として、iPS 細胞誘導因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4) を導入し、iPS 細胞樹立の手法に従って中皮腫細胞の初期化を試みた。コロニーを形成した細胞を解析すると、iPS 細胞誘導因子に加えて、幹細胞関連分子が親株 MST0-211H-S1 と比較して数十倍の高い発現を示すクローンが存在し、これらのうち、安定して継代培養が可能な 5 クローンが得られた。

### (2) 中皮腫幹細胞関連分子の探索

新たな中皮腫幹細胞関連分子の同定を目的として、悪性胸膜中皮腫の臨床検体を用いて、化学療法後に残存する抗がん剤抵抗性の腫瘍細胞で強く発現する分子を探索した。その結果、悪性中皮腫の局所再発症例では、細胞接着分子 (X) の強い発現が観察されることを見出した (図 1)。

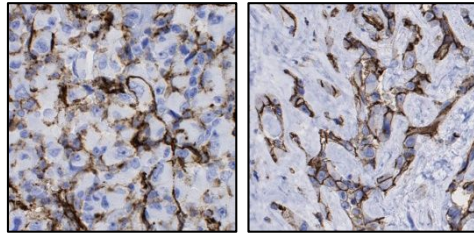


図1. 悪性胸膜中皮腫の局所再発症例(2例)における細胞接着分子(X)の発現.

MST0-211Hのセルブロックを用いて、細胞接着分子(X)の発現を免疫染色で調べると、一部の細胞が陽性を示したため、フローサイトメトリーを用いたソーティングによって(X)陽性群と(X)陰性群を分取し、それぞれの細胞群におけるiPS細胞誘導因子の発現をリアルタイムPCR法で調べた。OCT3/4, SOX2, KLF4は、(X)陽性群において(X)陰性群よりも強く発現していた。また、(1)でiPS細胞誘導因子を導入する親株の候補としてクローニングした上皮様クローンと肉腫様クローンにおける細胞接着分子(X)の発現を調べると、幹細胞関連分子(CD44, NANOG)と同様に、上皮様クローンでは発現が高く、肉腫様クローンでは発現が低かった。以上より、治療後の局所再発に寄与する抗がん剤抵抗性の腫瘍細胞で強く発現し、中皮腫細胞株において既知のマーカー分子と同様の発現パターンを示す細胞接着分子(X)は、新たな中皮腫幹細胞関連分子である可能性が示唆された。

### (3) 人工中皮腫幹細胞の特性解析

幹細胞関連分子(CD44, NANOG)の発現が高く、安定して継代培養が可能な5クローンが得られたため、これらを人工中皮腫幹細胞の候補として、がん幹細胞の特性について解析した。足場非依存性の細胞増殖能を反映するスフェロイド形成能は、全5クローンにおいて亢進しており、クローン間での差は認められなかった。一方、5クローン中3クローンでは、細胞増殖能が低下し、シスプラチンに対する抵抗性の亢進が認められた。臨床検体を用いた解析から、治療抵抗性との関連を見出した細胞接着分子(X)の発現を調べると、親株ではmRNAおよびタンパク質レベルでの発現が認められないのに対して、これらの3クローンでは約10倍に発現が上昇していた。*in vitro*におけるがん幹細胞の特性を有するこれらの3クローンは、悪性中皮腫の新規治療法を開発する上で、人工中皮腫幹細胞として重要なツールになると期待される。現在、免疫不全マウスにおける造腫瘍能について調べ、これらの細胞の*in vivo*における生物学的特性について検討している。

### 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8件)

Kinoshita Y, Sato A (5番目), Tsujimura T (6番目) et al (他7名). A combination of MTAP and BAP1 immunohistochemistry in pleural effusion cytology for the diagnosis of mesothelioma. *Cancer Cytopathol.* (査読有). 126(1):54-63, 2018. doi: 10.1002/cncy.21928.

Hida T, Sato A (4番目), Tsujimura T (5番目) et al (他8名).

Immunohistochemical detection of MTAP and BAP1 protein loss for mesothelioma diagnosis: Comparison with 9p21 FISH and BAP1 immunohistochemistry. *Lung Cancer.* (査読有). 104:98-105, 2017. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.12.017.

Wu D, Sato A (9番目), Tsujimura T (10番目) et al (他11名). Usefulness of p16/CDKN2A fluorescence in situ hybridization and BAP1 immunohistochemistry for the diagnosis of biphasic mesothelioma. *Ann Diagn Pathol.* (査読有). 26:31-37, 2017.

doi: 10.1016/j.anndiagpath.2016.10.010.

Yoshikawa Y, Sato A (5番目), Tsujimura T (6番目) et al (他17名). High-density array-CGH with targeted NGS unmask multiple noncontiguous minute deletions on chromosome 3p21 in mesothelioma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (査読有). 113(47):13432-13437, 2016. doi: 10.1073/pnas.1612074113

Hida T, Sato A (4番目), Tsujimura T (5番目) et al (他8名). BAP1 immunohistochemistry and p16 FISH results in combination provide higher confidence in malignant pleural mesothelioma diagnosis: ROC analysis of the two tests. *Pathol Int.* (査読有). 66(10):563-570, 2016.

doi: 10.1111/pin.12453.

Hamasaki M, Sato A (8番目), Tsujimura T (9番目) et al (他10名). Low homozygous/high heterozygous deletion status by p16 FISH correlates with a better prognostic group than high homozygous deletion status in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer.* (査読有). 99:155-61, 2016.

doi: 10.1016/j.lungcan.2016.07.011.

Emi M, Sato A (4番目), Tsujimura T (7

番目) et al (他 7 名).  
Frequent genomic rearrangements of  
BRCA1 associated protein-1 (BAP1) gene  
in Japanese malignant mesothelioma-  
characterization of deletions at exon  
level. J Hum Genet. (査読有).  
60(10):647-649, 2015.  
doi: 10.1038/jhg.2015.91.

[学会発表](計 20 件)

佐藤 鮎子, 篠原 義康, 阿部 晋也, 鍋島 一樹, 辻村 亨. 悪性胸膜中皮腫の診断における BAP1 免疫染色の有用性の検討. 第 106 回日本病理学会総会, 京王プラザホテル (東京) 2017.4.28.

篠原 義康, 佐藤 鮎子, 阿部 晋也, 辻村 亨. 悪性中皮腫細胞株におけるヒドロキシク  
ロロキンの細胞致死効果についての検討. 第 106 回日本病理学会総会, 京王プラザホテル (東京) 2017.4.28.

Tsujimura T, Sato A, Shinohara Y,  
Sumida A, Hasegawa S, Nakano T. Clinical,  
cytological, and molecular biological  
approaches to the diagnosis of early  
mesothelioma. The 19th International  
Congress of Cytology, Yokohama, Japan,  
May 30, 2016.

佐藤 鮎子, 篠原 義康, 清水 重喜, 隅田 安由美, 中野 孝司, 長谷川 誠紀, 鍋島 一樹,  
辻村 亨. 悪性胸膜中皮腫における液状化  
検体細胞診の有用性の検討. 第 105 回日本  
病理学会総会, 仙台国際センター (仙台)  
2016.5.13.

篠原 義康, 佐藤 鮎子, 隅田 安由美, 辻村 亨. 悪性中皮腫細胞株におけるオートファ  
ジーの役割. 第 105 回日本病理学会総会,  
仙台国際センター (仙台) 2016.5.12.

辻村 亨, 佐藤 鮎子, 篠原 義康, 工藤 朝雄,  
今橋 祐喜, 清水 重喜, 鍋島 一樹, 長  
谷川 誠紀, 中野 孝司. 中皮腫診断の現状と  
将来. 第 56 回日本臨床細胞学会総会春期  
大会, 松江テルサ (島根県松江市)  
2015.6.13.

佐藤 鮎子, 篠原 義康, 工藤 朝雄, 今橋 祐喜,  
中野 孝司, 長谷川 誠紀, 辻村 亨. 胸  
水検体を用いた悪性胸膜中皮腫の分子病  
理学的診断法の検討. 第 104 回日本病理学  
会総会, 名古屋国際会議場 (名古屋),  
2015.4.30.

篠原 義康, 佐藤 鮎子, 工藤 朝雄, 今橋 祐喜,  
中野 孝司, 長谷川 誠紀, 辻村 亨. 悪  
性中皮腫における上皮間葉転換分子  
TWIST1 の生物学的作用. 第 104 回日本病

理学会総会, 名古屋国際会議場 (名古屋),  
2015.4.30.

[図書](計 1 件)

清水 重喜, 鳥井 郁子, 佐藤 鮎子, 辻村 亨.  
中皮腫の遺伝子異常. 石綿関連疾患の病理  
とそのリスクコミュニケーション. 第 1  
章 石綿関連疾患の病理. 中皮腫の病理.  
91-102, 篠原出版新社, 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 鮎子 (SATO, Ayuko)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 20419823

(2) 研究分担者

辻村 亨 (TSUJIMURA, Tohru)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 20227408

篠原 義康 (SHINOHARA, Yoshiyasu)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 60723509