

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04297

研究課題名(和文)人工癌幹細胞技術を用いた肺腺癌浸潤部位形成のメカニズムとその制御法の研究

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・医学研究科・教授

研究者番号：50362778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：K-ras変異陽性の原発性肺腺癌細胞株であるA549に遺伝子導入を行い人工肺癌幹細胞様細胞の誘導に成功した。さらに誘導された細胞を、MSC(間葉系幹細胞)、HUVEC(血管内皮細胞)と共に3次元下で混合培養することにより、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。マイクロアレイによる解析の結果、iLCSCにおいてInterleukin (IL)-6の発現が特異的に亢進していた。さらに肺癌オルガノイドを用いたアッセイにより、IL-6はMSCを SMA陽性細胞に分化を促すことによって、肺癌組織構築に重要に関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で用いた肺癌オルガノイドの系により、肺癌幹細胞とその周囲間質細胞をターゲットにした薬剤スクリーニングが可能となる。従来の抗癌剤の感受性評価の方法として、in vivoで免疫不全マウスに対するゼノグラフトを用いた手法が頻用されている。しかし、この手法はわずか数種類の薬剤やその組み合わせによる効果を検討するにも、膨大な時間と労力を有する。本アッセイを用いることにより、より効率的な手法による多数の薬剤のスクリーニングが可能になると考えられる。我々は、本アッセイを用いてIL-6の遮断が肺癌幹細胞をターゲットにした治療になりうることを明らかにしているが、他の新規治療薬発見にもつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we successfully generated induced lung cancer stem like cells (iLCSC) by introducing OCT3/4, SOX2, KLF4 into A549 cells. In addition to properties that are conventionally referred to as CSC properties, the lung induced CSCs exhibited the ability to form lung cancer-like tissues in vitro with human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and mesenchymal stem cells (MSC), which showed structures and immunohistological patterns that were similar to human lung cancer tissues. We named them "lung cancer organoids". We found that interleukin-6 (IL-6), which was strongly expressed in iLCSC, facilitates the formation of lung cancer organoids via the conversion of mesenchymal stem cells into alpha-smooth muscle actin (SMA)-positive cells. Interestingly, the combination of anti-IL-6 antibody and cisplatin could destroy the lung cancer organoids, while cisplatin alone could not. These results suggest that IL-6 could be a novel therapeutic target in lung cancer.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 発生・分化 トランスレショナルリサーチ 癌幹細胞 バイオテクノロジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

原発性肺癌は国内および世界における癌死の原因の第一位となった。中でも、腺癌は著しく増加しており、喫煙との関連性が示唆される報告もみられる。本組織型では分子生物学的に上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子の変異との関連性が注目されるとともに、組織学的亜型として非浸潤型 (in situ) と浸潤型 (invasive) に分類の改変が進められ 1)、その臨床的意義について研究が進みつつある。この中では、非浸潤部位と浸潤部位の混在、そしてその割合による治療成績の違いについて論じられている 2)。この病理組織学的分類において肺腺癌の進展様式は、非浸潤病変から何らかの原因で浸潤部位が生じ、それが拡大していくとの考え方が主流である。このような変化のメカニズムについては、癌幹細胞の関与が疑われているものの未だ解明されていない。

2014年に我々の研究グループは iPS 細胞技術を応用し、大腸癌細胞株に体細胞初期化因子を導入後、癌細胞培養環境で培養を行うことにより、癌幹細胞様の性質を獲得した細胞を誘導することに成功している。さらにそれらをセルソーターにより回収する方法を確立した 3)。この手法を原発性肺癌細胞株に適用し、肺癌幹細胞様の性質を獲得した細胞を誘導・回収することを目的とする。さらに、こうして得られた細胞の解析により ①癌幹細胞理論、②癌・宿主相互作用、③癌細胞の上皮間葉転換を統合的に捉えることで、肺腺癌の浸潤部位形成と伸展機序を解明し、さらにその制御法を確立することを本研究の目的とする。そして、その中での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影響について検討する。

原発性肺癌細胞株 (A549, 図 1) にレトロウイルスベクターによる体細胞初期化因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4) の導入を行った。遺伝子導入後 10 日~15 日目に、体細胞初期化因子を導入した A549 細胞においてのみ、コロニーの出現を認めた。さらに、コロニーのみを回収し培養することにより、巨大なコロニーを形成した (iLCSC, 図 2)。

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、得られた Sphere のパラフィン包埋ブロックを作成し、連続切片を作成した。これを Hematoxylin eosin (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 Sphere を形成した。iLCSC から得られた Sphere は、肺腺癌組織と同様に、 α 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。以上より、iLCSC から得られた Sphere を、肺癌オルガノイドと名付けた。マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析の結果 iLCSC において特異的に IL-6 の発現が著明に高くなっていた (図 3)。肺癌オルガノイドを用いて、抗がん剤感受性試験を行ったところ、シスプラチンに加えて、抗 IL-6 抗体を用いて IL-6 シグナルを抑制することによって、肺癌オルガノイドに対する抗がん剤感受性が高くなることを明らかにした (図 4)。

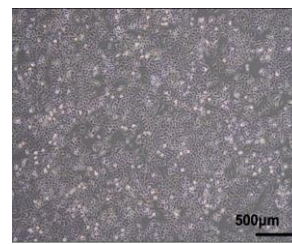


図 1 因子導入前の A549 細胞

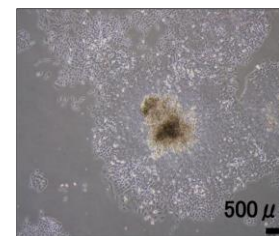


図 2 人工肺癌幹細胞

<マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析>

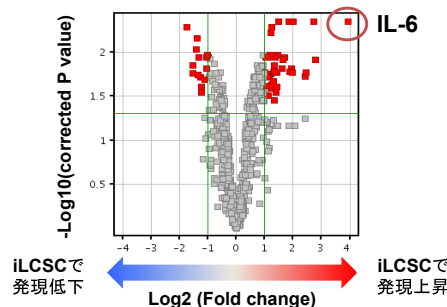


図 3 網羅的遺伝子発現解析

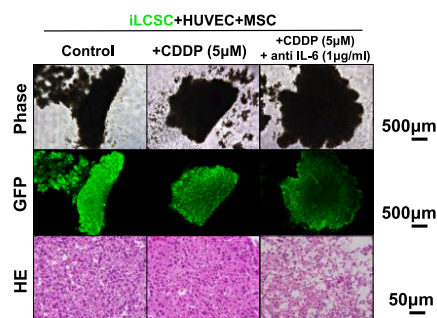


図 4 肺癌オルガノイドを用いた抗癌剤感受性評価アッセイ

2. 研究の目的

本研究で誘導される iLCSC の *in vivo* における腫瘍形成能を調べ、癌幹細胞性について評価する。また、肺腺癌臨床検体を用いて、IL-6mRNA を高発現している上皮系細胞の有無について明らかにする。

3. 研究の方法

In vivo における腫瘍形成能および病理学的評価：A549 細胞及び iLCSC を、それぞれ免疫不全マウスの皮下に 1.0×10^6 個ずつ注入し、腫瘍形成能を比較した。さらに腫瘍の HE 染色、免疫組織化学 (α SMA、CD34) を行い、病理学的な比較を行った。肺腺癌臨床検体における IL-6mRNA 陽性細胞の確認：肺腺癌切除検体を用いて、IL-6mRNA に対する *in situ* hybridization と上皮系マーカーである CAM5.2 を 2 重染色することにより、肺腺癌切除検体内に IL-6mRNA 陽性腫瘍細胞が存在しているのかを調べた。

4. 研究成果

In vivo における腫瘍形成能および病理学的評価：*In vivo* における腫瘍形成能は、A549 細胞よりも iLCSC において有意に高かった。病理学的な評価を行ったところ、HE 染色において病理組織像に両者の差を認めなかった。また α SMA 及び CD34 の免疫組織化学においても、両者に明ら

肺腺癌臨床検体における IL-6mRNA 陽性細胞の確認：肺腺癌臨床検体において IL-6 mRNA の *in situ* hybridization と CAM5.2 で 2 重染色したところ、CAM5.2 陽性かつ IL-6mRNA 陽性の腫瘍細胞を認めた(図 5)。以上の結果より、IL-6mRNA 陽性肺腺癌細胞は、肺腺癌臨床検体において存在することが明らかになった。シスプラチンと IL-6 シグナルの遮断は、肺癌幹細胞をターゲットにした新規治療法になると考えられた。

我々は、これまでの研究から A549 細胞に OCT3/4, SOX2, KLF4 を遺伝子導入することによって iLCSC が誘導でき、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。さらに、IL-6 シグナルの抑制は、従来の抗がん剤の効果を高めることが明らかになった。IL-6 は、たばこの煙に反応してヒト肺胞上皮細胞において、発現が上昇する遺伝子として報告されており、また発癌への関与も示唆されている 4)。今年度の研究から、iLCSC は *in vivo* において腫瘍形成能が高いことを明らかにした。iLCSC の癌幹細胞性の高さを示す結果であると考えられる。また肺癌切除臨床検体を用いて、IL-6 陽性の肺腺癌細胞が存在することを明らかにした。以上により、IL-6 シグナルの阻害が、肺癌幹細胞をターゲットにした治療法として、臨床応用可能であることが示唆された。

IL-6 は様々な生理的な機能をもったサイトカインであり、抗癌剤抵抗性や浸潤、癌幹細胞性への関与などが報告されている。また IL-6 は、たばこの煙に反応してヒト肺胞上皮細胞において、発現が上昇する遺伝子として報告されており、発癌への関与も示唆されている 4) IL-6 の阻害薬は、関節リウマチやキャッスルマン病に対する治療薬として、すでに臨床の現場で用いられている。そのため、肺癌に対する新規治療薬開発よりも、より少ない労力で臨床応用が可能になると思われる。

今後の展望として、本研究で用いた肺癌オルガノイドの系を用いることにより、肺癌幹細胞とその周囲間質細胞をターゲットにした薬剤スクリーニングが可能となる。従来の抗癌剤の感受性評価の方法として、*in vivo* で免疫不全マウスに対するゼノグラフトを用いた手法が頻用さ

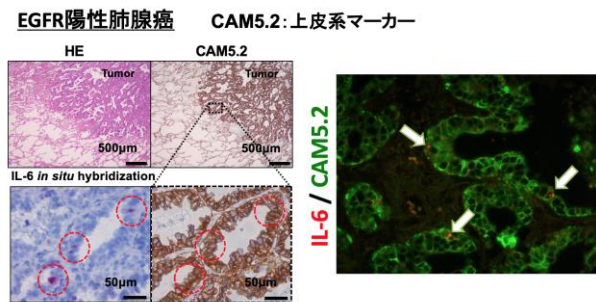


図 5 肺腺癌臨床検体における IL-6mRNA 陽性細胞の確認

れている。しかし、この手法はわずか数種類の薬剤やその組み合わせによる効果を検討するにも、膨大な時間と労力を有する。本アッセイを用いることにより、より効率的な手法による多数の薬剤のスクリーニングが可能になると考えられる。我々は、本アッセイを用いて IL-6 の遮断が肺癌幹細胞をターゲットにした治療になりうることを明らかにしているが、他の新規治療薬発見にもつながるのではないかと考えられる。

引用文献

- ① Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *Journal of thoracic oncology*. 2011;6(2):244-85.
- ② Asamura H, Hishida T, Suzuki K et al. Radiographically determined noninvasive adenocarcinoma of the lung: survival outcomes of Japan Clinical Oncology Group 0201. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2013;146(1):24-30.
- ③ Oshima N, Yamada Y, Nagayama S, et al. Induction of cancer stem cell properties in colon cancer cells by defined factors. *PloS one*. 2014;9(7):e101735.
- ④ A Miller, GD Brooks, L McLeod, S Ruwanpura and BJ Jenkins. Differential involvement of gp130 signalling pathways in modulating tobacco carcinogen-induced lung tumourigenesis. *Oncogene* (2014), 1–10.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Saji Takeshi, Nishita Michiru, Ogawa Hiroyuki, Doi Takefumi, Sakai Yasuhiro, Maniwa Yoshimasa, Minami Yasuhiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Critical role of the Ror-family of receptor tyrosine kinases in invasion and proliferation of malignant pleural mesothelioma cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 606 ~ 613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12599	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ogawa Hiroyuki, Koyanagi-Aoi Michiyo, Otani Kyoko, Zen Yoh, Maniwa Yoshimasa, Aoi Takashi	4. 巻 7
2. 論文標題 Interleukin-6 blockade attenuates lung cancer tissue construction integrated by cancer stem cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-12017-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Minami Kazuhiro, Tanaka Yugo, Ogawa Hiroyuki, Jimbo Naoe, Nishio Wataru, Yoshimura Masahiro, Itoh Tomoo, Maniwa Yoshimasa	4. 巻 10
2. 論文標題 Neuroendocrine marker staining pattern categorization of small sized pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 2152 ~ 2160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.13202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ogawa Hiroyuki, Tanaka Yugo, Kitamura Yoshitaka, Shimizu Nahoko, Doi Takefumi, Hokka Daisuke, Tane Shinya, Nishio Wataru, Yoshimura Masahiro, Maniwa Yoshimasa	4. 巻 11
2. 論文標題 Efficacy of perioperative chemotherapy for pulmonary high-grade neuroendocrine carcinomas: a propensity score matching analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Disease	6. 最初と最後の頁 1145 ~ 1154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jtd.2019.04.56	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ogawa, H., Koyanagi-Aoi, M., Aoi, T., Maniwa, Y
2. 発表標題 Interleukin-6 blockade, a novel cancer stem cell targeted therapy, attenuates lung cancer tissue construction
3. 学会等名 American Association for Cancer Research annual meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	青井 貴之 (Aoi Takashi) (00546997)	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授 (14501)	