

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09631

研究課題名(和文) 肺がん幹細胞の起源の違いに基づく新たな治療標的の探索

研究課題名(英文) Establishment of new target therapy depending on the origin of lung cancer stem cell

研究代表者

熊野 恵城 (KUMANO, Keiki)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90396721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Bmi1陽性細胞においてNotchシグナルの抑制による挙動を観察した。Bmi1陽性細胞からAT1細胞への分化が観察された。Bmi1は気管支-肺胞の境界に存在するBronchio-Alveolar stem cell (BASC)にも発現しており、BASCにおいてNotchシグナルの抑制により、Bmi1陽性細胞由来の神経内分泌細胞が認められた。

Kras変異により、Bmi1陽性細胞からclonalに腫瘍化が起こるが、Notchシグナル抑制により、初期のがん化過程には影響がないが、12w以降でがん化が抑制された。BASC由来のがんについては神経内分泌マーカーが陽性の腫瘍の発症が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではがんの起源細胞の違いが、がんの種類を決定するという仮設のもとに、肺がんの起源細胞や発症メカニズムを明らかにすることで、難治性であり予後不良である肺がんの治療法の確立を目指すことを目的とする。肺がんの起源細胞としてBmi1陽性細胞を同定した。Bmi1陽性細胞はfacultative stem cellである1型肺胞上皮細胞とBASCからなり、それらはNotchの抑制により異なる挙動を示した。

発がん過程を経時的に観察することにより、臨床検体ではほとんど見つかることのない前がん病変の検出も可能となり、前がん病変の新たなバイオマーカーの発見や発がんへ至る分子メカニズムの同定が可能となる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of suppression of Notch signaling in Bmi1 (+) cells. Bmi1(+) AT2 cells spontaneously differentiated to the AT1 cells. Bronchio-Alveolar stem cell (BASC) also expressed Bmi1 and differentiated to the neuroendocrine cells by the inhibition of Notch signaling.

Using active Kras mutation, Bmi1(+) cells clonally expanded and developed lung adenocarcinoma. Although by the inhibition of Notch signaling, the initial step of lung cancer formation was not affected, clonal lung cancer formation was suppressed after 12 weeks. Bmi1(+) BASC developed the neuroendocrine tumor by Kras activation and Notch inhibition.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺がん Bmi1 Notch

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、世界的に肺がんが増加し続けており、がんによる死亡の第一位となっている。その治療法の開発のために多くの取り組みがなされているが、依然として外科的切除が可能な初期のがんを除き、非常に治療が困難である。再発・転移の原因として近年提唱されているのが、がん幹細胞仮説である。がん幹細胞仮説は、腫瘍組織中にも、正常組織と同様な幹細胞が存在し、それらは自己を複製する能力を持つとともに、少数存在するだけで元の腫瘍組織と同様な腫瘍を形成する能力をもつことが示されてきている。さらに、がん幹細胞は抗がん剤や放射線への抵抗性を有しているため治療の際に残存しやすく、再発・転移の原因となっていると考えられている。したがって、がん幹細胞を標的とした治療法を確立することで再発、転移のリスクの少ないがん治療へとつながることが期待される。そのためには、がん幹細胞の同定も含めがん幹細胞の研究の進んでいない腫瘍において、がん幹細胞の性状を分子レベルで理解することが重要であると考えられる。それにより、抗体療法のための癌幹細胞特異的抗原の同定、直接の治療標的となるがん幹細胞においてのみ活性化している分子の同定、がん幹細胞の自己複製や生存にのみ関わっている分子の同定により、がん幹細胞を選択的に死滅させる薬剤の開発が可能となる。

がん幹細胞の起源としては、本来自己複製能を有していた正常幹細胞に遺伝子異常が起こった可能性と、自己複製能を有さない前駆細胞レベルに自己複製能を寄与する遺伝子異常が起こった可能性がある。細胞の turnover が活発な造血組織や腸の幹細胞とは違い、分裂増殖の乏しい肺（特に肺胞領域における）の幹細胞としては、2型肺胞上皮細胞(alveolar type 2(AT2) cell)が肺胞の幹細胞として機能することが知られている。このようにサーファクタントを分泌する機能を持つ本来分化した AT2 細胞が生体の恒常性の維持や再生に関与するため、これらは facultative stem cell として機能していると考えられている。しかしながら、すべての AT2 細胞が幹細胞として機能するわけではなく(Nature 2014;507:190-194) 一部の細胞に幹細胞の機能を付加するメカニズムが存在するはずであるが、その詳細は不明であり、現状では両者を区別することは難しい。また近年、AT2 細胞以外にも、マウスにおいて bronchio-alveolar stem cell (BASC)(Cell 2005;121:823-35)や distal airway stem cell (DASC)(Nature 2014;517:616-20)、lineage negative epithelial progenitor cell (LNEP)(Nature 2014;517:621-5)といった未分化な幹細胞や前駆細胞の存在が想定されている。ヒトにおいては E-Cad + Lgr6+の肺胞上皮幹細胞(EMBO J 2012;31:3431-3441)や c-kit 陽性の幹細胞(NEJM 2011;364:1795-1806)の存在も報告されている。

白血病幹細胞では、同じ遺伝子異常を有していても白血病幹細胞の発生起源の違いにより(造血幹細胞 or 分化した前駆細胞由来など)白血病の腫瘍特性(治療に対する反応性等)や遺伝子発現パターン等に違いが生じることが知られているが、肺がんなどの固形癌においては、がん幹細胞の発生起源の違いによる造腫瘍性の違いについての検討はほとんどなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

ポリコム構成分子の1つである Bmi1 に注目して検討を行う。Bmi1 は SPC 陽性の AT2 細胞の一部に発現しており、系譜追跡法を用いた検討により、放射線による肺障害モデルにおいて、Bmi1 陽性細胞から I 型肺胞上皮および II 型肺胞上皮の両方が再生されることが明らかとなり、Bmi1 陽性細胞は肺胞領域の幹前駆細胞であることが確認できる。また活性化型 Kras を用いた発がんモデルにおいても Bmi1 陽性細胞からの発がんを確認している。これらのことは Bmi1 が AT2 細胞における再生およびがんの起源となる幹細胞マーカーとして働く可能性を示唆している。

1) 正常肺幹細胞の同定

上記のように facultative stem cell として機能する AT2 細胞において Bmi1 が幹細胞マーカーとして働く可能性をこれまでに示しているが、本研究ではその機能的役割と幹細胞活性を付与する分子メカニズムについて検討する。またその他の上記の未分化幹細胞においても、様々な傷害モデルを用いて幹細胞の検証(系譜追跡法など)を行う。既知の遺伝子も含め Krt5, Lgr5 or Lgr6, c-kit, KLF5 等に注目し、幹細胞の同定を試みる。

2) 肺がん幹細胞の起源の同定

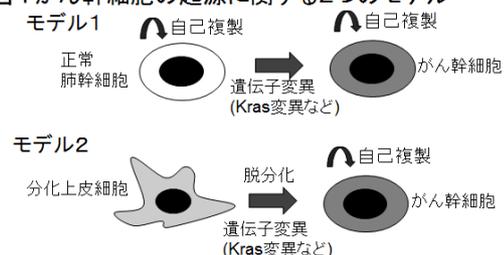
Kras 変異は肺腺癌の 25 - 50% を占め、すでに分子標的薬が樹立されている epidermal growth factor receptor(EGFR) 変異や anaplastic lymphoma kinase(ALK)変異による肺がんとは排他的なものである。本研究では Kras 変異モデルマウスを用いて肺正常幹細胞の解析と肺がん幹細胞との比較を行う。

細胞系譜追跡法によって肺がん発症の起源に関し、がん幹細胞が未分化幹細胞に由来するのか、あるいは分化肺胞上皮細胞(facultative stem cell)を含む、両者の区別が難しいため)に由来するのかという根本的かつ重要な命題に取り組む(図1)。

腺癌のモデルとして発生起源の違いから以下の2つのモデルを用いる。

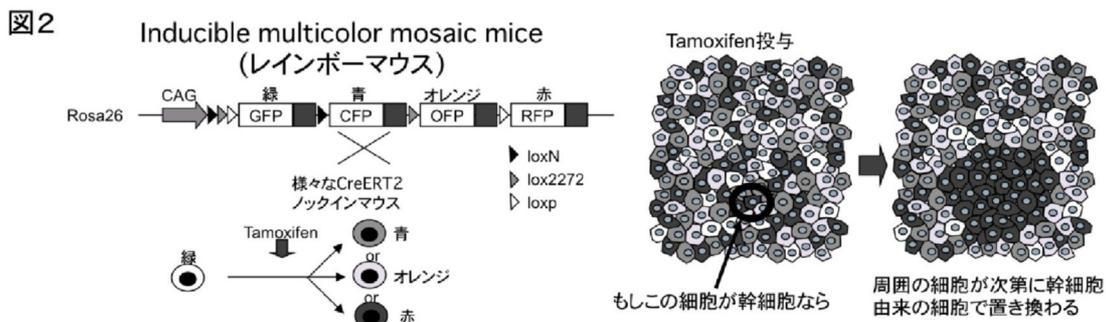
1) 幹細胞由来：幹細胞マーカーを発現する細胞に活性化型変異を発現させる。

図1 がん幹細胞の起源に関する2つのモデル



2) AT2 細胞 or facultative stem cell or AT1 細胞由来: AT1 細胞や AT2 細胞 (facultative stem cell を含む) 特異的に TM 誘導により Kras 変異を発現させる。Bmi1^{-/-} マウスを用いた種々の肺癌モデルにおいて癌の発症・維持が抑制されることから、Bmi1 は facultative stem cell からのがん幹細胞化に関与していると考えられる。

いずれのモデルにおいてもマルチカラーモザイクマウス (Rainbow マウス) (図 2) を同時に用いて腫瘍の clonality を検討する。これまでの Kras 変異モデルマウスを用いた肺癌モデルは主に adenovirus により Cre を発現させるシステムを用いているため、肺癌発症の起源について特定されていなかったが、今回のモデルでは発がんの起源となる細胞が特定される。さらに発がん過程を経時的に観察することにより、臨床検体ではほとんど見つかることのない前がん病変の検出も可能となり、前がん病変の新たなバイオマーカーの発見や発がんへ至る分子メカニズムの同定が可能となる。また、発がん後のがんの形質転換についてもその分子メカニズムも含めた検証が可能である。



3. 研究の方法

1. 正常肺幹細胞の同定

組織の定常状態の維持に対する幹細胞の役割を検討するには、一般に系譜追跡法により、組織への contribution を検討するのが最も確実な方法である。そのためには幹細胞を標識するマーカー遺伝子を同定する必要がある。成体幹細胞に発現しているマーカーの各種プロモーター下に Cre-ERT2 を発現する遺伝子改変マウスと Cre の DNA recombinase 活性により蛍光蛋白質を発現するレポーターマウス (Rosa26-rainbow (GCOC) など) を掛け合わせ、Tamoxifen (TM) を腹腔内投与することで Cre-ERT2 を活性化させ幹細胞を in vivo にて標識し、幹細胞およびその子孫である分化細胞の追跡を行う。長期に渡る観察により幹細胞の持つ自己複製能と多分化能を確認する。

1) 既知の幹細胞マーカーによる検索

1-1) facultative stem cell

facultative stem cell として機能する AT2 細胞において Bmi1 が幹細胞マーカーとして働く可能性をこれまでに示しているが、本研究ではその機能的役割と幹細胞活性を付与する分子メカニズムについて検討するため以下の検討を行う。

定常状態及び放射線照射などの傷害時において、SPC-CreERT2/GCOC/Bmi1^{flox/flox} or SPC-CreERT2/GCOC/Bmi1 マウスを用いて Bmi1 の欠失あるいは過剰発現による再生過程や遺伝子発現等を比較することにより facultative stem cell における Bmi1 の機能的役割についての検証を行う。

また、Notch レポーターマウス (TP1-YFP マウス) を用いた予備的な検討により facultative stem cell における Notch シグナルの活性化を確認しており、Notch シグナルの抑制 (Bmi1-CreERT2/GCOC/RBPJ^{flox/flox}) による facultative stem cell の挙動を観察する。

その際に

- 1) インフルエンザウイルスによる肺胞の破壊
- 2) Bleomycin 投与による肺線維症モデル
- 3) エラストラーゼ + LPS 投与による COPD モデル

等の障害モデルにおいて、これらの幹細胞の再生への寄与を検討する。

2. 肺癌幹細胞の起源の同定

上記のように肺の幹細胞を同定した後、Kras 変異を 未分化幹細胞あるいは 分化肺胞上皮細胞 (facultative stem cell を含む) に特異的に発現させることで、細胞系譜追跡法によって肺癌発症の起源を同定し、がん幹細胞が 未分化幹細胞に由来するのか、あるいは facultative stem cell or 分化肺胞上皮細胞の脱分化によって発生するのかという根本的かつ重要な命題に取り組む。

誘導型 Kras 変異モデルマウス (Loxp-STOP-Loxp (LSL) Kras^{G12D}) を以下のように用いる。

- 1) 幹細胞由来: Bmi1-CreERT2, Lgr5 or Lgr6-CreERT2, c-kit-CreERT2, TERT-CreERT2 などにより幹細胞マーカーを発現する細胞に TM 誘導により Kras 変異を発現させる。
- 2) 分化した肺胞上皮細胞 (AT2 cell or AT1 cell) or facultative stem cell 由来: SPC

(surfactant protein C) CreERT2 により AT2 細胞特異的に、HOPX-CreERT2 により AT1 細胞特異的に、Bmi1-CreERT2 により facultative stem cell 特異的に TM 誘導により Kras 変異を発現させる。Bmi1^{-/-} マウスを用いた種々の肺癌モデルにおいて癌の発症・維持が抑制されることから、Bmi1 は facultative stem cell からのがん幹細胞化に関与していると考えられる。いずれのモデルにおいても、Rainbow マウスを同時に用いて腫瘍の clonality を検討する。また RBPf/f マウスを用いて Notch シグナルの抑制影響についても検討する。

4. 研究成果

成体幹細胞に発現しているマーカーの各種プロモーター下に Cre-ERT2 を発現する遺伝子改変マウスと Cre の DNA recombinase 活性により蛍光蛋白質を発現するレポーターマウス (Rosa26-rainbow など) を掛け合わせ、Tamoxifen を腹腔内投与することで Cre-ERT2 を活性化させ幹細胞を in vivo にて標識し、幹細胞およびその子孫である分化細胞の追跡を行った。Bmi1 については放射線による肺障害モデルにおいて、I 型肺胞上皮および II 型肺胞上皮の両方が再生されることがわかり、これらは肺胞領域の幹前駆細胞であることがわかった。Bmi1 は SPC 陽性の II 型肺胞上皮細胞の一部に発現していることを確認した。

これにより facultative stem cell として機能する AT2 細胞において Bmi1 が幹細胞マーカーとして働く可能性があると考えられるが、その機能的役割と幹細胞活性を付与する分子メカニズムについて検討するため以下の検討を行った。

Notch レポーターマウス (TP1-YFP マウス) を用いた予備的な検討により facultative stem cell における Notch シグナルの活性化を確認した。facultative stem cell である Bmi1 陽性細胞において Notch シグナルの抑制 (Bmi1-CreERT2/GCOC/RBPJflox/flox) による facultative stem cell の挙動を観察した。その結果放射線照射などの障害を与えることなく、Bmi1 陽性細胞から AT1 細胞への spontaneous な分化が観察された。このことは Notch シグナルが facultative stem cell である AT2 細胞の分化を抑制していると考えられる。一方でナフタレンを用いた障害モデルにより Bmi1 は気管支-肺胞の境界に存在する Bronchio-Alveolar stem cell (BASC) にも発現していることを証明した。同様に BASC において Notch シグナルの抑制 (Bmi1-CreERT2/GCOC/RBPJflox/flox) を行ったところ、Bmi1 陽性細胞由来の神経内分泌細胞が認められた。

Bmi1-CreERT2/Loxp-STOP-Loxp (LSL) KrasG12D を作製することにより幹細胞マーカーを発現する細胞に TM 誘導により Kras 変異を発現させたところ、1 つの幹細胞から clonal に腫瘍化が起こることを確認した。この facultative stem cell からのがん化においても上記と同様に Notch シグナルを抑制することで、初期のがん化過程には影響がないが、12w 以降でがん化が抑制されることがわかった。一方で分化した II 型肺胞上皮細胞 (alveolar type 2 (AT2) cell) 由来：SPC-CreERT2/LSL KrasG12D により AT2 細胞特異的に TM 誘導により Kras 変異を発現させたところ、AT2 細胞の clonality な増殖は認められたが、腫瘍化することなく現在のところ全例 TM 投与後 8w 以内で死亡しており、おそらく肺サーファクタントの過剰分泌による窒息が死因と考えられる。このことは II 型肺胞上皮細胞の内 Bmi1 を発現する細胞から肺がんが発生する可能性を示唆する。

BASC 由来のがんについては神経内分泌マーカーが陽性の腫瘍の発症が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Taoka K, Arai S, Kataoka K, Hosoi M, Miyauchi M, Yamazaki S, Honda A, Aixinjueluo W, Kobayashi T, Kumano K, Yoshimi A, Otsu M, Niwa A, Nakahata T, Nakauchi H, Kurokawa M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Using patient-derived iPSCs to develop humanized mouse models for chronic myelomonocytic leukemia and therapeutic drug identification, including liposomal clodronate.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15855-15867
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-34193-1	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 該当する
1. 著者名 Miyauchi M, Koya J, Arai S, Yamazaki S, Honda A, Kataoka K, Yoshimi A, Taoka K, Kumano K, Kurokawa M	4. 巻 10
2. 論文標題 ADAM8 Is an Antigen of Tyrosine Kinase Inhibitor-Resistant Chronic Myeloid Leukemia Cells Identified by Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1115-1130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2018.01.015	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 該当する
1. 著者名 Yanai H, Atsumi N, Tanaka T, Nakamura N, Komai Y, Omachi T, Tanaka K, Ishigaki K, Saiga K, Ohsugi H, Tokuyama Y, Imahashi Y, Ohe S, Hisha H, Yoshida N, Kumano K, Kon M, Ueno H.	4. 巻 7
2. 論文標題 Intestinal stem cells contribute to the maturation of the neonatal small intestine and colon independently of digestive activity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9891-9901
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-09927-2.	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 該当する
1. 著者名 Yanai H, Atsumi N, Tanaka T, Nakamura N, Komai Y, Omachi T, Tanaka K, Ishigaki K, Saiga K, Ohsugi H, Tokuyama Y, Imahashi Y, Ohe S, Hisha H, Yoshida N, Kumano K, Kon M, Ueno H.	4. 巻 7
2. 論文標題 Intestinal cancer stem cells marked by Bmi1 or Lgr5 expression contribute to tumor propagation via clonal expansion.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 41838-41848
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep41838.	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 該当する

1. 著者名 Takashi Matsukawa, Tomotaka Yamamoto, Akira Honda, Takashi Toya, Hiroyuki Ishiura, Jun Mitsui, Masaki Tanaka, Akihito Hao, Akihito Shinohara, Mizuki Ogura, Keisuke Kataoka, Sachiko Seo, Keiki Kumano, et.al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinical efficacy of haematopoietic stem cell transplantation for adult adrenoleukodystrophy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Communications	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1093/braincomms/fcz048	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 該当する

〔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 Masashi Miyauchi, Junji Koya, Shunya Arai, Sho Yamazaki, Akira Honda, Keisuke Kataoka, Akihito Yoshimi, Kazuki Taoka, Keiki Kumano, Mineo Kurokawa.
2. 発表標題 Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Identify ADAM8(CD156) as a Novel Antigen of TKI-resistant Chronic Myeloid Leukemia Cells.
3. 学会等名 The 15th Stem Cell Research Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----