

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09295

研究課題名（和文）肺扁平上皮癌におけるCD271標的治療開発のための基礎検討

研究課題名（英文）Development of a new therapy to target CD271-positive cancer cells in patients with lung squamous cell carcinoma

研究代表者

阿部 二郎（Abe, Jiro）

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）・がん幹細胞研究部・特任研究員

研究者番号：10573686

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：肺癌は、全癌中死亡者数が一位である悪性度の高い癌であり、様々な治療法が研究されている。しかし、そのほとんどは腺癌に関するものであり、全体の三割を占める扁平上皮癌については、有効な治療標的の報告がほとんどない。私たちは、肺扁平上皮がんにおいてCD271ががん細胞の増殖能に重要な役割を果たすことを明らかにした。今後、CD271を標的とした肺がん治療に向けて知見を蓄積する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの固形がんは薬物療法の効果が乏しく、常に新しい治療標的が待たれている。扁平上皮癌は共通した遺伝子変異に乏しく、ゲノム情報からは治療標的が見つかりにくい。私たちはスクリーニングの結果、CD271が肺扁平上皮がんにおいて増殖を司ることを明らかにした。CD271を阻害することで腫瘍縮小することが期待できる。臨床応用のためにさらなる基礎実験と知見の蓄積が必要である。

研究成果の概要（英文）：Lung cancer is a highly lethal malignancy and accounts for the highest mortality rate among all cancers. Most therapeutic approaches have been studied in relation to adenocarcinoma, and effective treatment targets are scarce for squamous cell carcinoma, which represents 30% of all cases. We have shown that CD271 plays a significant role in the proliferative capacity of lung squamous cell carcinoma. Future research needs to focus on developing better understanding for targeting CD271 in the therapy of lung cancer.

研究分野：がん生物学

キーワード：肺癌

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は、全癌中死亡者数が一位である悪性度の高い癌であり、様々な治療法が研究されている。しかし、そのほとんどは腺癌に関するものであり、全体の三割を占める扁平上皮癌については、有効な治療標的の報告がほとんどない。近年、発癌は正常幹細胞の変異によって引き起こされるという知見が蓄積されつつある。申請者らの研究室では、頭頸部(下咽頭)・気管支・食道・外陰部・陰茎・子宮頸部などの組織において、幹細胞が多く含まれる正常粘膜上皮の基底層に CD271 (神経成長因子受容体) が強く発現することに着目し、CD271 と発癌との関連を研究してきた。現在まで、下咽頭癌において CD271 陽性細胞が高い造腫瘍能を有すること (PLOS ONE, 2013) また、CD271 自身が下咽頭癌の増殖を強く制御する因子であること (Sci. Rep., 2016. 図 1) を報告し、CD271 が治療標的となり得ることを報告してきた。申請者らはこの研究を基に、正常上皮基底層で CD271 を発現する臓器の癌(頭頸部・肺・食道・外陰部・陰茎・子宮頸癌など) 主として扁平上皮癌の悪性化に CD271 が関与すると考えた。これらの癌の中でも特に罹患数の多い肺癌(扁平上皮癌・腺癌)の免疫染色を行ったところ、肺腺癌において CD271 陽性症例は認められなかった(0/25 例)。一方、肺扁平上皮癌では CD271 陽性が認められた(52/76 例)。さらに、肺扁平上皮癌患者の中でも CD271 陽性症例は有意に予後不良であった(図 2)。以上のことから、申請者らは CD271 が肺扁平上皮癌の悪性化に関与するという仮説を立てた。これが正しければ CD271 陽性癌細胞を治療標的とすることで、癌組織全体の縮小が期待出来る。

## 2. 研究の目的

申請者らは、肺扁平上皮癌の腫瘍増殖制御因子の候補として、CD271 を見出した。本申請では、「CD271 陽性癌細胞を標的として、肺扁平上皮癌の縮小効果は得られるか?」を検証し、治療法開発を目指すとともに、従来不明であった CD271 陽性細胞による腫瘍維持機構を解明し、扁平上皮癌の悪性化機序の一端を明らかとすることを目指している。

## 3. 研究の方法

### (3)-1 肺扁平上皮癌細胞において、CD271 は癌細胞の増殖に寄与するのか?

肺扁平上皮癌において、CD271 が腫瘍の悪性化に寄与するかどうかを検証するため、患者由来肺扁平上皮癌より独自に樹立した細胞株を用いて、CD271 抑制試験及び CD271 陽性細胞除去試験を行い、*in vitro* での増殖抑制効果を検証する。

#### (3)-1-1 siRNA を用いた CD271 のノックダウン

樹立した肺扁平上皮癌細胞株 (MCC148c, MCC121c, MCC138c) に siRNA をトランスフェクションし、CD271 のノックダウンを行う。ノックダウン細胞は、MTT アッセイによる増殖能の検証、マイクロアレイによる変動パスイの検証、ウェスタンブロッティングによる増殖シグナルの検出、細胞周期解析を行い、CD271 抑制による影響を検証する。

#### (3)-1-2 iCaspase9 を用いた CD271 発現細胞除去

肺扁平上皮癌細胞株 (MCC148c) の CD271 C 末端に、IRES-iCaspase9-T2A-tdTomato を CRISPR-Cas9 を用いて挿入し、CD271 の発現により iCaspase9 と tdTomato を発現する細胞を作成する。作成した細胞株に iCaspase9 の活性化剤である dimerizer を添加し、CD271 陽性細胞が選択的に排除されることによる増殖抑制効果について検討する。

### (3)-2 CD271 を標的とした肺扁平上皮癌治療は可能か?

#### (3)-2-1 誘導型 shRNA を用いた腫瘍縮小効果の確認

CD271 が肺扁平上皮癌に重要な分子であることが判明した場合、次に CD271 を標的とした腫瘍縮小試験を行い治療標的としての妥当性を検討する。樹立した肺扁平上皮癌細胞株 (MCC121, 138, 148) へ、tet-pLKO-shCD271 ベクター (3 配列を作成済) を導入し、NOG マウス皮下へ移植する。腫瘍径 1 cm 3 になった時点でマウスに doxycycline を飲水投与し、shRNA を誘導して、腫瘍縮小効果を検証する。

#### (3)-2-2 CD271 ノックアウトマウスによる肺扁平上皮癌発癌モデル

申請者は予備的検討として、A/J マウスに N'-nitroso-urea (NTCU) を投与して発癌させた肺扁平上皮癌腫瘍に CD271 が発現することを確かめている。CK14CreER マウス (CK14: サイトケラチン 14、上皮・扁平上皮癌腫瘍特異的に発現) と CD271 flox/flox マウスを掛け合わせるにより、タモキシフェン誘導によって上皮特異的に CD271 がノックアウトされるマウスを作成する (現在準備中)。ノックアウトマウスに NTCU を投与し、形成される腫瘍の数・大きさの

比較を行う。

(3)-3 CD271 下流のシグナルは何か？

(3)-3-1 肺扁平上皮癌における CD271 下流経路の探索

マイクロアレイの変動パスウェイ解析において、CD271 下流経路候補を探索し、関連分子の siRNA を用いてノックダウンを行い、MTT アッセイを用いて増殖への影響を検討する。

(3)-3-2 肺扁平上皮癌における CD271 機能ドメインの同定

CD271 の胞株 MCC148c に対して、野生型 CD271(WT)・細胞内領域欠損型 CD271( C)・細胞内ドメイン欠損型 CD271( DD, JX)・細胞膜ドメイン変異型 CD271(Fas-TM)・細胞外ドメイン欠損型( ECD)細胞発現ベクター(レトロウイルス)を用いて導入し、強制発現株を作成・増殖が抑制されるドメインを決定する。

#### 4 . 研究成果

・肺扁平上皮がんの細胞株に対して siCD271 を作用させたところ、細胞増殖能が低下することが判明した。iCaspase9 の導入を試みたが、導入効率が低いため機能しなかった。

・ドキシサイクリン誘導性の shRNA を細胞株に安定発現させ、ドキシサイクリンによって CD271 発現が低下することを確認した。しかし、低下の程度は軽微であり、細胞増殖能には影響しなかった。

・肺扁平上皮がん発がんマウスの系を確立した。タモキシフェンによって CD271 ノックアウトを試みたが、ノックアウト効率が低いため断念した。

・網羅的遺伝子発現解析を用いて CD271 下流シグナルの探索を行った。その結果、CD271 がなくなると分化方向に進むことが判明した。さらに、下流では MEK/ERK 経路・RAS 関連経路が動いていることが判明した。実際の肺がん手術検体でも、CD271 と pERK は共局在していた。既報に基づいた各種 CD271 変異体を作製したが、明らかな細胞増殖能に対する影響は確認できなかった。そのため、いまだ知られていない CD271 シグナルが存在することが予想された。

以上のことから、肺がんでは CD271 が細胞増殖に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Myoen Shingo, Mochizuki Mai, Shibuya Takahashi Rie, Fujimori Haruna, Shindo Norihisa, Yamaguchi Kazunori, Yasuda Jun, Abe Jiro, Imai Takayuki, Sato Ikuro, Adachi Hisanobu, Kawamura Sadafumi, Ito Akihiro, Tamai Keiichi | 4. 巻<br>29              |
| 2. 論文標題<br><sc>CD271</sc> promotes proliferation and migration in bladder cancer  | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Genes to Cells  | 6. 最初と最後の頁<br>73 ~ 85   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/gtc.13087   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Saito-Koyama Ryoko, Tamai Keiichi, Yasuda Jun, Okamura Yasunobu, Yamazaki Yuto, Inoue Chihiro, Miki Yasuhiro, Abe Jiro, Oishi Hisashi, Sato Ikuro, Sasano Hironobu  | 4. 巻<br>.               |
| 2. 論文標題<br>Morphometric analysis of nuclear shape irregularity as a novel predictor of programmed death-ligand 1 expression in lung squamous cell carcinoma   | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Virchows Archiv   | 6. 最初と最後の頁<br>.         |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s00428-023-03548-z  | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Asavasupreechar Teeranut, Saito-Koyama Ryoko, Miki Yasuhiro, Tamai Keiichi, Abe Jiro, Inoue Chihiro, Sato Ikuro, Boonyaratanakornkit Viroj, Sasano Hironobu   | 4. 巻<br>30              |
| 2. 論文標題<br>PRB inhibited cell proliferation through let-7b-E2F1 in breast cancer  | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Endocrine-Related Cancer  | 6. 最初と最後の頁<br>.         |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1530/ERC-22-0204   | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Miyabe Shingo, Ito Shin, Sato Ikuro, Abe Jiro, Tamai Keiichi, Mochizuki Mai, Fujimori Haruna, Yamaguchi Kazunori, Shindo Norihisa, Shima Hiroshi, Yamazaki Tomoko, Abue Makoto, Okada Yoshinori, Yasuda Jun               | 4. 巻<br>14              |
| 2. 論文標題<br>Clinical and genomic features of non small cell lung cancer occurring in families  | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Thoracic Cancer   | 6. 最初と最後の頁<br>940 ~ 952 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/1759-7714.14825   | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Morita Shinkichi, Mochizuki Mai, Shibuya-Takahashi Rie, Nakamura-Shima Mao, Yamazaki Tomoko, Imai Takayuki, Asada Yukinori, Matsuura Kazuto, Kawamura Sadafumi, Yamaguchi Kazunori, Yasuda Jun, Sugamura Kazuo, Katori Yukio, Satoh Kennichi, Tamai Keiichi | 4. 巻<br>39         |
| 2. 論文標題<br>Establishment of a Monoclonal Antibody That Recognizes Cysteine-Rich Domain 1 of Human CD271   | 5. 発行年<br>2020年    |
| 3. 雑誌名<br>Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy  | 6. 最初と最後の頁<br>6~11 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1089/mab.2019.0040   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)              | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)   | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 島 礼<br>(Shima Hiroshi)<br>(10196462)   | 地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター<br>(研究所)・がん薬物療法研究部・部長<br><br>(81303) |    |
| 研究分担者 | 望月 麻衣<br>(Mochizuki Mai)<br>(40726303) | 地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター<br>(研究所)・がん幹細胞研究部・研究員<br><br>(81303) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|