

機関番号：11101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390229

研究課題名 (和文) 肺がん幹細胞分離・解析と治療法開発

研究課題名 (英文) a study and new treatment of lung cancer stem cells

研究代表者

西條 康夫 (SAIJO YASUO)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10270828

研究成果の概要 (和文)：

CD133 を肺がん幹細胞のマーカーとして肺がん幹細胞の同定とその解析を試みた。全ての細胞株に CD133 陽性細胞を認めた。gefitinib 耐性株において CD133 の比率が上昇し、CD133 陽性細胞は抗がん剤に耐性であることが示唆された。一方、肺がん幹細胞の発生母地であると推定される細気管支肺胞接合部の肺幹細胞を同定・解析したところ、肺成長過程および気道修復過程では増幅していたが、肺胞上皮の修復過程では増幅が認められなかった。

研究成果の概要 (英文)：

We identified lung cancer stem cells using CD133 as a marker. A small fraction of all 19 cell lines examined expressed CD133. Resistant cells against gefitinib showed high % of CD133 positive cells. Lung stem cells at bronchioalveolar duct junction amplified after birth and naphthalene treatment, but no after bleomycin treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺がん、がん幹細胞、CD133

1. 研究開始当初の背景

1) 幹細胞とがん幹細胞：幹細胞とは、①自己複製能をもち、かつ②多分化能を持つ細胞の総称である。幹細胞には、胚由来である胚性幹細胞と成熟固体に存在する体

性幹細胞に大別され、体性幹細胞には骨髄だけでなく、肝、神経、心筋、そして肺にも存在することが次々と明らかとなりつつある。腫瘍は、様々な治療にも関わらず、再発や抵抗を示す。造血系腫瘍研究より、

白血病細胞の一部が造血系幹細胞の性質を持ち高腫瘍性であることが、また、固形腫瘍では glioblastoma が神経幹細胞と似た表面マーカーを示し、少数の細胞数で腫瘍形成能を示しがん幹細胞の存在が明らかとなった。同様に乳がんや大腸がんでも報告された。

2) 肺がん幹細胞研究：一方、肺腺癌の発生母地は、末梢気道や肺胞 II 型細胞であると推定されるが詳細は不明である。Kras の肺発癌モデルにおいて肺幹細胞の過形成が観察され肺がんの origin として幹細胞の関与が示唆され、EGFR 遺伝子変異を CCSP プロモーター下に発現させることにより肺腺癌の発症が確認されている。

2005 年肺幹細胞の分離とその詳細な解析が Tyler Jacks らのグループから報告された。彼らは、肺発癌モデルにおいて、SP-C と CCA (別名 CCSP) 共に陽性の細胞群が発癌の初期に過形成することを見出している。一方、肺癌のがん幹細胞の同定が、2007 年報告された。肺癌細胞株において幹細胞のマーカーの 1 つである side population を幹細胞様群として同定している。

3) がん幹細胞マーカー：がん幹細胞を同定・解析するにはがん幹細胞マーカーが必須である。1 つは、がん幹細胞にも、組織幹細胞に高発現している Hoechst33342 に染色されない細胞群として同定される方法である。もう 1 つは CD133 である。CD133 は、細胞膜状に発現しているがその機能は不明である。神経幹細胞のマーカーとして報告され、その後、glioblastoma、大腸がん、乳癌などでもがん幹細胞マーカーとして報告され、がん幹細胞に普遍的に発現している可能性が示唆される。

2. 研究の目的

がん幹細胞を同定・解析するにはがん幹細胞マーカーが必須である。1 つは、がん幹細胞に高発現している ABC トランスポーターにより Hoechst33342 に染色されない細胞群 (side population) として同定される方法である。もう 1 つは CD133 である。CD133 は、glioblastoma、大腸がん、乳癌などでもがん幹細胞マーカーとして報告され、がん幹細胞に普遍的に発現している可能性が示唆される。本研究では非小細胞肺癌に的をしぼり、細胞株 (19 株) 用いて肺癌幹細胞の分離・同定そして解析を試みることを目的とする。非小細胞肺癌細胞株においては、CD133 発現を FACS で評価し、CD133 陽性肺癌細胞を分離する。CD133 陽性肺癌細胞の造腫瘍性を NOD/SCID で確認するとともに、抗がん剤感受性について評価する。また、Hoechst33342 で細胞を染色し、side population を同定分離し、CD133 陽性細胞と比較検討する。

また、マウス肺における肺幹細胞を CCSP+SP-C+細胞群として免疫蛍光染色法を用いて同定し、マウス肺成長過程および肺傷害時の修復過程における幹細胞の動態を解析する。

3. 研究の方法

1) 肺がん細胞株における CD133 の発現：入手した肺がん 19 株についてフローサイトメーター (FACS) を用いて、CD133 の発現を検討した。また、サイトスピン法で細胞を固定後、ABC 法を用いて免疫組織染色法を用いて CD133 蛋白発現を確認した。陽性コントロールは HuH7 を用いた。また、CD133 mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。また、EGFR 遺伝変異の有無と CD133 の発現も検討

した。

2) 肺がん幹細胞の抗がん剤に対する感受性 : EGFR 遺伝子変異陽性細胞 2 株 (RERF-LC-A1, RERF-LC-Ad2) に gefitinib を 10, 30uM で接触させ、48 時間後の生細胞における CD133 陽性細胞を検討した。

3) 移植腫瘍組織における CD133 陽性細胞の検出: CD133 の頻度が高い PC-7, RERF-LC-A1, RERF-LC-Ad2 の 3 株 (1x10⁷/mouse) を SCID マウスに皮下移植した。腫瘍形成後に腫瘍を切り出し、免疫組織染色法を用いて CD133 陽性細胞を検出した。また、血管内皮細胞のマーカーである CD31 と 2 重染色を行い、血管との関連を検討した。

4) 肺がん幹細胞の発生源地である、肺上皮幹細胞の動態解析: 出生直後より 7 か月までの異なる週令のマウスの肺を取りだし、血液成分を除去後に、肺を固定した。CCSP および SP-C 抗体で 2 重染色を行い、共陽性の肺幹細胞を同定した。また、ナフタレンおよびブレオマシンの気道傷害および肺上皮傷害を起こし、その後修復過程における肺幹細胞の動態を免疫組織学的に検討した。

4. 研究成果

1) 肺がん細胞株に CD133 の発現

肺がん細胞 19 株の CD133 発現を FACS で解析した結果、すべての細胞株で発現が確認された。その割合は 0.2%~3.7% と大腸がん比べて低かった。頻度の高い 3 株 (PC-7, RERF-LC-A1, RERF-LC-Ad) の内 2 株は EGFR 遺伝子変異陽性であったが、その理由は不明であった。次にサイトスピンにより免疫組織染色を行ったところ、細胞膜に CD133 の発現が確認された。また RT-PCR で CD133 の発現を確認した (図 1)。

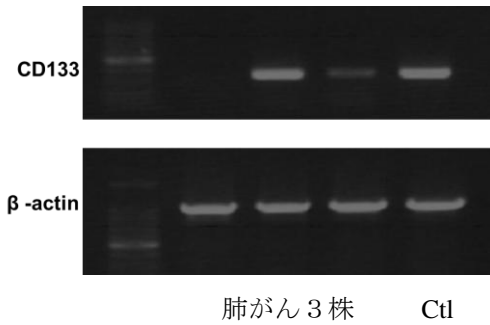


図 1 CD133 mRNA の発現

2) 肺がん幹細胞の抗がん剤に対する感受性 : EGFR 遺伝子変異を持ちかつ CD133 の割合が高い、肺がん 2 株に、gefitinib を接触させ、gefitinib に抵抗性の生肺がん細胞における CD133 の発現を検討した。その結果、%CD133 はコントロール 2.3%, 10uM 6.5%, 30uM 85.9% と高濃度の gefitinib に接触し生き残った肺がん細胞ほど、CD133 の発現割合が高いことが、明らかとなった (図 2)。この結果は 2 株ともに認められた。

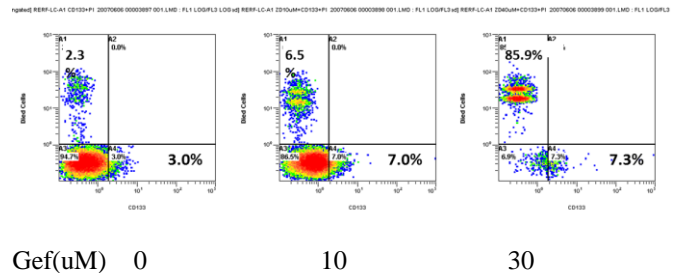


図 2 RERF-LC-A1 における Gefitinib 投与後の CD133 発現

3) 移植腫瘍組織における CD133 陽性細胞の検出

皮下腫瘍を CD133 抗体で染色したところ、一部の癌細胞に陽性細胞が認められ、集簇している傾向を認めた (図 3)。しかしながら、CD31 染色の結果より、CD133 陽性細胞と腫瘍血管の関係は明らかではなかった。

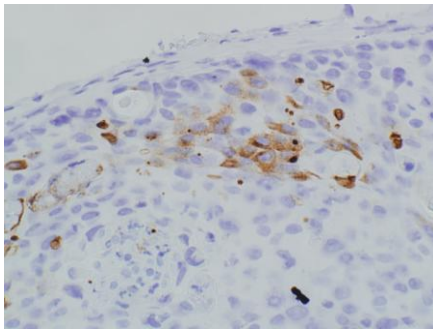


図3 腫瘍組織の CD133 陽性細胞 (茶色)

4) 肺がん幹細胞の発生母地である、肺上皮幹細胞の動態解析

正常マウス肺組織における CCSP+SP-C+細胞は、細気管支肺胞接合部に存在することを確認した。更に、肺成長過程における肺幹細胞を免疫蛍光染色法で確認したところ、出生直後より、幹細胞数が増加し4週齢でピークに達し、その後漸減した。次に、ナフタレンによる気道傷害モデルにおいては、気道修復に先立ち、幹細胞の増幅が確認され、気道修復に関与していることが示唆された (図4)

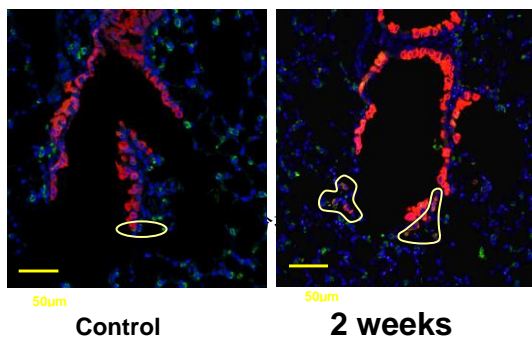


図4 増幅した幹細胞

一方、ブレオマイシンによる肺傷害モデルにおいては肺幹細胞の増幅は確認されず、肺上皮細胞修復への関与は少ないと推定された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Katsha AM, Ohkouchi S, Xin H, Kanehira M, Sun R, Nukiwa T, **Saijo Y**. Paracrine factors from Mesenchymal Stem Cells ameliorate lung injuries in elastase induced

emphysema. *Mol Ther* 19:196-203,2011

- ② Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita K, Fujita Y, Okinaga S, Hirano H, Yoshimori K, Harada T, Miyazawa H, Tanaka T, **Saijo Y**, Hagiwara K, Ogura T, Ando M, Morita S, and Nukiwa T, For the North-East Japan Study Group: Gefitinib or Chemotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. *New Engl J Med*, 362:2380-8, 2010
- ③ Sakakibara T, Inoue A, Sugawara S, Maemondo M, Ishida T, Usui K, Abe T, Kanbe M, Watanabe H, **Saijo Y**, Nukiwa T. Randomized phase II trial of weekly paclitaxel combined with carboplatin versus standard paclitaxel combined with carboplatin for elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 21:795-9, 2010
- ④ Xin H, Sun R, Kanehira M, Takahata T, **Itoh J**, Mizuguchi H, **Saijo Y**. Intratracheal delivery of CX3CL1-expressing mesenchymal stem cells to multiple lung tumors. *Mol Med*, 15:321-327, 2009
- ⑤ Inoue A, Kobayashi K, Usui K, Maemondo M, Okinaga S, Mikami I, Ando M, Yamazaki K, **Saijo Y**, Genma A, Miyazawa H, Tanaka T, Ikebuchi K, Nukiwa T, Morita S, and Hagiwara K. First-line gefitinib for advanced non-small cell lung cancer patients having epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy. *J Clin Oncol* 27: 1394-400,2009
- ⑥ Inoue A, Sugawara S, Yamazaki K,

Maemondo M, Suzuki T, Gomi K, Takanashi S, Inoue C, Inage M, Yokouchi H, Watanabe H, Tsukamoto T, Saijo Y, Ishimoto O, Hommura F, Nukiwa
Randomized Phase II Trial Comparing Amrubicin With Topotecan in Patients With Previously Treated Small-Cell Lung Cancer: North Japan Lung Cancer Study Group Trial 0402. *J Clin Oncol* 26:5401-6, 2008.

- ⑦ Inoue A, Xin H, Suzuki T, Kanehira M, Kuroki Y, Fukuhara T, Kikuchi T, Maemondo M, Nukiwa T, and Saijo Y. Suppression of Surfactant Protein-A by an Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Exacerbates Lung Inflammation. *Cancer Science*, 99:1679-84, 2008.
- ⑧ Sakakibara T, Saijo Y, Fukuhara T, Gomi K, Inoue K, Ishimoto O, Sugawara S, and Nukiwa T. Adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor gene mutations in three siblings. *J Thorac Oncol*, 2008;3:311-3.

[学会発表] (計5件)

- ① 鈴木一広、折口真人、兼平雅彦、孫若文、花田直之、高畑武功、伊東重豪、西條康夫 間葉系幹細胞は生体の腫瘍増殖を促進させる。日本癌学会学術総会 2008年10月29日 名古屋
- ② 孫若文、辛紅、高畑武功、伊東重豪、鬼島宏、貫和敏博、西條康夫 マウス肺の成長過程における肺幹細胞の動態解析 日本呼吸器学会学術講演会 2009年6月12日 東京
- ③ 花田直之、高畑武功、伊東重豪、孫若文、鈴木一宏、石黒敦、坂田優、福田真作、西條康夫 ヒト大腸癌細胞株におけ

る keap1 プロモーター領域のメチル化 日本癌学会学術総会 2009年10月1日 横浜

- ④ 高畑武功、伊東重豪、花田直之、孫若文、鈴木一宏、鬼島宏、伊東健、福田真作、西條康夫 日本人悪性リンパ腫患者における臨床病理学的因子に影響する遺伝子多型 日本癌学会学術総会 2009年10月2日 横浜
- ⑤ 孫若文、高畑武功、石黒敦、伊東重豪、貫和敏博 西條康夫 マウス成長肺と傷害修復過程における肺幹細胞の動態解析 第50回日本呼吸器学会学術講演会 2010年4月24日国立京都国際会館

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西條 康夫 (SAIJO YASUO)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10270828

(2) 研究分担者

伊東 重豪 (ITH JUGOH)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：10333717

(3) 連携研究者

()

研究者番号：