

機関番号：34519

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590935

研究課題名 (和文) 悪性胸膜中皮腫の細胞・分子生物学的解析と癌幹細胞の同定

研究課題名 (英文) Cytological and molecular analysis of malignant mesothelioma cells and identification of its cancer stem cells

研究代表者

藤盛 好啓 (FUJIMORI YOSHIHIRO)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20229058

研究成果の概要 (和文)：悪性胸膜中皮腫は、胸膜中皮細胞に由来する予後不良の悪性腫瘍である。我々は悪性胸膜中皮腫の細胞学的・分子生物学的解析を行い、中皮腫腫瘍幹細胞の同定を試みた。初めに我々は亜ヒ酸(As_2O_3)で誘導される中皮腫細胞株 (H2052) のアポトーシスの分子生物学的解析を行った。 As_2O_3 はH2052株にcaspase-3依存性にアポトーシスを誘導した。この過程においてJNKが活性化され、caspase依存性にアポトーシスを引き起こし、ERKはJNKとのcross talkを介してcaspase非依存性アポトーシスを起こすことが明らかとなった。一方、H28中皮腫細胞株はFynを欠損しており、亜ヒ酸ではアポトーシスを起こさず、Src阻害剤PP2処理により、caspase-8を介してアポトーシスを誘導することが判明した。さらに、中皮腫腫瘍幹細胞の同定において、我々は中皮腫細胞にCD318が発現されているのを見出し、その重要性を明らかとした。

研究成果の概要 (英文)：Malignant mesothelioma is an aggressive tumor of serosal surfaces which is refractory to current treatment options. We analyzed cytological and molecular characteristics of mesothelioma cells to identify the stem cells that initiate its tumorigenesis. We first analyzed the apoptosis of mesothelioma cells induced by arsenic trioxide (As_2O_3), which is used clinically to treat acute promyelocytic leukemia. We found that As_2O_3 inhibited cell viability of a mesothelioma cell line, NCI-H2052. As_2O_3 induced apoptosis of NCI-H2052 cells, which was accompanied by activation of JNK1/2, ERK1/2 and caspase-3. As_2O_3 induced apoptosis of NCI-H2052 cells mainly through JNK1/2 activation, and ERK1/2 was involved in As_2O_3 -induced apoptosis when JNK1/2 was inactivated. On the other hands, we found that PP2, a selective SFK inhibitor, induced apoptosis through a caspase-8 pathway in NCI-H28 cells which are resistant to As_2O_3 . Fyn-deficiency is prerequisite for caspase-8-dependent apoptosis induced by SFK inhibitors in mesothelioma cells. In our search for cancer stem cells, we found that mesothelioma cells expressed CD318, which play a role in mesothelioma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野： 医歯薬学
 科研費の分科・細目：内科系臨床医学
 キーワード：中皮腫、アポトーシス、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫は、胸腔を覆う中皮に由来する悪性腫瘍であり、早期診断はいまだ困難で、各種治療に抵抗性を示し、平均余命は 9-16 ヶ月と予後不良の疾患である。本疾患の発症にアスベスト暴露の関与が知られており、暴露から発症まで 20-40 年かかるとされ、多段階に遺伝子異常が蓄積されると推定される。悪性胸膜中皮腫では第 9 染色体の異常が知られており、p16 癌抑制遺伝子の欠失がみられる。これにより Rb 蛋白のリン酸化を阻害し、細胞周期制御機構の破綻を引き起こし、癌化につながると考えられている。また、中皮腫では、EGFR 遺伝子の発現が亢進しているが、EGFR 阻害剤であるゲファチニブ(イレッサ)は臨床的に無効であった。悪性胸膜中皮腫では c-Src が活性化されており、c-Src の阻害剤である dasatinib は in vitro で中皮腫細胞のアポトーシスを誘導することが報告された (Mol Cancer Ther 6, 1962, 2007)。悪性中皮腫ではさまざまな細胞学的、分子生物学的異常が起こっているが、疾患にとって critical な変化を総合的にとらえて診断・治療に応用する必要があると考える。

2. 研究の目的

本研究では悪性中皮腫の細胞学および分子生物学的解析を行うとともに、中皮腫腫瘍幹細胞の同定を目的とした。

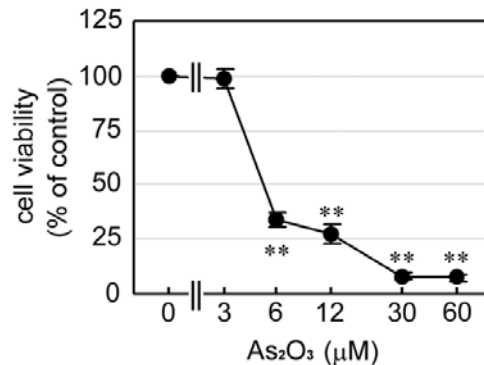
3. 研究の方法

悪性中皮腫で生存シグナルの活性化とアポトーシス関連シグナルにどのような変化が起こっているかを複数のシグナルをとらえて総合的に検討し、抗腫瘍に有用な標的を探索する。さらに抗原と c-Src との関連を検討し、癌幹細胞関連抗原との関連およびその機能を明らかにしていく。細胞株で得られた知見をもとに、ヒト悪性中皮腫の腫瘍細胞よりさらに抗原等を用いて濃縮し、腫瘍幹細胞を検索する。

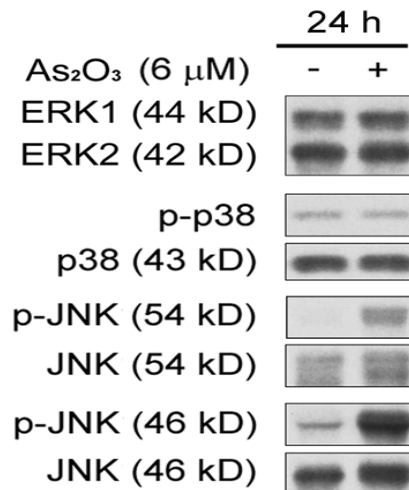
4. 研究成果

中皮腫細胞は一般に抗癌剤によるアポトーシス誘導に抵抗し、このことにより抗癌剤による治療に抵抗性を示す。我々は、亜ヒ酸 (As_2O_3) を用い、中皮腫細胞のアポトーシス誘導を検討した。

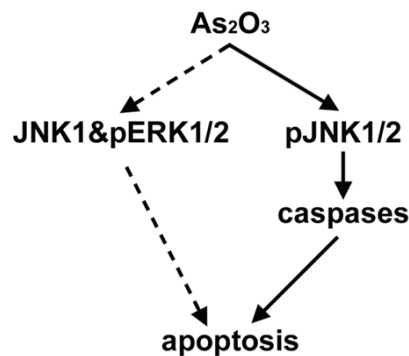
中皮腫細胞株 (H2052) は、亜ヒ酸により、濃度依存性に生存が低下した(右上図)。これ



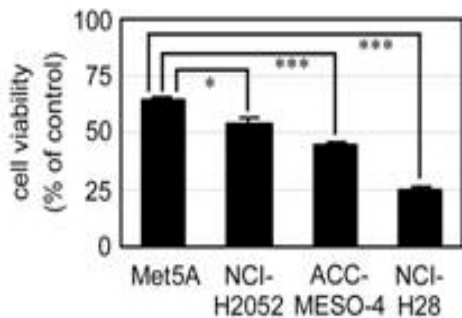
は、亜ヒ酸が caspase-3 依存性にアポトーシスを誘導したことによる。この過程において JNK が活性化され、さらに ERK の活性化が惹起



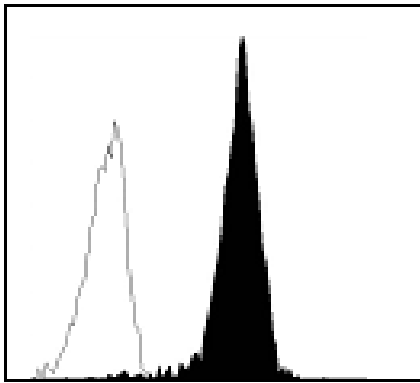
されることを明らかとした(下図)。JNK は caspase 依存性にアポトーシスを引き起こし、ERK は JNK との cross talk を介して caspase 非依存性アポトーシスを起こしていた(下図) (J Cell Physiol, 226, 726, 2011)。



一方、H28中皮腫細胞株はFynを欠損しており、亜ヒ酸でアポトーシスを起こさず、Src阻害剤PP2でアポトーシスを誘導された（下図）（Submitted to J Biol Chem）。



腫瘍細胞がアポトーシスを誘導する、あるいは抵抗する機序を明らかにし、効果的にアポトーシスを誘導して抗腫瘍効果を促進することが、中皮腫の治療戦略上重要である。



癌幹細胞の同定過程において、我々は中皮腫細胞にCD318が発現されているのを見出した（上図）。CD318は造血幹細胞、間葉系幹細胞に発現されていることが知られている。また、中皮腫細胞は、Oct-3やSSEA-4など、ES細胞マーカーを発現していた。中皮腫細胞は幹細胞に近い性格を有していることが明らかとなった。

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 2 件）

- 1) Eguchi R, Fujimori Y, Takeda H, Tabata C, Ohta T, Kuribayashi K, Fukuoka K, Nakano T. Arsenic trioxide induces apoptosis through JNK and ERK in human mesothelioma cells. *Journal of Cellular Physiology* 226, 762, 2011 (査読有り)
- 2) Takeda H, Fujimori Y, Kai S, Ogawa

H, Nakano T. CD318/CUB-domain-containing protein 1 expression on cord blood hematopoietic progenitors. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 1:497-501, 2010 (査読有り)

〔学会発表〕（計 9 件）

- 1) 江口良二, 藤盛好啓, 田端千春, 栗林康造, 福岡和也, 中野孝司. 悪性中皮腫において亜ヒ酸はJNKおよびERKを介したアポトーシスを誘導する. 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同大会 2010.12.29 神戸
- 2) 江口良二, 藤盛好啓, 久保秀司, 田端千春, 栗林康造, 福岡和也, 中野孝司. Fyn 低発現型の悪性中皮腫においてPP2 はアポトーシスを誘導する. 第69回日本癌学会学術総会 2010.9.23 大阪
- 3) 田端千春, 田端理英, 栗林康造, 福岡和也, 江口良二, 藤盛好啓, 中野孝司. 悪性胸膜中皮腫におけるangiopoietin (Ang)-1 の臨床的新規役割について. 第69回日本癌学会学術総会 2010.9.23 大阪
- 4) Yoshikawa Y, Nakano T, Sato A, Fukuoka K, Murakami A, Yamada S, Kuribayashi K, Tabata C, Fujimori Y, Morinaga T, Tsujimura T, Hashimoto-Tamaoki T. Frequent deletions in 3p21.1 region in malignant mesothelioma cell lines established from Japanese patients. The 10th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group 2010.9.1 Kyoto
- 5) Eguchi R, Fujimori Y, Tabata C, Kuribayashi K, Fukuoka K, Nakano T. Arsenic trioxide induces apoptosis through JNK and ERK in human mesothelioma cells. 10th International Conference of International Mesothelioma Interest Group (IMIG) 2010.8.31 Kyoto
- 6) Murakami A, Fujimori Y, Yoshikawa Y, Tamaoki T, Iida S, Tamura K, Kuribayashi K, Tabata C, Fukuoka K, Nakano T. Heme oxygenase-1 promoter polymorphism is associated with risk of malignant pleural mesothelioma. 14th Congress of the Asian Pacific Society

- of Respiriology 2009. 11. 14 Seoul
- 7) 江口良二, 藤盛好啓, 栗林康造, 福岡和也, 中野孝司. 悪性中皮腫株NCI-H2052において亜砒酸により誘導されるアポトーシスのキータンパク質はJNKである. 第68回日本癌学会 2009.10.1 横浜
- 8) Hirayama N, Eguchi R, Fujimori Y, Muramoto M, Okada A, Kuribayashi K, Fukuoka K, Tsubota N, Nakano T. Arsenic trioxide induces apoptosis of human malignant mesothelioma cells through induction of reactive oxygen species. 13th World Conference on Lung Cancer 2009. 7. 31 San Francisco
- 9) 江口良二, 藤盛好啓, 村元正和, 栗林康造, 福岡和也, 中野孝司. 亜砒酸はヒト悪性中皮腫細胞にアポトーシスを誘導する. 第67回日本癌学会学術総会, 2008. 10.28 名古屋.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤盛 好啓 (FUJIMORI YOSHIHIRO)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20229058

(2) 研究分担者

中野 孝司 (NAKANO TAKASHI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：10155781