

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590440
 研究課題名（和文）肺特異的遺伝子改変マウスを用いた肺上皮・肺癌幹細胞研究：スフェア形成法による解析
 研究課題名（英文）Study of lung epithelial and lung cancer stem cells of the lung-specific gene-targeted mice; analysis by lung epithelial sphere assay
 研究代表者
 伊藤 隆明 (ITO TAKAAKI)
 熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
 研究者番号：70168392

研究成果の概要（和文）：肺上皮スフェア形成は、優れた肺上皮幹細胞のバイオアッセイ系であり、scal 陽性細胞は肺上皮幹細胞を豊富に含む。しかしながら、スフェア形成は、scal 陰性の胎仔肺を用いても観察され、scal 陽性細胞の有無はスフェア形成に影響がなかった。また、ヒト肺腺癌の原因遺伝子である変異 EGFR マウス発現マウスでは、scal 陽性細胞数は野生型と変わらなかったが、スフェア形成能は軽度高かった。病理学的には、癌関連分子は様々な機能があることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Lung epithelial sphere (LES) formation assay seems a good experimental method monitoring lung epithelial stem cells, and scal-positive cells contain many lung epithelial stem cells. LESs were formed from mouse fetal epithelial cells, which lack scal-positive cells. The lung epithelial cells having human mutant EGFR gene have high proliferative activity. In these cells, occurrence of scal-positive cells does not increase, but LES formation was mildly increased. In addition, significance of stem-cell related molecules was studied using surgically resected samples and cell lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：遺伝子改変マウス、EGFR、Hes1、肺、幹細胞、Scal, epithelial sphere

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は、自己複製するとともに個々の組織を特徴づける多彩な細胞の生み出す源であり、これら細胞は、組織の恒常性維持、組織傷害後再生、組織構造改築、癌化などの過程に重要な働きをしていると考えられる。様々な組織において、組織特異な幹細胞の同定、採取、動態あるいは分化制御などについての

解析がなされてきている。これら幹細胞系では、その分化制御として様々なシグナル機構（Wnt, Notch, hedgehog など）、遺伝子発現制御機構（転写因子、DNAメチル化、polycomb group protein など）等に制御されていることが明らかになってきている。肺の上皮系は、消化管上皮や骨髄造血組織と異なり、非常に細胞のターンオーバーが遅く大部分の上皮

細胞は細胞周期から離脱しているが、最近の研究からは、肺の末梢気道の上皮幹細胞には、Clara cell protein (CCSP)+/surfactant apoprotein C (SPC)+double positive 細胞を含んでいて、またこれらは sca-1+/CD34+であることが示され(Kim et al, Cell 2005)、肺の上皮幹細胞の分子生物学的な研究が可能になってきた。私達は、新たな肺上皮幹細胞研究のツールとして肺上皮スフェア (lung epithelial sphere) 形成実験系を確立した。本研究では、各種肺特異的遺伝子改変 (mutant EGFR, Runx3, Hes1 など) マウスを用いて、肺上皮スフェア実験および発癌実験を行い、ヒト肺癌の原因遺伝子の一つである mutant EGFR マウスにおける肺上皮幹細胞動態、またそこに係わるシグナル伝達系の意義、肺癌発生における幹細胞の変化の意義、腫瘍幹細胞との関係などについて検討する。また、ヒト肺癌抑制遺伝子での一つである Runx3 の遺伝子欠損マウスや Notch シグナル経路の主たる標的遺伝子である Hes1 の遺伝子欠損マウスでの肺上皮幹細胞動態の変化や腫瘍発生との関わり合いについても明らかにする。また、こうした幹細胞関連分子の各種腫瘍における機能についての研究も意義あると思われる。

2. 研究の目的

以下のような背景を踏まえ、以下のような事項の解明のために一連の実験を計画した。

(1) マウス肺上皮幹細胞の上皮スフェア形成実験系(胎仔肺、成体肺)における、EGF、FGFs など増殖因子、Notch 阻害剤、Stat3 阻害剤などのシグナル伝達経路、スフェア形成能、増殖・分化への影響の解明。

(2) CCSPrTtA:tetO ヒト変異 EGFR マウスにおける変異 EGFR の誘導と肺上皮幹細胞関連 sca1 陽性細胞の動態の解明。また、同マウスにおける、細胞分化、各種シグナル伝達因子、および肝再オプ関連分子の変化について解析を行う。また、変異 EGFR の誘導とスフェア形成能との関連について明らかにする。

(3) Hes1 欠損マウス胎仔由来の肺上皮を用いて、上皮スフェア形成能や細胞分化能について、Hes1 の機能について解析する。

(4) CCSPrTtA:tetOCre:floxedHes1 マウス由来の肺上皮細胞を用いて、上皮スフェア形成能や細胞分化能について、Hes1 の機能について解析する。

(5) bromodeoxyuridine-label retaining cell (BrdU-LRC) を検討することで、マウス終末細気管支における上皮幹細胞 niche 部位の探索、2重免疫染色による BrdU-LRC の細胞種の同定を試みる。

(6) ヒト肺癌及び口腔癌の手術切片を用いた免疫染色、ヒト肺癌、口腔癌細胞株を用い

ての実験により、Notch や nucleostemin と呼んだ癌幹細胞関連分子の意義について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス成体 (10 週) および胎仔肺 (胎齢 12-18 日) の sca1 陽性細胞と肺上皮スフェア形成実験:

① マウス成体および胎仔肺からの肺上皮を採取し、CD45(-)CD31(-)sca-1(+)肺上皮細胞の FACS 解析を行った。

② 低接着性ディッシュを用いて、肺上皮スフェアを形成させ、更に dispase/collagenase 処理後細胞を単離し、2次スフェアの形成を見た。

③ 2次スフェア形成への EGF, FGF10, bFGF の効果を見た。

④ 2次スフェア形成への MAPkinase 阻害剤 (PD98059)、ALK 阻害剤 (LY294002)、stat3 阻害剤 (AG490)、Notch 阻害剤 (γ -secretase inhibitor X) の効果を見た。

⑤ 2次 LES の構成細胞の各種分化マーカー (CCSP, SPC, CGRP, foxJ1) による免疫染色による検討を行った。

(2) CCSPrTtA:tetO ヒト変異 EGFR (肺特異的変異 EGFR マウス) を用いた実験:

① doxycycline 飲水(2g/L)投与による肺病変とヒト変異 EGFR 蛋白質の免疫染色及び Western blotting による解析を行った。

② doxycycline 飲水(2g/L)投与による Notch シグナル関連分子、細胞分化マーカー発現変化の PCR および Western blotting による解析を行った。

③ doxycycline 飲水(2g/L)投与による CD45(-)CD31(-)sca-1(+)肺上皮細胞を FACS の解析を行った。また、sca1 の Western blotting も行った。

④ 胎齢 16 日胎仔肺を 6 週間器官培養し、doxycycline 投与による腫瘍形成実験を行った。

⑤ 低接着性ディッシュを用いて、肺上皮スフェアを形成させ、更に dispase/collagenase 処理後細胞を単離し、doxycycline 添加時の 2 次スフェアの形成を見た。

(3) Hes1 遺伝子欠損マウス胎仔肺 (胎齢 16 日) を用いての実験:

① 各遺伝型マウスから肺上皮を採取し、低接着性ディッシュを用いて、肺上皮スフェアを形成させ、更に dispase/collagenase 処理後細胞を単離し、2次スフェアの形成を見た。また、免疫染色によりスフェア構成細胞について検討した。

(4) CCSPrTtA:tetOCre:floxedHes1 マウス (10 週齢) を用いた実験:

① doxycycline 飲水(2g/L)投与による CD45(-)CD31(-)sca-1(+)肺上皮細胞を FACS の解析

を行った。また、scal の Western blotting も行った。

- ②低接着性ディッシュを用いて、肺上皮スフェアを形成させ、更に dispase/collagenase 処理後細胞を単離し、doxycycline 添加時の 2 次スフェアの形成を見た。

(5) bromodeoxyuridine (BrdU)-label retaining cell(LRC) についての実験：

- ①osmotic pump を用いて、マウス皮下に BrdU を持続投与(1, 2, 4 週)し、終末細気管支の BrdU 陽性細胞の頻度及び陽性細胞の種類について免疫染色により検討した。

- ②osmotic pump で BrdU を 2 週間持続投与した後に、osmotic pump を外し、2 ヶ月、6 ヶ月、18 ヶ月後に存在する BrdU 陽性細胞 (BrdU-LRC) の頻度及び存在部位、陽性細胞の種類について検討した。

(6) ヒト肺癌および口腔癌における各種幹細胞関連分子の病理学的研究：

- ①ヒト肺癌、口腔癌における幹細胞関連分子 nucleostemin, Notch1 の発現について、ホルマリン固定パラフィン包埋切片の免疫染色により検討した。

- ②ヒト肺癌、口腔癌における幹細胞関連分子 nucleostemin, Notch1 の発現について、培養細胞株を用いて、免疫染色及び Western blotting により検討した。

- ③nucleostemin siRNA および Notch1 siRNA のヒト癌細胞の機能に及ぼす影響について検討した。

4. 研究成果

(1) マウス成体(10 週) および胎仔肺(胎齢 12-18 日) の scal 陽性細胞と肺上皮スフェア形成実験：

- ①マウス成体および胎仔肺からの CD45(-)CD31(-)scal(+)肺上皮細胞の FACS 解析により、成体マウス肺では平均 12.2%、胎仔肺では、胎齢 12 日で 0%、14 日で 0.1%、16 日で 0.3%、18 日で 1.5%と、肺が成熟するにつれて scal 陽性肺上皮細胞は増加することが解った。このことは、胎仔期と成体の肺上皮系は異なる。
- ②肺上皮スフェアは、成体肺でも胎仔肺でも形成されたが、2 次スフェア形成能は胎仔肺の方が高かった。
- ③2 次スフェア形成能への増殖因子の効果は、EGF(50ng/ml)で対照群の 3.5 倍、FGF2(50ng/ml)で 10.2 倍、FGF10(50ng/ml)で 1.5 倍と亢進した。
- ④2 次スフェア形成への MAPkinase 阻害剤(PD98059)、ALK 阻害剤(LY294002)、stat3 阻害剤(AG490)、Notch 阻害剤(γ -secretase inhibitor X)は、いずれも抑制効果が強く現れたが、阻害剤の濃度と阻害の間液を十分検討することが出来なかった。

- ⑤成体マウスの 2 次スフェアの構成細胞の各種分化マーカー (CCSP, SPC, CGRP, FoxJ1)による免疫染色では、SPC, CCSP が 5-7%を占める結果で、CGRP, FoxJ1 陽性細胞はほとんど見られ無かった。Scal 陽性細胞は 1 次スフェアでは 15.5%が、2 次スフェアでは 26%と増加した。

(2) CCSPrTA:tetO ヒト変異 EGFR (肺特異的変異 EGFR マウス) を用いた実験：

- ①doxycycline 刺激により肺にはヒト変異型 EGFR が誘導されることが、Western blotting で明らかになり、免疫染色では細気管支及び肺胞上皮に変異 EGFR 免疫染色陽性像が認められた。

- ②Realtime PCR および Western blotting 法で、CCSP, FoxJ1, CGRP などの気道上皮系の分化マーカーの減少、SPC(肺胞上皮マーカー)の増加が認められた。一方、Notch receptor1-3 はいずれも発現の減少が認められた。

- ③doxycycline 刺激マウスでは、scal 陽性肺上皮細胞は対照マウスと同様な頻度(13.3%)で、EGFR の恒常的な活性化があった。

- ④胎齢 16 日胎仔肺を 6 週間器官培養し、doxycycline により変異 EGFR 誘導下では、腺腫が形成される事が確認された。

- ⑤肺上皮スフェアを形成能については、変異型 EGFR の誘導により 2.2 倍の増加を認めた。

(3) Hes1 遺伝子欠損マウス胎仔肺(胎齢 16 日) を用いての実験：

- ①各遺伝型(野生型、ヘテロ、ホモ欠損)マウス胎仔から肺上皮を採取し、スフェア形成能を観察したが、ホモ欠損マウス肺ではスフェア形成能が低く、また、CGRP 陽性神経内分泌細胞が 5%と高値を示した。

(4) CCSPrTA:tetoCre:floxedHes1 マウス(10 週齢) を用いた実験：

- ①doxycycline 刺激により Hes1 の発現の低下は Western blotting により軽度に見られたが(本実験では Hes1 の蛋白発現を完全に抑制できなかった)、scal 陽性肺上皮細胞を頻度は対照群と差が見られ無かった。

- ②肺上皮スフェアを形成 doxycycline 添加下に検討したが、非添加群と差が見られ無かった。

(5) bromodeoxyuridine (BrdU)-label retaining cell(LRC) についての実験：

- ①BrdU 持続投与(1,2,4 週)時の終末細気管支の BrdU 陽性細胞の頻度は、平均 5.8%、9.5%、22.2%で、BrdU 陽性細胞のうち CCSP 陽性細胞は、それぞれ 92.5%、91.4%、88.1%でした。

- ②2 ヶ月後および 18 ヶ月後の終末細気管支における BrdU 陽性細胞 (BrdU-LRC) の頻度は、それぞれ 7.2%、5.2%で、

BrdU-LRC のうち CCSP 陽性細胞は、それぞれ 91.4%, 87.9% でした。また、その分布は細気管支肺胞境界部には多いとは言えなかった。

(6) ヒト肺癌および口腔癌における各種幹細胞関連分子の病理学的研究:

- ① nucleostemin のヒト肺癌、口腔癌手術症例での発現は、それぞれ腫瘍になるとともに発現が亢進し、増殖マーカーの Ki-67 の発現と関連して存在し、増殖と関連したマーカーであり、分化との関連性に乏しいことがわかった。Notch1 は、口腔癌では腫瘍化とともに発現し、浸潤先端部により発現が強かった。肺癌では、小細胞癌は陰性で、扁平上皮癌は一部の症例で陽性、腺癌は基本的に全ての症例で陽性だった。
- ② ヒト肺癌、口腔癌培養株における幹細胞関連分子 nucleostemin の発現はいずれの細胞株でも発現が見られたが、Notch1 については、口腔癌では一部陰性の細胞株が、肺癌では小細胞癌は一部の株でのみ陽性だった。
- ③ nucleostemin siRNA はヒト口腔癌の培養株の増殖能を低下させ、Notch1 siRNA は増殖能と運動能を低下させた。一方、肺癌培養株では、Notch1 siRNA は小細胞癌と非小細胞癌では、異なる機能変化を示した。

以上のように本科学研究費を活用し、マウスの肺上皮幹細胞に関連した、scal 陽性細胞の動態、肺上皮スフェア形成、BrdU-LRC の分布や頻度などについて解析するとともに、発癌因子である変異 EGFR や肺上皮分化への強力な調節因子である Hes1 の幹細胞への関与についても検討することが出来た。更に、ヒト癌における幹細胞関連分子の機能にも言及することが出来た。本研究では断片的な成果しかあげることが出来なかったが、今後のこの研究分野の発展の為の有意義な基礎的な成果を上げることが出来た。

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 3 件)

- ① Yoshida R, Fujimoto T, Kudoh S, Nagata M, Nakayama H, Shinohara M, Ito T: Nucleostemin affects the proliferation but not differentiation of oral squamous cell carcinoma cells. Cancer Sci., 102(7)1418-1423, 2011、査読有
- ② 伊藤隆明、工藤信次、宇高直子、藤本哲広: 肺上皮幹細胞と肺癌幹細胞。病理と臨床 28(3):315-320, 2010、査読無
- ③ Iwatani K, Fujimoto T, Ito T: Cyclin D1

blocks the anti-proliferative function of RUNX3 by interfering with RUNX3-p300 interaction. Biochem Biophys Res Commun 400(3):426-431, 2010、査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① Ryoji Yoshida, Masashi Nagata, Kenta Kawahara, Yoshihiro Nakagawa, Takuya Tanaka, Hideki Nakayama, Masanori Shinohara, Takaaki Ito. Investigation into Notch-1 expression in oral squamous cell carcinoma. 第 70 回 日本癌学会総会 2011.10.4 名古屋国際会議場
- ② 亀山広喜、伊藤隆明: マウス細気管支 bromodeoxyuridine (BrdU)-labeled retaining cell の免疫組織化学的研究。第 52 回日本組織細胞化学会 2011.9.25、金沢大学宝町キャンパス
- ③ 工新森加納子、工藤信次、橋本修一、宇高直子、伊藤隆明: 翻訳後修飾プロテオミクス解析による肺小細胞癌の分化・増殖機構の分子基盤解明。第 100 回日本病理学会総会 2011.4.30、パシフィコ横浜
- ④ 吉田遼司、新森加納子、伊藤隆明、他: 口腔扁平上皮癌における Notch1 発現の検討。第 100 回日本病理学会総会、2011.4.29、パシフィコ横浜
- ⑤ 工藤信次、宇高直子、伊藤隆明、他: hASH1 遺伝子導入ヒト肺腺癌細胞について。第 100 回日本病理学会総会 2011.4.28、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 隆明 (ITO TAKAAKI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 70168392

(2) 研究分担者

藤本 哲広 (FUJIMOTO TETUHIRO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号: 70359818
(H21-22: 分担研究者)

宇高 直子 (UDAKA NAOKO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号: 90285106
(H21-22: 分担研究者)

(3) 連携研究者: 該当者なし

()

研究者番号: