

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16515

研究課題名（和文）非小細胞肺癌における新規癌幹細胞マーカーとしてのLY6Dの検討

研究課題名（英文）Investigation of the functions and the roles of LY6D as a novel cancer stem-cell marker of non-small cell lung cancer

研究代表者

千場 隆 (Semba, Takashi)

熊本大学・国際先端医学研究機構・客員講師

研究者番号：30897682

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：原発性肺癌手術検体においてLY6Dの発現を免疫組織学的に評価し、術後再発予後との相関を解析した結果、LY6Dが強く発現している症例は有意に術後無再発生存期間が短縮していることを発見した。RNA-seqデータベースの解析から、LY6Dを高発現している症例は低発現症例に比べ好中球関連シグナルの活性化および好中球浸潤が増加していることが示唆され、LY6Dが腫瘍微小環境の免疫細胞プロファイルにも影響を与えている可能性を見出した。さらに、LY6Dの生体における機能や役割を詳細に研究するために、Ly6d遺伝子をコンディショナルにノックアウトできる遺伝子改変マウスを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LY6Dの発現と術後再発予後との相関を見出した。また、そのメカニズムとして、癌幹細胞の制御以外に、腫瘍の転移や再発に重要な役割を担っていることが近年明らかとなっている腫瘍関連好中球Tumor-associated neutrophil (TAN)の浸潤や活性化にLY6Dが関わっている可能性が示唆された。さらに、LY6Dのコンディショナルノックアウトマウスの作製はこれまでに報告がなく、この遺伝子改変マウスの開発により生体でのLY6Dの詳細な機能評価が可能となった。

研究成果の概要（英文）：The expression of LY6D in resected non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues from patients was evaluated by immunohistochemistry with clinical outcome information. We found that LY6D-high patients showed shorter relapse-free survival than LY6D-low patients. Transcriptomic and tumor microenvironment analysis using publicly available RNA-seq database revealed upregulated neutrophil-associated signals and increased neutrophil infiltration into tumor in LY6D-high patients with NSCLC. Furthermore, we developed a novel Ly6d conditional knockout mouse that enable to investigate the functions and roles of Ly6d in vivo.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：肺癌 癌幹細胞 LY6D 遺伝子改変マウス

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は本邦における死亡者数第1位の癌であり、その85%が非小細胞肺癌である。非進行非小細胞肺癌に対しては外科的切除が標準治療となるが、肺癌は再発しやすいことが知られており、その背景にあるメカニズムを理解することは、術後再発を防ぐための新規治療法開発に必要不可欠である。術後再発の原因として癌幹細胞の存在は以前から指摘されている。しかし、特定されている限られた種類の癌幹細胞マーカーだけでは、複雑な癌幹細胞の性質を明らかにすることは困難であり、このことが癌幹細胞に関する研究および癌幹細胞を標的とする治療法の開発の遅れにつながっている。また、腫瘍微小環境が癌の再発や転移に関わることは知られているが、その詳細なメカニズムの大部分は未解明である。

Ly6 ファミリー分子は生体内では主に血球系の細胞表面に発現している GPI アンカー型膜タンパクである。これまで、Ly6 ファミリー分子の癌における意義はほとんど不明であったが、近年の研究から Ly6 ファミリー分子は癌の進行に関与することが明らかとなってきている。LY6D は Ly6 ファミリー分子の一つであり、近年肺癌を含む様々な癌腫において高発現することが報告されている。我々はマウス肺オルガノイド培養系、およびそれを利用した肺癌幹細胞の樹立を通じて、オルガノイド培養中の肺細胞においてマウス幹細胞マーカーである SCA-1 の発現が上昇することを見出していた。SCA-1 は Ly6 ファミリー遺伝子である Ly6a によってコードされているが、ヒトではオルソログが発見されていない。我々は、Ly6a 遺伝子が存在するマウス 15 番染色体 (15D3) とシンテニクな関係にあるヒト 8 番染色体 (8q24) 上に、多数の Ly6 ファミリー遺伝子が存在することに着目し、オルガノイド培養中の肺細胞におけるヒトとマウスの両方に認められる Ly6 ファミリー遺伝子の発現を調べ、その結果、Ly6d 遺伝子と Ly6a の発現パターンが近似していることを発見した。このことから、LY6D が SCA-1 と共通の幹細胞マーカーとしての機能をもつのではないかと着想し本研究を立案した。また、LY6D が正常では主に血球に発現する分子であることから、腫瘍微小環境における免疫細胞と腫瘍細胞とのなんらかの相互作用に関与している可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は非小細胞肺癌における LY6D 発現の意義と機能を解明することを目的としている。これまでの報告と予備データから、特に LY6D の非小細胞肺癌における癌幹細胞マーカーとしての可能性を検証する。また、非小細胞肺癌における LY6D 発現が腫瘍の微小環境、特に免疫細胞の浸潤に与える影響についても検討し、その臨床的意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

1) LY6D の肺癌における役割を検証するために、肺癌の手術検体の FFPE 組織スライドと抗 LY6D 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、腫瘍細胞における LY6D の発現を評価し、その発現量と臨床的予後の比較を行った。熊本大学呼吸器外科で管理している 61 例の原発性肺癌手術検体を対象に、LY6D の発現によって症例を LY6D-high と LY6D-low にわけ、術後無再発生存期間を比較した。

2) TCGA の肺腺癌 (LUAD) と肺扁平上皮癌 (LUSQ) データベースから LY6D 遺伝子の発現が高い患者 (LY6D-high) と低い患者 (LY6D-low) を抽出し、LY6D-high 群で高発現している遺伝子群を GO エンリッチメント解析を行った。

3) 上記 2) にて抽出した症例の遺伝子発現データを用いて、腫瘍内における各種免疫細胞の浸潤割合のシミュレーションを行った。解析には CIBERSORT アルゴリズム (Newman et al., Nat Methods 2015) を用いた。

4) LY6D の生体における機能や役割を詳細に研究するために、LY6D を発現している細胞が EGFP によって標識され、任意のタイミングで LY6D をノックアウトすることができる遺伝子改変マウス Ly6d-EGFP を CRISPR-Cas9 技術を用いて作製した。マウスの作製は東京女子医科大学実験動物研究所の本田浩章教授との共同研究のもと行った。マウス Ly6d 遺伝子の Exon 2 上流および Exon 3 下流に gRNA を設計し、鋳型となる ssODN (3' arm-FLT-Ly6d-IRES-EGFP-FLT-5' arm) とリコンビナント Cas9 タンパクとともにマイクロインジェクションを行った。産仔の尾から DNA を抽出・精製してジェノタイピングと挿入遺伝子領域のシーケンスを行い、設計どおりのマウスが得られるまでマイクロインジェクションを繰り返した。

#### 4. 研究成果

1) 手術検体の FFPE 組織スライドと抗 LY6D 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、腫瘍細胞における LY6D の発現と患者予後を解析した。その結果、腫瘍で LY6D が強く発現している 17 例 (LY6D-high) は、LY6D 発現が弱い 43 例 (LY6D-low) と比較して有意に術後無再発生存期間が短縮していることを発見した (図 1)。

2) TCGA データベースの LUAD と LUSQ コホートにおいて患者を LY6D-high と LY6D-low に分類し、LY6D-high 群で有意に高発現している遺伝子群を抽出した。その後、抽出した遺伝子リストを用いて GO エンリッチメント解析を行った結果、LY6D-high 群で高発現していた遺伝子は好中球の活性化に関わるシグナルに関連する遺伝子であることがわかった。

3) CIBERSORT アルゴリズムを用いて発現遺伝子から腫瘍内の浸潤免疫細胞の割合を予測した結果、2) と同様に LY6D-high の腫瘍には好中球が有意に浸潤していることが示唆された (図 3)。

4) 図 4 のように ssODN を設計し、gRNA とリコンビナント Cas9 タンパクとともにマイクロインジェクションを行った。その結果、目的の遺伝子型をもったマウス産仔を得た。

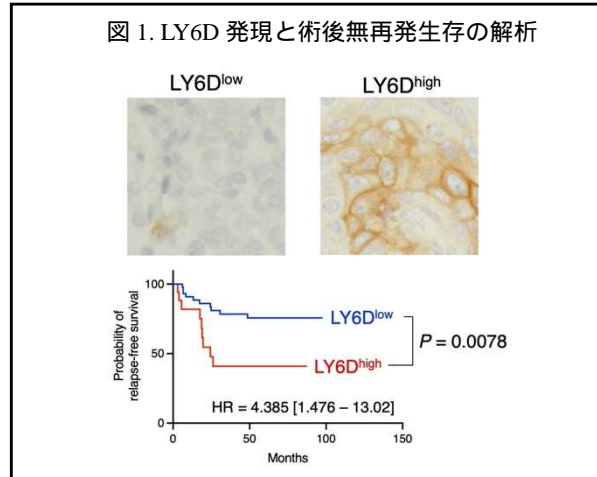


図 2. LY6D<sup>high</sup> 患者群で高発現している遺伝子群の GO 解析

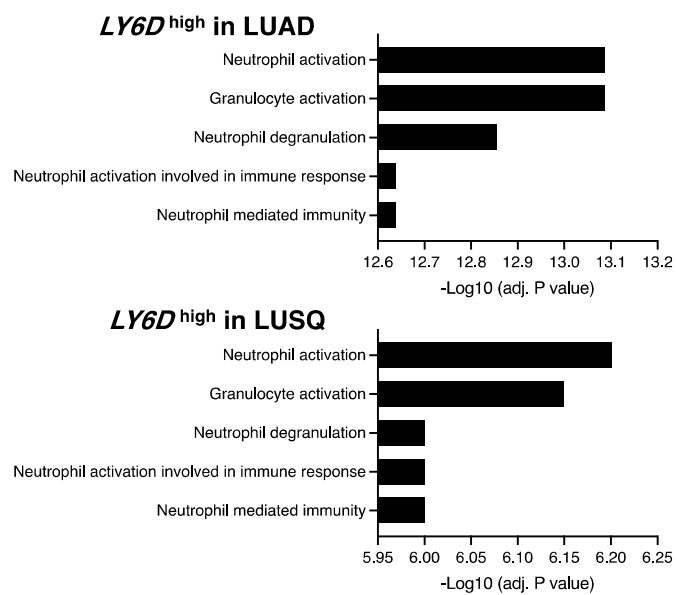


図 3. LY6D 発現による好中球浸潤度比較

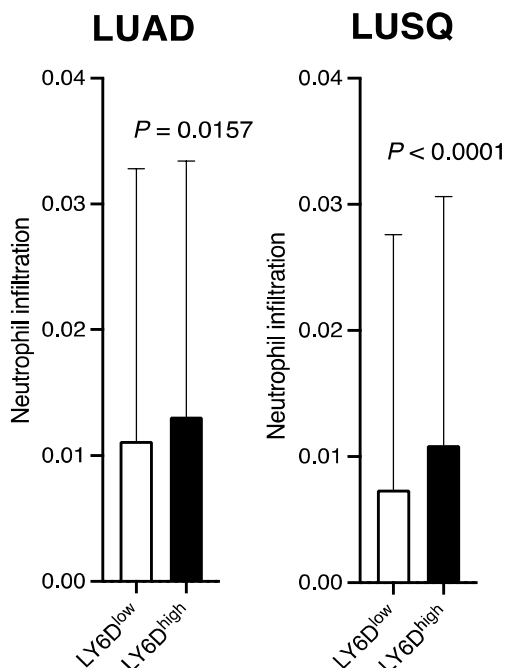
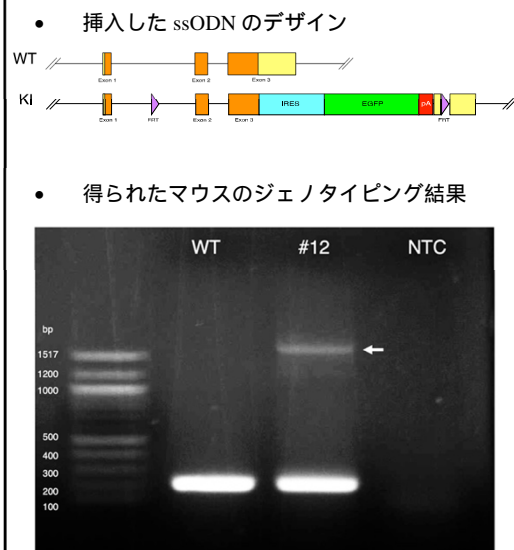


図 4. 遺伝子改変マウス Ly6d-EGFP の作製



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Semba, T., Wang, X., Xie, X., Cohen, E. N., Reuben, J. M., Dalby, K. N., Long, J. P., Phi, L. T. H., Tripathy, D., Ueno, N. T.	4. 巻 114
2. 論文標題 Identification of the JNK-Active Triple-Negative Breast Cancer Cluster Associated With an Immunosuppressive Tumor Microenvironment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JNCI: Journal of the National Cancer Institute	6. 最初と最後の頁 97~108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jnci/djab128	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 Semba Takashi, Wang Xiaoping, Xie Xuemei, Cohen Evan N, Reuben James M, Dalby Kevin N, Long James P, Phi Lan Thi Hanh, Tripathy Debu, Ueno Naoto T	4. 巻 114
2. 論文標題 Identification of the JNK-Active Triple-Negative Breast Cancer Cluster Associated With an Immunosuppressive Tumor Microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JNCI: Journal of the National Cancer Institute	6. 最初と最後の頁 97~108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jnci/djab128	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔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 （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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------