

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23659664

研究課題名（和文）

臨床検体由来肺癌幹細胞樹立とバイオマーカータンパク質同定

研究課題名（英文）

Identification of Lung Cancer Stem Cell Markers

研究代表者

鈴木 元 (SUZUKI MOTOSHI)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：80236017

研究成果の概要（和文）：

我々は肺癌臨床検体を用い、種々の既知幹細胞マーカーの免疫染色を行った。染色結果より、肺癌幹細胞マーカー候補として適切であると考えられた CD166 陽性細胞、陰性細胞の各種遺伝子発現レベルを公開データベース解析、肺癌手術検体による発現レベル解析、shRNA 導入によるノックアウト実験等を行った。その結果、一つの遺伝子が新規肺癌幹細胞マーカーおよび将来的分子標的候補となり得る可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

By using clinical specimens, we performed IHC analysis for the putative cancer-initiating cell markers. Among the markers, we found CD166 may be the most useful one. To identify novel lung cancer-initiating cell markers, we analyzed an open database, screened genes that were highly expressed in CD166-positive cells, measured expression levels of such genes in the clinical specimens, and performed shRNA-induced knocking-down experiments. We identified that a gene could be a novel lung cancer-initiating cell marker, as well as a future target for the cancer treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：呼吸器外科学

科研費の分科・細目：胸部外科学

キーワード：癌幹細胞、マーカー、肺癌

## 1. 研究開始当初の背景

近年認識されてきた癌幹細胞仮説は、癌組織中で大多数を占める非癌幹細胞、あるいは、培養細胞を用いた研究に基づくこれまでの知識を根底から見直す必要性を提起している。乳癌等一部の癌でその存在と重要性は揺るぎないものの、肺癌等では存在そのものに懐疑的な意見も根強い。また、学会レベルでは様々な報告もあるものの、ほとんどが細胞株レベルのものであり、臨床検体の情報に乏

しい。癌幹細胞マーカーとしては神経芽腫等で報告されている CD133 が報告されていたが、論文等単発的であり、検証が必要であった。また、本研究遂行中に CD166 がマーカーとして報告された。

## 2. 研究の目的

本申請では肺癌を研究対象とし、肺癌幹細胞株の樹立と肺癌幹細胞マーカーの同定を目的とした。

### 3. 研究の方法

臨床検体は倫理審査後、名古屋大学胸部外科の肺がん手術症例を用いた。臨床検体および培養細胞を用いた各種マーカー候補 (CD34, CD44, CD117, CD133, EpCAM, CD166) の発現検索は、市販の特異的抗体を用いて、免疫染色法を行った。培養細胞を用いた定量には蛍光色素による発色を利用したフローサイトメーター法を用いた。公開データベースは Zhang らが 2012 年に Cell 誌に発表したもの、および、Takeuchi らが 2006 年に JCO 誌に発表したものを用いた。各種遺伝子発現定量には定量 PCR 法を用いた。マウス肺転移巣形成効率の測定には、肺高転移性株 LNM35 細胞を用い、特異的 shRNA 発現レトロウイルスベクター感染により遺伝子ノックダウンを行った。なお、実験に際しては組み換え DNA および実験動物に関する各委員会の許可を得ている。ノックダウン効率は定量 PCR 法及び特異的抗体を用いたウエスタンブロット法により確認を行った。細胞をヌードマウス尾静脈より一定数接種し、5 週間後に安楽死させ、肺における転移巣につき肉眼的、および、顕微鏡的観察を行った。検定にはフィッシャーの t 検定法を用いた。

### 4. 研究成果

肺癌幹細胞マーカーとして報告のある CD133 は臨床病理検体の免疫染色解析結果多くの肺癌で発現が観察されなかった。また、培養細胞においても同様であったため、マーカーとしての有用性が低いと考えられた。そのほかのマーカー候補もはっきりとした結果が得られなかった、一方、研究期間中に新規に発表のあった CD166 はほとんどの肺癌に程度の差こそあれ発現が観察され癌幹細胞マーカーとして適切であると考えられた (図 1)。

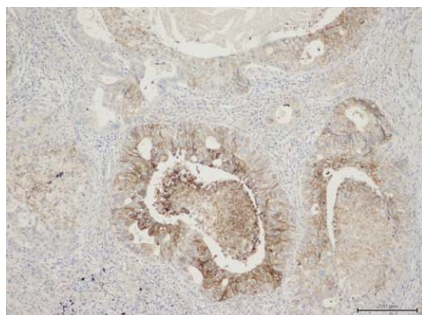


図 1：肺癌臨床検体中で、CD166 はモザイクパターンを示すなど、ほとんどの肺癌組織中にて陽性細胞が検出された (上図)。一方、CD133 はほとんどの癌組織中で観察されず、また、観察される場合も高分化型組織型部位であったため、癌幹細胞マーカーとして適切でないと考えられた (データは示していない)。

い)。

また、CD166 発現は臨床検体のみならず、培養細胞においても調べた限りすべて陽性であった (図 2)。

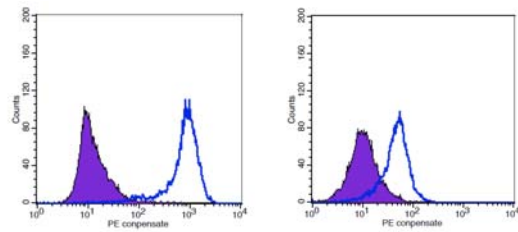


図 2：培養細胞の CD166 発現。縦軸が細胞数、横軸が CD166 発現量。H441 (左) A549 (右) ともに、コントロール群 (各パネル左側細胞群) と比較し CD166 発現が確認された (各パネル右側白抜き細胞群)。

以上の結果より、幹細胞マーカーとしてより信頼できると考えられた CD166 につき、公開データベース解析を行った。CD166 と発現相関関係が観察された遺伝子につき、名古屋大学における臨床検体において定量 PCR 法により検証を行った。種々の遺伝子を検討した結果、一つの遺伝子について公開データベース、名古屋大学臨床検体共に CD166 と発現の正相関が観察された (図 3)。

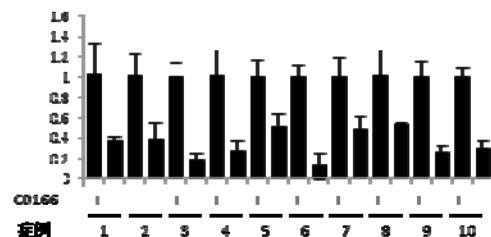


図 3：肺癌サンプル CD166 陽性、陰性細胞における遺伝子発現レベル

この遺伝子の機能につき種々実験を行ったところ、転移性に関係がある遺伝子であるという示唆を得た。例えば、この遺伝子を shRNA でノックダウンし、マウスに接種すると、肺転移巣の形成が抑制されることが明らかとなっている (図 4)。

	肺転移巣	
	(+)	(-)
コントロール群	6	0
遺伝子ノックダウン群	0	6

$p=0.002$

図 4：肺転移巣形成における分子標的候補遺伝子ノックダウンの影響

日本では 1981 年から悪性腫瘍が死因の第一位を占めており、2010 年度は約 3 人に 1 人が悪性腫瘍で亡くなっている。これに対して、治癒を目指した分子標的薬の開発が精力的に行われ、白血病に代表される一部腫瘍で大きな成功を取っている。一方、固形腫瘍の多くは、原発部に限定された腫瘍に限って外科的療法により完治が期待できる。

一般に、早期がんであれば手術後の転移発生率も低く、治癒率が高いため、これまでのがん対策は、個別の治療法の確立とともに、早期発見に一つの重点が置かれてきた。しかしながら、手術を行われながらも術後転移によってなくなれる患者も多い。例えば、胸部 X 線で発見される肺癌はすでに直径が 2 cm 程度あり、この時点で約 25% の患者にリンパ節転移が認められる。これに対して、肺の切除とリンパ節の郭清が行われているのであるが、II、III 期の肺がんで 5 年生存率は 45-57% にとどまる。さらに、乳がんにおいては手術後 10 年を越してから転移が発生することも珍しくない。

本研究では、肺癌幹細胞集団に高発現している遺伝子を同定した。特に、多くの幹細胞研究が培養細胞を用いて行われている中で、本研究は臨床症例を用いて研究を行っている点に特徴がある。さらに、この遺伝子のノックダウンにより、肺癌幹細胞の特徴の一つである転移が、マウスモデルにより抑制された。このことは単にこの遺伝子が肺癌幹細胞において高発現をしているというだけではなく、少なくとも転移に関連した遺伝子として機能していることを強く示唆している。

今後はこの遺伝子産物の機能解析をさらに進め、肺癌の幹細胞性に何らかの役割を果たしているか調べる必要がある。一方、この遺伝子産物が転移に一定の役割を果たしていることが明らかとなったことより、このたんぱく質に対する機能阻害剤の開発を進める必要がある。機能阻害剤は、将来的に肺癌治療、もしくは肺癌の転移防止薬候補となり得る。

#### 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 11 件)

1. Matsuyama Y, Suzuki M, Arima C, Huang Q, Tomida S, Takeuchi T, Sugiyama R, Itoh Y, Yatabe Y, Goto H, Takahashi T. Proteasomal Non-catalytic Subunit PSMD2 as a Potential Therapeutic Target in Association with Various Clinicopathologic Features in Lung Adenocarcinomas. *Mol Carcinog.* 50:301-309, 2011 (査読あり) .
2. Murakami M, Ito H, Hagiwara K, Kobayashi M, Hoshikawa A, Takagi A, Kojima T, Tamiya-Koizumi K, Sobue S, Ichihara M, Suzuki M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T. Sphingosine kinase 1/S1P pathway involvement in the GDNF-induced GAP43 transcription. *J Cell Biochem.* 112: 3449-3458, 2011 (査読あり) .
3. Hosono Y, Yamaguchi T, Mizutani E, Yanagisawa K, Arima C, Tomida S, Shimada Y, Hiraoka M, Kato S, Yokoi K, Suzuki M, Takahashi T. MYBPH, a transcriptional target of TTF-1, inhibits ROCK1, and reduces cell motility and metastasis. *EMBO J*, 31: 481-493, 2012 (査読あり) .
4. Tanaka K, Tamiya-Koizumi K, Hagiwara K, Ito H, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Iwaki S, Fujii S, Nakamura M, Banno Y, Kannagi R, Tsurumi T, Kyogashima M, Murate T. Role of down-regulated neutral ceramidase during all-trans retinoic acid induced neuronal differentiation in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Biochem*, 151: 611-620, 2012 (査読あり) .
5. Ito H, Tanaka K, Hagiwara K, Kobayashi M, Mizutani N, Takagi A, Kojima T, Sobue S, Ichihara M, Suzuki M, Tamiya-Koizumi K, Nakamura M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T. Role of down-regulated neutral ceramidase during all-trans retinoic acid induced neuronal differentiation in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Biochem*, 151: 599-610, 2012 (査読あり) .
6. Cao K, Tanaka K, Komizu Y, Tamiya-Koizumi K, Murate T, Ueoka R, Kyogashima M, Usukura J, Takahashi T, Suzuki M, Hybrid liposomes affect cellular lipid constituents and caveolae structures. *Bioorg Med Chem Lett*, 22: 1731-1733, 2012 (査読あり) .
7. Yamaguchi T, Yanagisawa K, Sugiyama R, Hosono Y, Shimada Y, Arima C, Kato S, Tomida S, Suzuki M, Osada H, Takahashi T. NKX2-1/ TITF1/ TTF-1- Induced ROR1 Is Required to Sustain EGFR Survival Signaling in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 20: 348- 361, 2012 (査読あり) .

8. Hosono Y, Usukura J, Yamaguchi T, Yanagisawa K, Suzuki M, Takahashi T. MYBPH inhibits NM IIA assembly via direct interaction with NMHC IIA and reduces cell motility. *Biochem Biophys Res Commun.* 428: 173-178, 2012 (査読あり) .
9. Mizutani N, Ito H, Hagiwara K, Kobayashi M, Hoshikawa A, Nishida Y, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Osawa Y, Ohnishi K, Daibata M, Murate T. Involvement of KRAS G12A mutation in the IL-2-independent growth of a human T-LGL leukemia cell line, PLT-2. *Nagoya J Med Sci.* 74:261-271, 2012 (査読あり) .
10. Mizutani N, Kobayashi M, Sobue S, Ichihara M, Ito H, Tanaka K, Iwaki S, Fujii S, Ito Y, Tamiya-Koizumi K, Takagi A, Kojima T, Naoe T, Suzuki M, Nakamura M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T. Sphingosine kinase 1 expression is downregulated during differentiation of Friend cells due to decreased c-MYB. *Biochim Biophys Acta.* 2013, in press (査読あり) .
11. Suzuki M, Takahashi T. Aberrant DNA replication in Cancer. *Mutat Res, Fund Mol Mech Mutat*, 2013, in press (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

1. Regulation of DNA polymerase subunit POLD4 influences genomic instability in lung cancer. Suzuki M, Tomida S, Arima C, Cao K, Masuda Y, Kamiya K, Osada H, Yatabe Y and Takahashi T. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 5 日
2. Hybrid liposomes may target the high expression levels of CerS6 in cancer cells. Ke Cao, Yuji Komizu, Kouji Tanaka, Chinatsu Arima, Keiko Tamiya-Koizumi, Mamoru Kyogashima, Ryuichi Ueoka, Takashi Takahashi and Motoshi Suzuki: 第 70 回日本癌学会総会、2011 年 10 月 5 日、名古屋
3. Targeting the high expression levels of CerS6 in cancer. Suzuki M: The 7th International Forum on Oxidative Stress and Aging. Gdansk, Poland, Nov

26, 2011.

4. Hybrid liposomes may target the high expression levels of CerS6 in cancer cells. Cao K, Komizu Y, Tanaka K, Arima C, Tamiya-Koizumi K, Kyogashima M, Ueoka R, Takahashi T and Suzuki M: The 4th International Symposium of Nagoya Univ GCOE, Nagoya, Nov15-16, 2011
5. HYBRID LIPOSOMES MAY TARGET THE HIGH EXPRESSION LEVELS OF CERS6 IN CANCER CELLS. Cao K, Komizu Y, Tanaka K, Arima C, Tamiya-Koizumi K, Kyogashima M, Ueoka R, Takahashi T and Suzuki M. The 5th International Symposium on "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions", Nara, Jan 7-8, 2012
6. A pivotal role of CerS6 on the ceramide metabolic pathways and HL-induced apoptosis in lung cancer. Suzuki M: The 6th International Symposium on "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions", Kyoto, Jan 7-8, 2012
7. A pivotal role of CerS6 on the ceramide metabolic pathways and tumor metastasis in lung cancer. Motoshi Suzuki, Ke Cao, Kouji Tanaka, Seiichi Kato, Chinatsu Arima, Yasuyuki Hosono, Kiyoshi Yanagisawa, Keiko Tamiya-Koizumi, Takashi Murate, Mamoru Kyogashima and Takashi Takahashi: 第 71 回日本癌学会総会、2012 年 9 月 19 日、札幌

[図書] (計 2 件)

1. がんと microRNA、鈴木元、高橋隆: 癌細胞イラストレーテッド (羊土社) 169-176, 2011
2. 揺らぎから見たがん治療のメカニズム、鈴木元: DOJIN BIOSCIENCE 「生体分子の動きを探る: 揺らぎと生体機能」 (化学同人) 2013, 印刷中

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: Thermostable polymerases having altered fidelity and method of identifying and using same  
 発明者: Loeb LA, Hood L and Suzuki M  
 権利者: U. Washington

種類：

番号：US Patent Application 13/797,207

出願年月日：3/12/2013

国内外の別：国外

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 元 (スズキ モトシ)

研究者番号：80236017

名古屋大学・医学系研究科・講師

### (2) 研究分担者

加藤省一 (KATO SEIICHI)

研究者番号：30584669

名古屋大学・医学系研究科・助教

宇佐美範恭 (USAMI NORIYASU)

研究者番号：20378186

名古屋大学・医学部付属病院・助教 (2011  
年度)

愛知県がんセンター中央病院・呼吸器外  
科・医長 (2012 年度)

### (3) 連携研究者なし