

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 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890020

研究課題名（和文）肺癌幹細胞特異的増殖メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigation for the proliferation mechanism of lung cancer stem cells

研究代表者

鈴木 隆哉（SUZUKI TAKAYA）

東北大学・加齢医学研究所・非常勤講師

研究者番号：80611996

研究成果の概要（和文）：我々が同定した肺組織幹細胞の増殖を抗癌作用物質Exiguolideが強力に抑制する。Exiguolideは特に幹細胞に対する効果が高いと考え、その作用機序を明らかにすることで、肺癌幹細胞特異的増殖メカニズムの解明を試みた。網羅的遺伝子発現解析の結果から、ExiguolideはProtein kinase C (PKC)/Erk/Aktの3つの経路から細胞増殖を抑制している可能性が示されたため、これらの経路に対するExiguolideの効果を肺癌細胞株を利用して検証した。ExiguolideはPKC α を活性化し、サイクリン依存性キナーゼ阻害蛋白であるp21の発現を介して細胞周期をG1で停止させることがわかった。ExiguolideがMekによるErkリン酸化を阻害すること、さらにAktリン酸化の調節を通じてGSK3 β を抑制し、アポトーシスを誘導していることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Previously we identified the lung specific tissue stem cells named alveolar epithelial progenitor cells (AEPCs). The novel marine macrolide (-)-exiguolide significantly inhibit the proliferation of AEPCs. We hypothesized that (-)-exiguolide inhibit proliferation of lung cancer stem cells. Global gene expression analysis suggested the involvement of protein kinase C (PKC), extracellular regulated kinase and phosphoinositide 3 kinase (PI3K)/Akt signalling pathway in the tumour inhibition of (-)-exiguolide. Western blotting analysis confirmed the potential activity of (-)-exiguolide; p21 up-regulation through PKC α activation, MEK inhibition and PI3K/Akt/GSK3 β pathway modulation resulting in apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：胸部外科学

キーワード：癌幹細胞 海洋由来天然化合物 マクロリド化合物 肺癌

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織は様々な分化度・増殖能をもった細胞群により構成された不均一な組織であ

る。癌細胞の一部はしばしば化学療法や放射線療法に対し抵抗性を示し、治療を困難なものにする。近年、腫瘍細胞のごく一部の分画

のみが、免疫不全マウスへの移植モデルで高い腫瘍形成能をもつことが明らかになった。この細胞分画は「癌幹細胞」と呼ばれ、高い分化能・増殖能を持っている。癌幹細胞は腫瘍組織の拡大だけでなく、浸潤・転移・再発を引き起こす原因と考えられており、癌を克服するための重要な標的であると考えられている。

癌幹細胞の起源は諸説あるが、正常組織中の組織幹細胞がその起源であるとする説が有力である。その理由として、癌幹細胞の自己増殖メカニズムが正常組織幹細胞と共通する点が多いことが挙げられる (Reya, Nature 414: 105-111, 2001)。幹細胞の増殖メカニズムは幹細胞に特異的なシグナルによって維持されていると考えられており、癌幹細胞の増殖抑制には、これまでと異なるアプローチや、作用メカニズムが異なる抗腫瘍活性化化合物が必要になる。

我々は最近、成人肺組織由来のII型肺上皮前駆細胞 (Alveolar epithelial progenitor cells, AEPCs) の分離培養法を確立し (Lab Invest 91: 363-378, 2011)、細胞とともに特許を取得した (特願 2009-100548)。臨床検体の解析により、AEPCは肺腺癌組織中で著明に増殖していることがわかった。さらに網羅的遺伝子解析により、これまで報告のある癌幹細胞関連遺伝子 (Bmi1・Wnt5a・mTOR) や癌増殖抑制に関与する microRNA (miR-34・miR-200c) の発現変化が認められた (論文作成中)。これらのことは AEPC がヒト肺癌幹細胞の起源であることを示している。

これとは別に、私は海綿由来マクロリド化合物 exiguolide が肺癌細胞株に対し著明な増殖抑制効果を発揮することを報告し (Chemistry 17: 2678-88, 2011)、特許を申請した。exiguolide は肺癌の増殖に固有のシグナルを阻害していると考えられる。

本研究は、私が今まで大学院学生として研究を続けてきた 1) ヒト臨床検体由来肺癌幹細胞および 2) 肺癌固有の増殖シグナル阻害作用を持つ exiguolide の 2 点を軸に、新規の肺癌治療戦略を見いだそうとするものである。

2. 研究の目的

肺癌幹細胞の自己増殖シグナルを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体由来する成人肺組織幹細胞 AEPC に Exiguolide を作用させると、Exiguolide その増殖抑制効果は 50% 増殖阻止濃度 (GI50) にして 200nM と、肺癌細胞株 A549 の GI50 (600nM) より 3 倍程度高い効果を示した。そこで Exiguolide は特に幹細胞に

対する効果が高いと考え、その作用機序を明らかにすることで、肺癌幹細胞特異的増殖メカニズムの解明を試みた。

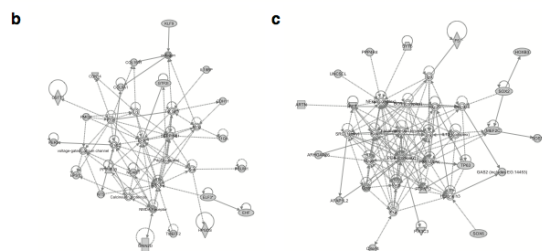
(2) また Exiguolide に高感受性の肺癌細胞株として H460 (大細胞肺癌由来株) が見出された。このことから H460 を材料として Exiguolide の抗癌活性メカニズムを明らかにすることにより、肺癌幹細胞増殖メカニズムを明らかにすることとした。その方法として、網羅的遺伝子解析を用いた。

4. 研究成果

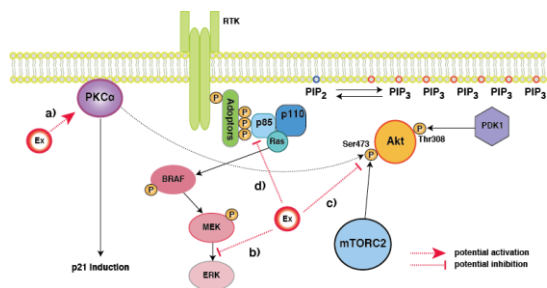
肺大細胞癌株 H460 に Exiguolide を作用させ遺伝子発現の変動を網羅的に同定した。変動遺伝子群をオンライン・データベース (Connectivity Map/Ingenuity Pathway Analysis) で解析すると、Exiguolide が Protein kinase C (PKC)/Erk/Akt の 3 つのシグナル経路から細胞増殖を抑制している可能性が示された (下図)。

a

rank	cmap name	mean	n	enrichment	p	specificity	% non-null
1	H-7	-0.719	4	-0.951	0.00000	0.0833	100
2	mitoxantrone	-0.737	3	-0.954	0.00022	0.0213	100
3	CP-690334-01	-0.295	8	-0.690	0.00024	0.0068	50
4	lasalocid	0.526	4	0.873	0.00036	0.0098	100
5	geldanamycin	-0.340	15	-0.506	0.00042	0.0859	53



これらの経路に対する Exiguolide の効果をウエスタンブロッティングで検証した。まず Exiguolide は PKC α を活性化し、サイクリン依存性キナーゼ阻害蛋白である p21 の発現を介して細胞周期を G1 で停止させることがわかった。またウエスタンブロッティング・抗体アレイ解析により、Exiguolide が Mek による Erk リン酸化を阻害すること、さらに Akt リン酸化の調節を通じて GSK3 β を抑制し、アポトーシスを誘導していることがわかった。PKC はこれまでも海洋由来マクロリド化合物の標的として知られていたが、幹細胞の増殖に関わる知見はなかった。肺癌との関わりについても明確な知見はない。分子標的薬を含む既存抗癌剤の耐性に複数の細胞内シグナル経路が関わっていることが先行研究により示唆されている。本研究により肺癌幹細胞の増殖に PKC α が関わっていることが示唆され、肺癌化学療法における耐性克服への重要な知見を得ることができた。(下図)



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 12 件)

1. Fujino N, Kubo H, Ota C, Suzuki T, Takahashi T, Yamada M, Suzuki S, Kondo T, Nagatomi R, Tando Y, Yamaya M. Increased severity of H1N1 pandemic influenza virus infection in alveolar type II cells from patients with pulmonary fibrosis. *J Infect Dis* 207:692-693, 2013. (査読有り)
2. Fujino N, Kubo H, Suzuki T, He M, Suzuki T, Yamada M, Takahashi T, Ota C, Yamaya M. Administration of a specific inhibitor of neutrophil elastase attenuates pulmonary fibrosis after acute lung injury in mice. *Exp Lung Res* 38: 28-36, 2012. (査読有り)
3. Fujino N, Ota C, Suzuki T, Suzuki S, Hegab AE, Yamada M, Takahashi T, He M, Kondo T, Kato H, Yamaya M, Kubo H. Analysis of gene expression profiles in alveolar epithelial type II-like cells differentiated from human alveolar epithelial progenitor cells. *Respir Invest* 50:110-116, 2012. (査読有り)
4. Takahashi T, Kubo H, Fujino N, Suzuki T, Ota C, Yamada M, Yamaya M, Suzuki S, Kurosawa S. Surgical stress increases circulating endothelial microparticles in the elderly. *Anaesthesia & Intensive Care* 40:899-902, 2012. (査読有り)
5. Fujino N, Kubo H, Ota C, Suzuki T, Suzuki S, Yamada M, Takahashi T, He M, Suzuki T, Kondo T, Yamaya M. A novel method for isolating individual cellular components from the adult human distal lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46: 422-430, 2012. (査読有り)
6. Fujino N, Ota C, Takahashi T, Suzuki T, Suzuki S, Yamada M, Nagatomi R, Kondo T, Yamaya M, Kubo H. Gene expression profiles of alveolar type II cells of chronic obstructive pulmonary disease: A case-control study. *BMJ Open* 2:e001553, 2012. doi:10.1136/bmjopen-2012-001553 (査読有り)
7. Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, Suzuki T, Ota C, He M, Yamada M, Suzuki S, Yanai M, Kurosawa S, Yamaya M, Kubo H. Increased circulating endothelial microparticles in COPD patients: a potential biomarker for COPD exacerbation susceptibility. *Thorax* 67:1067-1074, 2012. (査読有り)
8. Fuwa H, Suzuki T, Kubo H, Yamori T, Sasaki M. Total synthesis and biological assessment of (-)-exiguolide and analogues. *Chemistry-A European Journal* 17:2678-2688, 2011. (査読有り)
9. Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, Ishizawa K, He M, Suzuki T, Fujino N, Kunishima H, Hatta M, Nishimaki K, Aoyagi T, Tokuda K, Kitagawa M, Yano H, Tamamura H, Fujii N, Kaku M. The

increase in surface CXCR4 expression on lung extravascular neutrophils and its effects on neutrophils during endotoxin-induced lung injury. *Cellular & Molecular Immunology* 5:305-314, 2011. (査読有り)

10. Fujino N, Kubo H, **Suzuki T**, Ota C, Hegab AE, He M, Suzuki S, Suzuki T, Yamada M, Kondo T, Kato H, Yamaya M. Isolation of alveolar epithelial type II progenitor cells from adult human lungs. *Lab Invest* 91: 363-378, 2011. (査読有り)
11. He M, Kubo H, Morimoto K, Fujino N, **Suzuki T**, Takahashi T, Yamada M, Yamaya M, Maekawa T, Yamamoto Y, Yamamoto H. RAGE binds phosphatidylserine and assists in the clearance of apoptotic cells. *EMBO Reports* 12: 358-364, 2011. (査読有り)
12. **Suzuki T**, Kondo T, Kubo H. Evidence for Human Lung Stem Cells (correspondence). *New Engl J Med* 365: 464-466, 2011. (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

1. **Suzuki T**, Kubo H, Yamada M, Fuwa H, Fujino N, Takahashi T, Ota C, Yamaya M, Kondo T. An anti-cancer effect of newly synthesized marine macrolide, (-)-Exiguolide. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:A6278. 2012年5月23日, サンフランシスコ, 米国
2. **Suzuki T**, Kubo H, Fuwa H, Kondo T. An anti-cancer effect of newly synthesized marine compounds. American Thoracic Society International Conference 2011. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:A5069. 2011年5月17

日, デンバー, 米国

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗がん作用を有するマクロライド化合物

発明者: 不破春彦, 佐々木誠, 久保裕司, 鈴木隆哉

権利者: 国立大学法人東北大学

種類: 特

番号: PCT/JP2011/006057

出願年月日: 平成23年10月23日

国内外の別: 外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 隆哉 (SUZUKI TAKAYA)

東北大学・加齢医学研究所・非常勤講師

研究者番号: 80611996