

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590701

研究課題名(和文) 肺癌における幹細胞複製分子の発現解析と新規治療標的への応用

研究課題名(英文) Analysis of expression profile and application to the novel therapeutic target of stem cell replication molecules in lung cancer

研究代表者

小林 大介 (KOBAYASHI, DAISUKE)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：50295359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肺癌の新規治療標的の同定を目指した。特に早期からの発現上昇に加え、その発現抑制により癌細胞の増殖停止を可能とするSALL4に着目し研究を行った。肺癌細胞でSALL4の発現を適度に抑制したところ、極めて低濃度から抗癌剤感受性が増強した。さらに、術後化学療法を受けた肺癌症例で、治療前の癌組織におけるSALL4 mRNA発現量は、後に再発した群で高く、高値例は陰性例に比べ、再発までの平均日数が短かった。以上より、SALL4は肺癌の抗癌剤耐性を誘導しており、新規治療標的分子となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study we aimed to identify novel therapeutic target in lung cancer. For that purpose, we examined the potentiality of SALL4 that expresses especially at early stages of cancer and that its inhibition of the expression leads to growth arrest of the cells. Appropriate level of the inhibition of SALL4 in lung cancer cells resulted in the augmentation of the sensitivity of all investigated anticancer drugs at quite low concentration. Moreover, in lung cancer patients those freshly entered chemotherapy after surgical resection, amounts of SALL4 mRNA expression before chemotherapy was higher in the group showing recurrence after chemotherapy and was further higher in the group showing shorter survival. The data indicate that SALL4 induces drug resistance and could be a novel therapeutic target in lung cancer patients.

研究分野：医歯薬学

キーワード：新規治療標的 肺癌 抗癌剤耐性 再発 予測マーカー

### 1. 研究開始当初の背景

近年、癌で重要な役割を果たす種々の増殖因子、抗アポトーシス分子や浸潤・転移促進因子に関する解析が行われ、異なる機能を持つ複数のマーカーを組み合わせることで個々の癌の性状が把握可能になり、治療法の選択や予後予測に威力を発揮しつつある。

一方、腫瘍マーカー分子そのものを標的とした治療法の開発においては、癌細胞の生存に必須で、非癌細胞でほとんど発現がみられず、可能な限り多くの患者で陽性となるマーカーの同定が必要である。さらに、臓器特異的に高発現し、かつ早期に検出可能な腫瘍マーカーが理想的であるが、これまでそのようなマーカーは確立されていない。

これまで申請者らは、各種抗アポトーシス分子やチロシンキナーゼの発現が各種癌で高まっており、癌細胞の増殖に極めて重要な役割を担っていることを報告してきた(Exp Cell Res 305, 300-11, 2005; Cancer Sci 98, 315-20, 2007; Cancer Sci 98, 334-40, 2007; Lung Cancer 56, 337-40, 2007)。興味深いことに、検討したいずれの分子も、癌部での発現亢進に臓器特異性はみられなかったものの、非癌部での発現レベルは肺で最も低かった。この結果は、“肺が消化器系の臓器や乳腺に比べ生理的な再生能が最も低いこと”を反映していると考えられた。このことは、細胞の再生(自己複製)に必須の分子を標的とすれば、肺癌をさらに感度良く特異的に検出できるのみならず、増殖能のない正常肺上皮細胞への影響を最小限にしつつ、癌細胞特異的な治療法の開発が可能であることを示唆している。そこで、我々は異常を来たすシグナル伝達経路に共通点の多い幹細胞の複製分子に着目した。すなわち、ES 細胞や造血幹細胞の自己複製に必須の分子群が同定されているため、これらの分子を標的にすれば、脱分化したまま続けられる無秩序な増殖、癌化した細胞の本質を捉えることができると考え、まず、複製に必須とされる Nanog および SALL4 の発

現解析を行った。その結果、両分子は予想を裏切らず、肺癌患者組織で高感度かつ癌特異的に広く発現していた(Oncology Report, 26: 965-70, 2011; 22: 587-91, 2009)。本研究では以上の背景を基盤とし、新たな肺癌マーカーの同定と治療標的への応用を目指した。

### 2. 研究の目的

本研究では、幹細胞の再生/自己複製を司る分子群が、非再生性臓器である肺では殆ど発現しない点に着目し、肺癌細胞に発現特異性が高いマーカーの同定と治療標的への応用を試みた。1)まず、これまでのマウス幹細胞研究で得られた知見から癌細胞の増殖や脱分化状態の維持への重要性が高いことが想定され、肺癌細胞に高感度かつ最も特異的に発現する、SALL4 について治療標的となり得るか否か検討した。すなわち、SALL4 の発現を抑制した際に、これまで以上に癌細胞に対する治療効果の増感が可能かどうかを広く調べた。2)次に、SALL4 の発現に伴い、幹細胞の特徴である治療耐性の誘導が起こる可能性に着目し、その誘導機序を解析した。さらに、SALL4 発現量と再発との関係についても検討を加えた。以上の結果を基に、肺癌における幹細胞複製分子の治療標的分子としての有用性を結論付けることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)対象とした肺癌細胞株と症例

ヒト肺癌細胞株として、A549(腺癌)とSBC-3(小細胞癌)を用いた。SALL4mRNA 発現量と再発との関係解析には、術後化学療法を行った肺癌(腺癌、扁平上皮癌および小細胞癌)症例の抽出組織を使用した。

#### (2)肺癌組織および細胞からの RNA 精製法

ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片および肺癌細胞株からの RNA 精製は、それぞれ、RNeasy FFPE Kit(QIAGEN 社)および RNeasy Plus Mini Kit(QIAGEN 社)を用いて行った。

#### (3)生細胞数の測定法

96well プレート内の細胞に Cell

Titer-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay 試薬を添加し、ATP をルシフェラーゼ反応で発光量として捉え評価した。発光量の測定には、Veritas Microplate Luminometer を使用した。

(4) SALL4 遺伝子および SALL4 siRNA の導入法

SALL4 遺伝子発現 pCMV6 ベクター (pCMV6-SALL4) およびコントロールベクター (pCMV6-Mock) や SALL4 siRNA と non-silencing control RNA (NSC) の肺癌細胞への導入は、エレクトロポレーション法で行った。

(5) 幹細胞複製分子の遺伝子および蛋白発現の評価法

mRNA の発現は、18S rRNA を内部標準とし、TaqMan RT-PCR 法で定量化し、蛋白発現量は Western blotting 法で調べた。

(6) SALL4 遺伝子発現ベクター導入による遺伝子発現変化の解析法

pCMV6-SALL4 と pCMV6-Mock を導入した A549 および SBC-3 細胞における遺伝子発現の変化は、Agilent SurePrint G3 Human GE 8 × 60K マイクロアレイと RT-PCR 法で評価した。

4. 研究成果

(1) 肺癌細胞株に各種濃度の SALL4 siRNA を導入し、24 および 48 時間目に mRNA 発現量の変化を調べたところ、同等の発現抑制がみられる濃度は異なるものの、両細胞とも 48 時間後に約 50% の発現抑制が確認された。そこで、A549 および SBC-3 に 100-200nM の siRNA を導入した後、48 時間目に各種抗がん剤を添加し、感受性に及ぼす影響を解析した。抗癌剤濃度については、親細胞で添加 4 日目に約 50% の増殖抑制がみられた濃度を基準とし、その 2 倍と 2 分の 1 の濃度も加え、実験を行った。まず主軸となるプラチナ系抗癌剤のシスプラチン (CDDP) について検討したところ、ノンサイレンシングコントロール RNA (NSC) を導入した際に比べ、SALL4 siRNA 導入細胞では、薬剤添加 4 日目に顕著な感受性

の増強がみられた。同様に、カルボプラチン (CBDCA) およびパクリタキセル (PTX) 感受性も解析したところ、シスプラチンと同様、SALL4 siRNA の導入により、両者とも添加 4 日目に感受性が高まった。次に、この増強効果が最も強くみられた各抗癌剤添加 4 日目における感受性増強効果を、抗癌剤未処理に対する各抗癌剤添加時における生細胞数の比率で比べたところ、A549 細胞では、シスプラチンで 0.2 μg/ml から、カルボプラチンで 10 μM から、パクリタキセルでは 1nM から抗癌剤感受性の有意な増強がみられた (図 1A)。

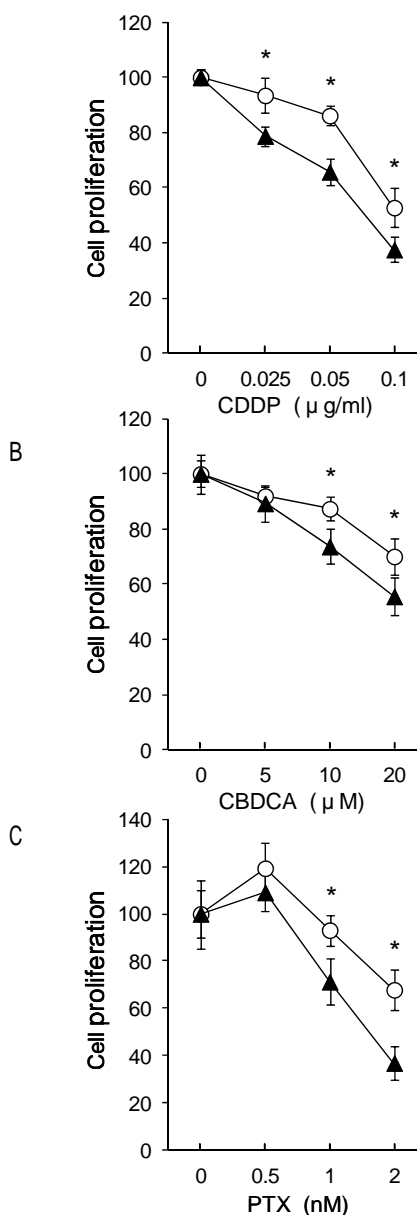


図 1A SALL4 siRNA 導入 A549 細胞における抗癌剤感受性の変化 (\* p<0.01)

肺小細胞癌由来 SBC-3 細胞についても検討を行ったところ、すべての抗癌剤に関し、SALL4 siRNA の導入により、A549 細胞の時と同様に感受性が増強した。すなわち、SBC-3 細胞では、シスプラチンで 0.025  $\mu\text{g}/\text{ml}$  から、カルボプラチンでは 1 $\mu\text{M}$  から、パクリタキセルでは 2.5nM から有意な抗癌剤感受性の増強が確認された ( 図 1 B )。

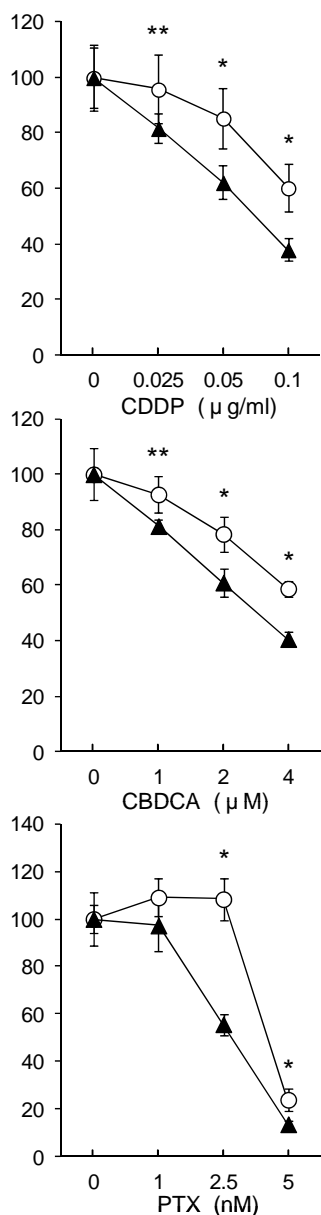


図 1 B SALL4 siRNA 導入 SBC-3 細胞における抗癌剤感受性の変化 (\*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$ )

以上の結果から、SALL4 を標的とした場合、通常血中濃度よりも低い濃度域で抗癌剤治療効果の増感が可能であることが明らかとなった。この結果から、SALL4 が組織型や薬剤の種類にかかわらず、肺癌において普遍的に抗癌剤耐性分子として働くことが、はじめて明らかとなった。

( 2 ) SALL4 による抗癌剤耐性機序を調べるため、遺伝子導入細胞を用い、マイクロアレイと RT-PCR 法による解析を行った。まず、A549 および SBC-3 細胞に SALL4 遺伝子発現ベクター ( pCMV6-SALL4 ) およびコントロールベクター ( pCMV6-Mock ) を導入し、pCMV6-SALL4 導入細胞において遺伝子および蛋白の発現が著明に増加していることを確認した。次いでこれらの遺伝子導入細胞を用い、マイクロアレイによる解析を行った。その結果、両細胞で共通して 2 倍以上の増加がみられた分子は、胎盤の発育に重要で、肝や乳腺の細胞膜への結合が報告されている chorionic somatomammotropin ( CSH )、一部の癌細胞の増殖に重要とされている IL-6、各種癌組織での発現が確認されているものの機能不明とされている transmembrane protein 229B、および歯のエナメル質形成分子 ameloblastin の 4 者であった ( 表 1 )。そこで、この 4 分子について、SALL4 siRNA 導入細胞でも実際に発現に変化がみられるか否か解析したところ、癌細胞の生存シグナルとして重要な IL-6 mRNA の発現が目立って低下しており、同分子の SALL4 による抗癌剤耐性への関与が示唆された。この結果と、IL-6 は STAT3 を誘導するという事実、および SALL4 が STAT3 に発現増強を受けることを併せ考えると、IL-6 と SALL4 との間の正のフィードバックが抗癌剤耐性を惹起している可能性があり、今後の検討課題といえる。

表1 pCMV6-SALL4ベクター導入A549およびSBC-3細胞のマイクロアレイ解析

分子名	Log2 ratio (変動倍率)	
	A549	SBC3
Chorionic somatomammotropin (CSH) 別名Human placental lactogen (HPL)	4.81(28.1)	8.22(298.2)
IL-6	1.43(2.69)	1.25(2.38)
Transmembrane protein 229B	2.26(4.78)	2.61(6.10)
ameloblastin	2.26(4.78)	2.37(5.17)

(3) 肺癌に対し手術を施行後、初回の術後化学療法を受けた後フォローアップが可能であった31例について、治療前の癌組織におけるSALL4 mRNA発現量と再発との関連について調べた。臨床背景、術後化学療法のレジメンおよび再発までの期間または観察期間を表2に示した。再発群と非再発群で、性、年齢、喫煙、臨床病期や組織型に明らかな偏りはみられていない。

表2 術後化学療法を受けた肺癌症例の臨床背景

R*	G**	Age	Smoking	Stage	Type***	Adjuvant chemotherapy	Days****
F	66	Yes	III A	SCC	CDDP/CBDCA+CPT11	275	
F	58	Yes	II A	Ad	CBDCA+PTX	95	
M	67	Yes	IB	SCLC	CBDCA+VP16	143	
F	54	Yes	III A	Ad	CBDCA+PEM/PEM	44	
M	67	Yes	III A	SCC	CBDCA/PTX	151	
M	68	Yes	III A	SCLC	CBDCA+VP16	31	
F	58	No	III B	Ad	CBDCA+PEM	139	
M	62	Yes	III A	SCC	CBDCA+DOC	175	
(+)	F	74	No	III A	Ad	CBDCA+PTX	308
F	51	Yes	III A	Ad	CBDCA+PTX	735	
M	59	Yes	IIB	SCC	CDDP+VNR	181	
M	72	Yes	III A	SCC	CBDCA+PTX	410	
M	59	Yes	IA	SCC	CBDCA+PEM/VP16	411	
F	72	Yes	IIB	Ad	CBDCA+PTX	374	
M	49	Yes	III A	Ad	CBDCA+PTX	47	
R*	G**	Age	Smoking	Stage	Type***	Adjuvant chemotherapy	Days****
M	69	Yes	III A	SCC	CDDP+PTX	874	
M	64	Yes	III A	SCC	CBDCA+PTX	746	
F	71	No	III A	Ad	CBDCA+PTX	802	
M	56	Yes	II A	Ad	CBDCA+PTX	748	
M	63	Yes	IIB	SCC	CBDCA+PTX	660	
F	66	No	IA	Ad	UFT	562	
M	65	Yes	IA	SCLC	CDDP+CPT11	1274	
(-)	M	71	Yes	II A	SCLC	CPT11	998
M	76	Yes	III A	Ad	CBDCA+PEM	391	
M	69	Yes	IB	SCC	CBDCA+PTX	273	
M	57	Yes	III A	Ad	CBDCA+PEM	296	
M	75	Yes	III A	SCC	CBDCA+GEM	296	
F	61	No	IB	Ad	UFT	1372	
M	71	Yes	IIB	SCC	CBDCA+PTX	1405	
M	66	Yes	III A	SCC	CDDP+VNR	1645	
M	71	Unknown	IIB	SCC	CBDCA+PTX	1807	

\*R, recurrence; \*\*G, gender; \*\*\*SCC, squamous cell carcinoma; Ad, adenocarcinoma; SCLC, small cell lung carcinoma; \*\*\*\*化学療法後の再発までの日数; \*\*\*\*\*化学療法後の観察日数

以上の症例を対象に、背景因子別にSALL4 mRNA発現量を比較した。性、年齢、組織型や臨床病期で差異は認められなかった。一方、再発の有無で比較すると、再発群の平均SALL4 mRNA発現量が125.0であったのに対し、非再発群では3.7と、再発群の方が34倍高いことがわかった(図2:非小細胞肺癌における解析結果)。また、非再発群のmean+2SDをカットオフ値として、再発群を陽性8例と陰性7例に分け、再発までの期間を比較検討した。その結果、陰性例の再発までの平均日数が300±242日であったのに対し、陽性例では177±117日と短い傾向にあることがわかった。以上の事実から、肺癌における術後化学療法前のSALL4遺伝子発現量と再発との密接な関係が示唆された。

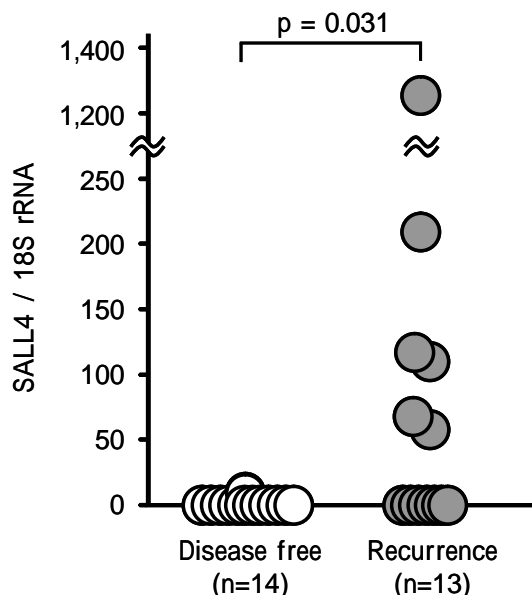


図2 非再発群と再発群におけるSALL4 mRNA発現量の比較(非小細胞肺癌における結果)

### 総括

肺癌の予後は極めて悪く、stage I-IIIの手術症例でも術後化学療法への耐性が原因で、治療後再発のみられることが少なくない。しかし、プラチナ製剤やタキソール製剤などの抗癌剤感受性を規定し、治療後再発を予測可能なマーカーは同定されていなかった。すなわち、癌細胞において構成的に発現し、自然耐性を担う分子の探索と治療標的への応用

が急務となっていた。本研究の成果から、幹細胞複製分子として注目されてきた SALL4 が、肺癌細胞で抗癌剤耐性を担っていることのみならず、これを治療標的とした場合、従来の血中濃度よりも極めて低い濃度域で感受性の増強が可能であることを明らかにできた。さらに、SALL4 が肺癌で普遍的に発現することのみならず、SALL4 mRNA 発現量が抗癌剤治療後再発の予測マーカーとなり得ることも初めて見出した。すなわち、SALL4 mRNA 発現量の高い、再発が予測される症例では、本分子を標的とした低濃度抗癌剤併用療法あるいは siRNA の単独高濃度投与が、新しい治療法となる可能性がある。本研究はその開発に向けた最初の基盤も提供できたと考えられる。

#### 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1件)

YANAGIHARA N, KOBAYASHI D, KURIBAYASHI K, TANAKA M, and WATANABE N. Significance of SALL4 as a drug resistant factor in lung cancer. *Int J Oncol* 査読有, 46, 2015; pp1527-1534.  
DOI:10.3892/ijo.2015.2866.Epub 2015 Feb 3.

〔学会発表〕(計1件)

柳原希美、小林大介、栗林景晶、田中真樹、長谷川匡、渡邊直樹 . 幹細胞複製分子 SALL4 は肺癌において抗癌剤耐性分子として働く  
日本臨床検査医学会 2014年11月22日~25日、福岡国際会議場(福岡)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

小林 大介 (KOBAYASHI Daisuke)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：50295359

##### (2)研究分担者

渡邊 直樹 (WATANABE Naoki)  
札幌医科大学・名誉教授  
研究者番号：10158644

田中 真樹 (TANAKA Maki)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40207139

栗林 景晶 (KURIBAYASHI Kageaki)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：50381257