

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790808

研究課題名(和文) 治療標的としての肺癌新規幹細胞候補遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of genes associated with cancer stemness in lung cancer cells

研究代表者

長谷 哲成 (Hase, Tetsunari)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30621635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)： 癌細胞の治療抵抗性には種々の要因があるが、その一つとして癌幹細胞の存在がいられている。癌幹細胞の分離法として、各種成長因子を添加した無血清培地で足場非依存性に培養による細胞塊(sphere)形成が行われている。今回我々は、この方法で肺がん細胞株から形成された細胞塊(sphere)の遺伝子発現を通常培養と比較することで、候補遺伝子を同定し、さらにそれに係るマイクロRNAを探索した。

肺癌細胞株においてsphere形成細胞ではSFTPA2遺伝子の発現が上昇し、miR-125bの発現が低下していた。しかし、miR-125bの強制発現によるsphere形成能には影響がなく今後さらに検討が必要である。

研究成果の概要(英文)： There are several factors associated with resistance of cancer cells against available therapeutics, one of which seems to be explained by cancer stem cell theory. Previous studies reported cancer stem-like cells were enriched in serum free medium with growth factors and anchorage-independent condition forming cell aggregates called sphere. In this study, we try to identify genes and micro RNAs associated with lung cancer stem cell property by comparing the gene expression of lung cancer cell lines growing in sphere condition with those growing in normal condition.

In lung cancer cell lines growing in sphere culture, the expression of SFTPA2 gene was up-regulated and miR-125b was down-regulated. Ectopic expression of miR-125b did not suppress sphere formation in lung cancer cell line.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：癌幹細胞 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

現在我が国において悪性新生物は全死因の第一位である。中でも肺癌は第一死因であり、肺癌に対するより有効な治療戦略を確立することは急務である。

癌細胞の化学療法および放射線療法抵抗性には種々の要因があるが、その中で近年癌幹細胞の関与が注目されている。癌幹細胞は、アポトーシスの抑制・ABCトランスポーターを介した薬剤排泄機構・特異な細胞周期などにより治療抵抗性を獲得する。

他の固形癌と比較し肺癌自体には組織学的な多様性があり、また、近年遺伝子の発現パターンや抗癌剤の感受性の違いが明らかにされており、細胞系統特異的な癌幹細胞の存在が示唆されている。

癌幹細胞の分離法としては、細胞外薬剤排泄機構と関連した色素排泄能の違いや、多くの固形腫瘍においては幹細胞特異的表面マーカーに基づいて行われている。また、癌幹細胞を選択的に培養する方法として各種成長因子を添加した無血清培地での足場非依存性培養による細胞塊(sphere)形成が行われている。

また、マイクロ RNA と、癌幹細胞との関連も示唆されている。マイクロ RNA はゲノム上にコードされた鎖長が 19~27 塩基程度の non-coding RNA であり、主にターゲット mRNA の 3' untranslated region (3'UTR) を配列特異的に認識し、相補的・一部相補的な mRNA を分解もしくは翻訳を抑制することにより遺伝子の発現を制御する。これまでに miR-200c や 145 等の関与が報告されている。

2. 研究の目的

肺癌幹細胞特異的に発現する遺伝子を探究するため、複数の肺癌細胞株を成長因子を添加した無血清培地での足場非依存性培養による sphere 形成を行い、癌幹細胞性

(stemness)を含む細胞分画の分離を行う。sphere 形成細胞から抽出した RNA のマイクロアレイによるコントロール株との遺伝子発現の比較検討を行い、癌幹細胞に関連すると考えられる遺伝子を同定する。また、同様にマイクロ RNA アレイを施行し、stemness に関連するマイクロ RNA を同定する。さらにそれらの相互関係を明らかにして、より有効な治療標的を同定する。

3. 研究の方法

(1) 肺癌細胞株における sphere 形成細胞の mRNA 解析

ATCC や Hamon Center collection (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA) から供与を受けた 30 程の肺癌細胞株 (腺癌・扁平上皮癌・大細胞癌) から sphere 形成を行い、コントロール細胞との間で mRNA の解析を行い、遺伝子の発現を検討する。

(2) 肺癌細胞株における sphere 形成細胞のマイクロ RNA 解析

(1) と同様に sphere 形成を行い、コントロール細胞との間でマイクロ RNA の解析を行い、発現を検討する。

(3) マイクロ RNA 過剰発現株の作成

(2) で同定したマイクロ RNA と候補遺伝子を合わせて web 上のデータベースを用い、総合的に検討することにより stemness に重要なマイクロ RNA の候補を同定する。

同定したマイクロ RNA を遺伝子導入することにより、候補遺伝子の発現の変化を、リアルタイム PCR 及びウェスタンブロット法にてそれぞれ mRNA レベル、タンパクレベルで検討する。さらに、増殖能などの表現型を検討する。

4. 研究成果

(1) 肺癌細胞株における sphere 形成細胞

の mRNA 解析

肺癌細胞株である HCC4006 を EGF・bFGF を含む無血清培地にて足場非依存の状態にて培養を行ったところ、図 1 の様に sphere 形成は可能であった。

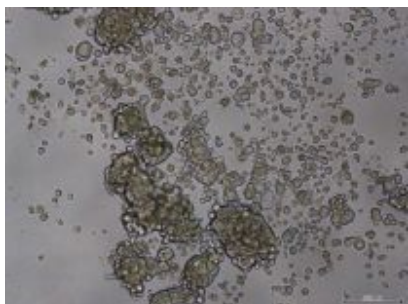


図 1 sphere の形成

肺癌細胞株において、成長因子を加えた無血清培地で足場非依存状態にて培養。

マイクロアレイを用いた発現解析にて通常培養との mRNA レベルの比較を行ったところ、癌幹細胞との関連が示唆されている ALDH1A1 や CD133 に加え、Sphere 形成細胞では肺で特異的に発現している SFTPA2 遺伝子の発現が約 6000 倍に上昇していた (表 1)。

遺伝子名	sphere	contro l	fold change
SFTPA2	11839.00	1.95	6080.07
B	1067.00	5.30	201.50
C	670.00	5.78	115.83
ALDH1A 1	61.17	1.33	45.93
CD133	81.78	8.77	9.33

表 1 mRNA 発現アレイにおける sphere 形成細胞と通常培養での発現の比較

不死化ヒト正常気道上皮細胞を含む 16 の肺癌細胞株において、通常培養を行った場合の SFTPA2 遺伝子の mRNA レベルでの発現を解析したところ、多くの細胞株で本遺伝子は低発現であった。この中で

HCC4011 細胞株に対し sphere 形成を行う語、HCC4006 同様本遺伝子の発現は上昇していた。

(2) 肺癌細胞株における sphere 形成細胞のマイクロ RNA 解析

マイクロアレイを用いて通常培養とのマイクロ RNA レベルでの比較を行ったところ、過去に癌幹細胞と関連が報告されている hsa-miR-205 も含め、miR-125b の発現が低下していた (表 2)。

マイクロ RNA	sphere	control	fold change
miR-125b	19.97	995.10	49.83
E	24.68	875.15	35.46
F	19.10	429.03	22.46
miR-205	243.93	2258.62	9.26

表 2 マイクロ RNA 発現アレイにおける sphere 形成細胞と通常培養での発現の比較

(3) マイクロ RNA 過剰発現株の作成

miR-125b は web 上のデータベースにおいて、SFTPA2 遺伝子をターゲットとしているため、miR-125b は肺癌幹細胞に抑制的に働く可能性を考えた。

また、過去の報告では miR-125b は膀胱がんや、悪性黒色腫などで腫瘍抑制的に働いており (FEBS Lett 2013、PLOS One 2013), miR-125b を遺伝子導入あるいはその inhibitor を導入し、細胞増殖に与える影響を検討した。

miR-125b あるいはその inhibitor を HCC4006 細胞株に遺伝子導入したところ、前者において増殖能はむしろ増加し、inhibitor にて増殖能の抑制がみられた。

Sphere 形成能に関して検討したが、こちらに関しては現在のところ有意な差をみとめていない。

まとめ

本研究において、複数の癌幹細胞に関連すると考えられる遺伝子・マイクロRNA候補が見いだされた。しかし、今回注目したmiR-125bに関しては予想された表現型は得られなかった。

今後マイクロアレイから得られた他のマイクロRNAや、SFTPA2遺伝子を含む他の遺伝子に着目した検討を行い、肺癌幹細胞の性質を規定する遺伝子の同定を行い、その制御をすることで、肺癌治療の一助になることが期待される。

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 4 件)

(1) Okachi S, Imai N, Imaizumi K, Hase T, Shindo Y, Sakamoto K, Aso H, Wakahara K, Hashimoto I, Ito S, Hashimoto N, Sato M, Kondo M, Hasegawa Y. Endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration in older people. Geriatr Gerontol Int. 2013 ;13(4):986-92. 査読有り

(2) Yoshida K, Sato M, Hase T, Elshazley M, Yamashita R, Usami N, Taniguchi T, Yokoi K, Nakamura S, Kondo M, Girard L, Minna JD, Hasegawa Y. TIMELESS is overexpressed in lung cancer and its expression correlates with poor patient survival. Cancer Sci. 2013 ;104(2):171-7. 査読有り

(3) Elshazley M, Sato M, Hase T, Yamashita R, Yoshida K, Toyokuni S,

Ishiguro F, Osada H, Sekido Y, Yokoi K, Usami N, Shames DS, Kondo M, Gazdar AF, Minna JD, Hasegawa Y. The circadian clock gene BMAL1 is a novel therapeutic target for malignant pleural mesothelioma. Int J Cancer. 2012 15;131(12):2820-31. 査読有り

(4) Horio M, Sato M, Takeyama Y, Elshazley M, Yamashita R, Hase T, Yoshida K, Usami N, Yokoi K, Sekido Y, Kondo M, Toyokuni S, Gazdar AF, Minna JD, Hasegawa Y. Transient but not stable ZEB1 knockdown dramatically inhibits growth of malignant pleural mesothelioma cells. Ann Surg Oncol. 2012 ;19 Suppl 3:S634-45. 査読有り

[学会発表](計 3 件)

(1) Shigehisa Kajikawa, Mitsuo Sato, Tetsunari Hase, Tomohiko Kakumu, Eiichi Maruyama, Ryo Yamashita, Masashi Kondo, John D. Minna, Yoshinori Hasegawa. Evaluation of the oncogenic ability of EML4-ALK to transform human bronchial epithelial cells (HBECs). 15th World Conference on Lung Cancer 27-31 Oct 2013. Sydney, Australia.

(2) Yoshida K, Sato M, Hase T, Momen Elshazley, Yamashita R, Usami N, Taniguchi T, Yokoi K, Kondo M, Girard L, Minna J, Hasegawa Y. TIMELESS IS OVEREXPRESSED IN LUNG CANCER AND ITS KNOCKDOWN INDUCES APOPTOSIS AND CHEMOSENSITIZATION IN LUNG CANCER CELLS. 5th Asia Pacific Lung Cancer Conference. Hilton Fukuoka Sea

Hawk hotel, Fukuoka. 26-28 Nov 2012

(3) 柳澤聖、宇佐美範恭、小野健一郎、近藤征史、長谷哲成、加藤省一、八木香澄、堀田直恵、中村英男、長谷川好規、横井香平、高橋隆. プロテオミクス解析による悪性胸膜中皮腫バイオマーカー群の同定. 2012年9月21日第71回日本癌学会学術総会 さっぽろ芸文館 札幌

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長谷 哲成 (Hase Tetsunari)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30621635

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし