

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791467

研究課題名(和文) 肺がん幹細胞維持における新規幹細胞分子SMCPの機能解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of lung cancer stem cell related gene, SMCP

研究代表者

高橋 あかり (TAKAHASHI, Akari)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80457697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、治療抵抗性を示す肺がん幹細胞の解析を進めた。Side population (SP)法により、高い造腫瘍能を有する肺がん幹細胞を分離し、遺伝子解析を行った結果、SMCPという精巢に発現する分子が肺がん幹細胞に発現することを見出した。また、遺伝子過剰発現およびノックダウンによりSMCPの機能解析を行った結果、SMCPは肺がん幹細胞の造腫瘍能に関わることを見出した。当該結果は、SMCPが治療抵抗性肺がん幹細胞に対する標的分子となる可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：We isolated lung cancer stem-like cells(CSCs)/cancer-initiating cells(CICs) by side population assay. Transcriptome analysis revealed that a novel cancer-testis gene SMCP is preferentially expressed in lung CSCs/CICs. Gene overexpression and gene knockdown assay using siRNAs revealed that SMCP has a role in the tumorigenicity of lung CSCs/CICs. These observations indicate that novel cancer testis gene SMCP might be a promising target for CSC/CIC-targeting therapy.

研究分野：腫瘍学

キーワード：肺がん がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は、(1)高い造腫瘍能、(2)自己複製能、(3)多分化能を有する細胞群と定義される。また、がん幹細胞は 休止期にある、トランスポーター分子の発現が高い、抗アポトーシス分子 (IAP) の発現が高い、活性酸素が低い等の機序により、化学療法や、放射線療法、あるいは分子標的治療に対して抵抗性を示す事が示されている。これらの性質を有する為、がん幹細胞は治療後の再発や、遠隔転移といったがん患者の予後を直接左右するイベントに関わると考えられている。しかしながら、がん幹細胞の幹細胞性を維持する分子機構については不明な点が多い。

申請者らは、肺がん幹細胞を Hoechst33342 色素を用いて、side population (SP) 細胞として分離するのに成功した (Nakatsugawa, Takahashi et al. Lab invest 2011)。SP 細胞は main population (MP) 細胞と比較して、造腫瘍能が約 100 倍高く、がん幹細胞が濃縮された分画である事が示された。SP 細胞において高い造腫瘍能を示すメカニズムを解明するために、申請者らは、SP 細胞と MP 細胞との遺伝子発現の差異を DNA マイクロアレイにてスクリーニングした。その結果、SP 細胞に特異的に発現する分子として SOX2 および SMCP を同定した (Nakatsugawa, Takahashi et al. Lab invest 2011, 未発表データ)。

SOX2 は、iPS 細胞を作製する際に必要な因子として知られる山中 4 因子の一つでもあり、正常の幹細胞にも発現する分子である。申請者らは SOX2 の肺がん幹細胞における分子機構の解析を進めた結果、SOX2 が肺がん幹細胞の維持に関わり、その結果、造腫瘍能に関わる事を明らかにした (Nakatsugawa, Takahashi et al, Lab Invest 2011)。しかしながら、SOX2 分子の発現がどのようにして肺がん幹細胞で誘導されるか等、不明な点も多い。

SMCP は、正常臓器では精巣にのみ発現する分子であるが、肺がん幹細胞にも異所性に発現することがあきらかとなった。さらに、トランスクリプトの解析を RACE 法にて詳細に検討した結果肺がんに発現する SMCP はスプライシングバリエーションであり、肺がんでは精巣と異なったプロモーターにより発現制御されていることが示唆された (図 1)。申請者らは、肺がん幹細胞の分子機構解析をさらに進めるために、SMCP についても詳細な解析を行った。その結果、肺がん細胞株において、SMCP を過剰発現させると、SP 細胞分画が増

え、SOX2 等の幹細胞マーカー発現が誘導された。また、免疫不全マウス (NOD/SCID マウス) における造腫瘍能も増強された。逆に、SMCP を siRNA でノックダウンすると、免疫不全マウスでの造腫瘍能が抑制された。

以上の実験結果より、SMCP が幹細胞分子 SOX2 の発現を誘導し、その結果肺がん幹細胞の造腫瘍能を増強している事が示唆された。このことより、肺がん幹細胞における SMCP の発現制御機構、SOX2 発現誘導機構を詳細に解析することにより、肺がん幹細胞の造腫瘍能における分子メカニズムの解明につながると考えられる。

2. 研究の目的

肺がん幹細胞が高い造腫瘍を示す分子メカニズムを解明する為に、新規肺がん幹細胞関連分子をスクリーニングした結果精巣に発現する sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein (SMCP) を同定した。また、肺がん幹細胞に発現する SMCP はスプライシングバリエーションフォームであった。本研究期間中にバリエーションフォーム SMCP が肺がん幹細胞においてどのような制御機構により発現し、また、どのような役割をはたすか解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肺がん幹細胞の分離

がん幹細胞の分離法として、CD44, CD133 等の細胞表面マーカーによる分離、Side Population (SP) 法、Aldefluor 法、Sphere 培養法などが知られている。本研究において、SP 法によりヒト肺癌細胞株 (LHK2) よりがん幹細胞を分離した。

(2) 肺がん幹細胞のトランスクリプトーム解析

がん幹細胞のトランスクリプトーム解析を、非がん幹細胞を比較対象として cDNA マイクロアレイによりスクリーニングした。

トランスクリプトーム解析によりがん幹細胞特異的発現を示す候補分子群に関しては、正常臓器および他のがん細胞における発現を RT-PCR にて確認し、正常臓器における発現が無い、もしくは限定されており、がん幹細胞特異的発現を示す分子を選択した。

(3) SMCP mRNA の構造解析

SMCP mRNA の構造を解析するために、LHK2 細胞より精製した mRNA から、5' RACE 法および 3' RACE 法にて、SMCP mRNA の全長をクローニングし、構造を解析した。

(4) SMCP の機能解析

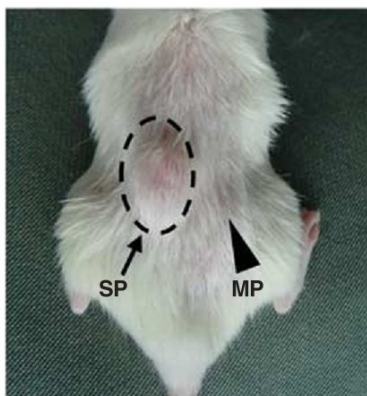
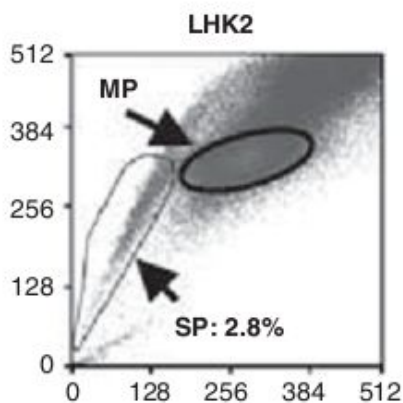
SMCP の機能解析を行うために、SMCP 特異的 siRNA をデザインした。また、SMCP のアミノ酸コーディング配列をクローニングし、レトロウイルスベクター (pMXs-puro) にサ

ブクローニングした。同コンストラクトを用いて、SMCP 過剰発現株を作成した。SMCP ノックダウンおよび過剰発現による形質の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) 肺がん幹細胞の分離

肺腺癌細胞株 LHK2 細胞を SP 法にて解析した。その結果約 1-3% 程度の SP 細胞を確認した。さらに SP 細胞は MP 細胞と比較して、免疫不全マウスにおいて高い造腫瘍能を示した(下図1)。すなわち LHK2 SP 細胞には、肺がん幹細胞が濃縮されていることが示唆された。



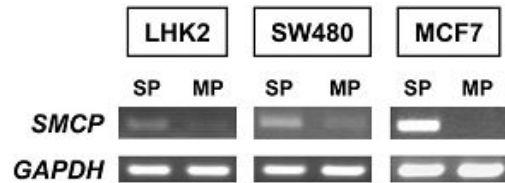
(2) 肺がん幹細胞のトランスクリプトーム解析

LHK2 SP 細胞および LHK2 MP 細胞から、mRNA を精製し、cDNA マイクロアレイ法にて遺伝子発現解析を行った。その結果、SMCP (Sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein) が、正常臓器では精巣のみに発現し、がん細胞では、がん幹細胞成分に優位に発現することを見出した(下図2)。正常臓器での発現が極めて限定的であるため、肺がん幹細胞標的療法をデザインする上で、魅力的な分子と考えられた。

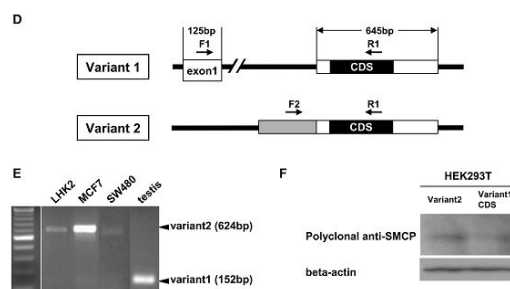


(3) SMCP mRNA の構造解析

SMCP mRNA 構造を 5'-RACE 法および 3'-RACE 法にて検討した。その結果、精巣で発現する SMCP(vt1)は、2個のエクソンからなる mRNA であるのに対して、がん幹細胞で

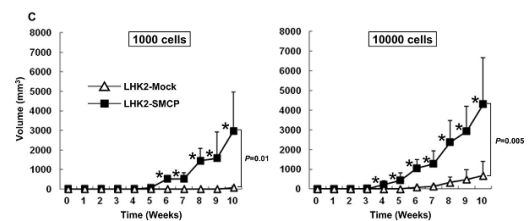


発現する SMCP はエクソン 2 の上流から転写されるバリエント (vt2) であることが証明した(下図3)

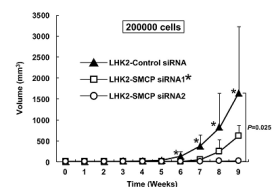


(4) SMCP の機能解析

SMCP の機能解析を行う為、LHK2 細胞に SMCP 遺伝子を導入し、SMCP 過剰発現 LHK2 細胞株を樹立した (LHK2-SMCP)。LHK2-SMCP は、野生型 LHK2 株と比較して高い造腫瘍能を示した(下図4)。



一方で、LHK2 細胞の SMCP を siRNA にてノックダウンすると、造腫瘍能の低下を観察した(下図5)。



これらの結果は、がん幹細胞で優位に発現するバリエント型 SMCP ががん幹細胞の維持に関わっている事を示唆する。SMCP は正常臓器での発現は精巣のみに限定されており、がん幹細胞標的療法をデザインする上で、SMCP は治療標的候補分子となり得ることが示唆された。

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 16 件)

1: Kasamatsu J, Takahashi S, Azuma M, Matsumoto M, Morii-Sakai A, Imamura M, Teshima T, Takahashi A, Hirohashi Y, Torigoe T, Sato N, Seya T. PolyI:C and mouse survivin artificially embedding human 2B peptide induce a CD4+ T cell response to autologous survivin in HLA-A*2402 transgenic mice. *Immunobiology*. 2015 Jan;220(1):74-82.

doi: 10.1016/j.imbio.2014.08.017. (査読あり)

2: Morita R, Nishizawa S, Torigoe T, Takahashi A, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Sokolovskaya A, Kochin V, Kondo T, Hashino S, Asaka M, Hara I, Hirohashi Y, Sato N. Heat shock protein DNAJB8 is a novel target for immunotherapy of colon cancer-initiating cells. *Cancer Sci*. 2014 Apr;105(4):389-95.

doi: 10.1111/cas.12362. (査読あり)

3: Takahashi A, Hirohashi Y, Torigoe T, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kochin V, Saijo H, Kubo T, Nakatsugawa M, Asanuma H, Hasegawa T, Kondo T, Sato N. Ectopically expressed variant form of sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein augments tumorigenicity of the stem cell population of lung adenocarcinoma cells. *PLoS One*. 2013 Nov 11;8(11):e69095.

doi: 10.1371/journal.pone.0069095. (査読あり)

4: Michifuri Y, Hirohashi Y, Torigoe T, Miyazaki A, Fujino J, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kobayashi J, Sasaki T, Takahashi A, Nakamori K, Yamaguchi A, Hiratsuka H, Sato N. Small proline-rich protein-1B is overexpressed in human oral squamous cell cancer stem-like cells and is related to their growth through activation of MAP kinase signal. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Sep13;439(1):96-102.

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.021. (査読あり)23954638.

5: Yasuda K, Torigoe T, Morita R, Kuroda T, Takahashi A, Matsuzaki J, Kochin V, Asanuma H, Hasegawa T, Saito T, Hirohashi Y, Sato N. Ovarian cancer stem cells are enriched in side population and aldehyde

dehydrogenase bright overlapping population. *PLoS One*. 2013 Aug 13;8(8):e68187.

doi: 10.1371/journal.pone.0068187. (査読あり)

6: Kuroda T, Hirohashi Y, Torigoe T, Yasuda K, Takahashi A, Asanuma H, Morita R, Mariya T, Asano T, Mizuuchi M, Saito T, Sato N. ALDH1-high ovarian cancer stem-like cells can be isolated from serous and clear cell adenocarcinoma cells, and ALDH1 high expression is associated with poor prognosis. *PLoS One*. 2013 Jun 6;8(6):e65158.

doi: 10.1371/journal.pone.0065158. (査読あり)

7: Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, Morita R, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Watarai K, Kondo T, Hirohashi Y, Sato N. Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens*. 2013 Jun;81(6):428-34.

doi: 10.1111/tan.12113. (査読あり)

8: Nishida S, Hirohashi Y, Torigoe T, Inoue R, Kitamura H, Tanaka T, Takahashi A, Asanuma H, Masumori N, Tsukamoto T, Sato N. Prostate cancer stem-like cells/cancer-initiating cells have an autocrine system of hepatocyte growth factor. *Cancer Sci*. 2013 Apr;104(4):431-6.

doi: 10.1111/cas.12104. (査読あり)

9: Morita R, Hirohashi Y, Suzuki H, Takahashi A, Tamura Y, Kanaseki T, Asanuma H, Inoda S, Kondo T, Hashino S, Hasegawa T, Tokino T, Toyota M, Asaka M, Torigoe T, Sato N. DNA methyltransferase 1 is essential for initiation of the colon cancers. *Exp Mol Pathol*. 2013 Apr;94(2):322-9.

doi: 10.1016/j.yexmp.2012.10.004. (査読あり)

10: Kameshima H, Tsuruma T, Kutomi G, Shima H, Iwayama Y, Kimura Y, Imamura M, Torigoe T, Takahashi A, Hirohashi Y, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Sato N, Hirata K. Immunotherapeutic benefit of

-interferon (IFN) in survivin2B-derived peptide vaccination for advanced pancreatic cancer patients. *Cancer Sci*. 2013 Jan;104(1):124-9.

doi: 10.1111/cas.12046. (査読あり)

11: Kiriya K, Hirohashi Y, Torigoe T,

Kubo T, Tamura Y, Kanaseki T, Takahashi A, Nakazawa E, Saka E, Ragnarsson C, Nakatsugawa M, Inoda S, Asanuma H, Takasu H, Hasegawa T, Yasoshima T, Hirata K, Sato N. Expression and function of FERMT genes in colon carcinoma cells. *Anticancer Res.* 2013 Jan;33(1):167-73. Doi 無し、(査読あり)

12: Takahashi A, Torigoe T, Tamura Y, Kanaseki T, Tsukahara T, Sasaki Y, Kameshima H, Tsuruma T, Hirata K, Tokino T, Hirohashi Y, Sato N. Heat shock enhances the expression of cytotoxic granule proteins and augments the activities of tumor-associated antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cell Stress Chaperones.* 2012 Nov;17(6):757-63. doi: 10.1007/s12192-012-0348-0. (査読あり)

13: Nishida S, Hirohashi Y, Torigoe T, Kitamura H, Takahashi A, Masumori N, Tsukamoto T, Sato N. Gene expression profiles of prostate cancer stem cells isolated by aldehyde dehydrogenase activity assay. *J Urol.* 2012 Jul;188(1):294-9. doi: 10.1016/j.juro.2012.02.2555. (査読あり)

14: Nishizawa S, Hirohashi Y, Torigoe T, Takahashi A, Tamura Y, Mori T, Kanaseki T, Kamiguchi K, Asanuma H, Morita R, Sokolovskaya A, Matsuzaki J, Yamada R, Fujii R, Kampinga HH, Kondo T, Hasegawa T, Hara I, Sato N. HSP DNAJB8 controls tumor-initiating ability in renal cancer stem-like cells. *Cancer Res.* 2012 Jun 1;72(11):2844-54. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3062. (査読あり)

15: Matsuzaki J, Torigoe T, Hirohashi Y, Kamiguchi K, Tamura Y, Tsukahara T, Kubo T, Takahashi A, Nakazawa E, Saka E, Yasuda K, Takahashi S, Sato N. ECRG4 is a negative regulator of caspase-8-mediated apoptosis in human T-leukemia cells. *Carcinogenesis.* 2012 May;33(5):996-1003. doi: 10.1093/carcin/bgs118. (査読あり)

16: Mori T, Nishizawa S, Hirohashi Y, Torigoe T, Tamura Y, Takahashi A, Kochin V, Fujii R, Kondo T, Greene MI, Hara I, Sato N. Efficiency of G2/M-related tumor-associated antigen-targeting cancer immunotherapy depends on antigen expression in the cancer stem-like population. *Exp Mol Pathol.* 2012

Feb;92(1):27-32.

doi: 10.1016/j.yexmp.2011.09.016. (査読あり)

〔学会発表〕(計 4件)

Takahashi A., Kochin v., Kanaseki T., Hirohashi Y., Kawami S., Suzuki Y., Torigoe T., Sato N. Identification of the naturally processed peptide derived from FAM83B that is specifically expressed in cancer initiating cells. 第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月13日、幕張メッセ、千葉県千葉市。

Takahashi A., Torigoe T., Hirohashi Y., Tamura Y., Tsukahara T., Kanaseki T., Saijo H., Asanuma H., Sato N. Variant form of SMCP increases tumor initiation capacity of the stem cell population of lung adenocarcinoma cells. 第72回日本免疫学会学術総会、2013年10月5日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市。

Takahashi A. Single cell cloning of cancer stem cells revealed of stinct plasticity among cancer cells. 第7回日本癌学会学術総会、2012年9月20日、ロイトン札幌、北海道札幌市。

Takahashi A. Moderate heat treatment enhances activities of human cytotoxic T lymphocytes. IHC0&JCTM The 11th International Congress of Hyperthermic Oncology (IHO)&The 29th Japanese Congress of Thermal Medicine (JCTM 合同大会、2012年8月29日、ハイアットリージェンシー京都、京都府京都市。

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: FAM83B由来腫瘍抗原ペプチド
発明者: 高谷あかり、金関貴幸、Kochin Vitaly、鳥越俊彦、廣橋良彦、佐藤昇志
権利者: 札幌医科大学、大日本住友製薬株式会社
種類: 特許
番号: PICT 出願 JP2014/76625
出願年月日: 2014年10月3日
国内外の別: 国外

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 あかり (TAKAHASHI, Akari)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：80457697