

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461170

研究課題名(和文) 肺がんの起源の違いに基づいたがん幹細胞を標的とした新たな治療標的の探索

研究課題名(英文) Establishment of new target therapy depending on the origin of lung cancer stem cell

研究代表者

熊野 恵城 (KUMANO, Keiki)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90396721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：系譜追跡法により幹細胞およびその子孫である分化細胞の追跡を行った。放射線による肺障害モデルにおいて、Bmi1陽性細胞からI型肺胞上皮およびII型肺胞上皮の両方が再生されることがわかった。Bmi1はSPC陽性のII型肺胞上皮細胞の一部に発現していることを確認した。Bmi1陽性細胞に変異型Krasを発現させたところ、1つの幹細胞からのclonalな腫瘍化を確認した。一方でII型肺胞上皮細胞特異的に変異型Krasを発現させたところ腫瘍化する前に死亡し、肺サーファクタントの過剰分泌による窒息が死因と考えられる。II型肺胞上皮細胞の内Bmi1を発現する細胞から肺がんが発生する可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Alveolar stem cells were tracked by lineage tracing system. Among stem cell markers, Bmi1 expressed in the some portion of alveolar type 2(AT2) cells (SPC(+) cells). After Radiation injury, both AT2 and AT1 cells were regenerated from Bmi1(+) cells. Mutant form of Kras (Kras G12D) caused the clonal lung cancer development from one Bmi1(+) cells. On the other hand, all mice died after mutant Kras was expressed in the SPC(+) alveolar type 2 cells within 8weeks. In this time point, the clonal expansion of SPC(+) cells were observed but no obvious lung cancer developed. This indicate that mice were dead due to the suffocation probably by the oversecretion of surfactant proteins. These results indicate lung cancer might be originated from the Bmi1(+) cells which are some part of AT2 cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺がん 幹細胞 系譜追跡 Bmi1

1. 研究開始当初の背景

近年、世界的に肺がんが増加し続けており、がんによる死亡の第一位となっている。その治療法の開発のために多くの取り組みがなされているが、依然として外科的切除が可能な初期のがんを除き、非常に治療が困難である。再発・転移の原因として近年提唱されているのが、がん幹細胞仮説である。がん幹細胞仮説は、腫瘍組織中にも、正常組織と同様な幹細胞が存在し、それらは自己複製する能力を持つとともに、少数存在するだけで元の腫瘍組織と同様の腫瘍を形成する能力をもつことが示されてきている。さらに、がん幹細胞は抗がん剤や放射線への抵抗性を有しているため治療の際に残存しやすく、再発・転移の原因となっていると考えられている。したがって、がん幹細胞を標的とした治療法を確立することで再発、転移のリスクの少ないがん治療へとつながることが期待される。そのためには、がん幹細胞の同定も含めがん幹細胞の研究の進んでいない腫瘍において、がん幹細胞の性状を分子レベルで理解することが重要であると考えられる。それにより、抗体療法のための癌幹細胞特異的抗原の同定、直接の治療標的となるがん幹細胞においてのみ活性化している分子の同定、がん幹細胞の自己複製や生存にのみかかわっている分子の同定により、がん幹細胞を選択的に死滅させる薬剤の開発が可能となる。

がん幹細胞の起源としては、もともと自己複製能を有していた正常幹細胞に遺伝子異常が起こった可能性と、自己複製能を有さない前駆細胞レベルに自己複製能を寄与する遺伝子異常が起こった可能性がある。例えば白血病幹細胞では、同じ遺伝子異常をもつものでも白血病幹細胞の発生起源の違いにより(造血幹細胞 or 分化した前駆細胞由来など)白血病の腫瘍特性(治療に対する反応性等)や遺伝子発現パターン等に違いが生じることが知られているが、肺がんなどの固形癌においては、がん幹細胞の発生起源の違いによる造腫瘍性の違いについての検討はほとんどなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

がん幹細胞の起源として、現在大きく分けて正常成体幹細胞に遺伝子異常が起こった可能性、自己複製能を有さない前駆細胞ないし分化細胞に遺伝子変異が起こり、それらの脱分化によって自己複製能を獲得するとする2つのモデルが提唱されている。こうしたがん幹細胞の起源の違いによって起こるがん幹細胞の性状を分子レベルで理解することにより、抗体療法の標的である癌幹細胞特異的細胞表面抗原の同定、がん幹細胞特異的シグナル伝達分子の同定、がん幹細胞の自己複製や生存に関わる分子群の同定等を行い、がん幹細胞を選択的に死

滅させる薬剤の開発を目指す。肺癌は予後の悪さからさらなる治療戦略の開発が急務であり、本研究は既存治療に抵抗性の肺癌の新たな治療開発を目指すものである。

3. 研究の方法

組織の定常状態の維持に対する幹細胞の役割を検討するには、一般に系譜追跡法により、組織への contribution を検討するのが最も確実な方法である。そのためには幹細胞を標識するマーカー遺伝子を同定する必要がある。成体幹細胞に発現しているマーカーの各種プロモーター下に Cre-ERT2 を発現する遺伝子改変マウスと Cre の DNA recombinase 活性により蛍光蛋白質を発現するレポーターマウス (Rosa26-rainbow など) を掛け合わせ、Tamoxifen を腹腔内投与することで Cre-ERT2 を活性化させ幹細胞を in vivo にて標識し、幹細胞およびその子孫である分化細胞の追跡を行う。長期に渡る観察により幹細胞の持つ自己複製能と多分化能を確認する。

上記のように肺の幹細胞を同定した後、Kras 変異を正常幹細胞あるいは分化肺胞上皮細胞に特異的に発現させることで、細胞系譜追跡法によって肺がん発症の起源を同定し、がん幹細胞が正常幹細胞に由来するのか、あるいは分化肺胞上皮細胞の脱分化によって発生するののかという根本的かつ重要な命題に取り組む。

誘導型 Kras 変異モデルマウス (Loxp-STOP-Loxp(LSL) KrasG12D) を以下のように用いる。

1) 幹細胞 (bronchio-alveolar stem cell (BASC) もしくはさらに上位に位置する幹細胞) 由来:

Bmi1-CreERT2, Lgr5 or Lgr6-CreERT2, c-kit-CreERT2, TERT-CreERT2 などにより幹細胞マーカーを発現する細胞に tamoxifen(TM) 誘導により Kras 変異を発現させる。

2) 分化した 2 型肺胞上皮細胞 (alveolar type 2(AT2) cell) 由来:

SPC (surfactant protein C) CreERT2 により AT2 細胞特異的に TM 誘導により Kras 変異を発現させる。

いずれのモデルにおいてもマルチカラーモザイクマウス (Rainbow マウス) を同時に用いて腫瘍の clonality を検討する。

4. 研究成果

成体幹細胞に発現しているマーカーの各種プロモーター下に Cre-ERT2 を発現する遺伝子改変マウスと Cre の DNA recombinase 活性により蛍光蛋白質を発現するレポーターマウス (Rosa26-rainbow など) を掛け合わせ、Tamoxifen を腹腔内投与することで Cre-ERT2 を活性化させ幹細胞を in vivo にて標識し、幹細胞およびその子孫である分

化細胞の追跡を行った。Bmi1 については放射線による肺障害モデルにおいて、I 型肺胞上皮および II 型肺胞上皮の両方が再生されることがわかり、これらは肺胞領域の幹前駆細胞であることがわかった。Bmi1 は SPC 陽性の II 型肺胞上皮細胞の一部に発現していることを確認した。また I 型肺胞上皮細胞のマーカーである Hopx を用いて同様な検討を行ったところ I 型肺胞上皮からも II 型肺胞上皮の再生が認められることが分かった。このことは肺胞領域において I 型肺胞上皮細胞と II 型肺胞上皮細胞の間に可塑性が認められと考えられる。

さらには Bmi1-CreERT2/Loxp-STOP-Loxp(LSL) KrasG12D を作製することにより幹細胞マーカーを発現する細胞に tamoxifen(TM)誘導により Kras 変異を発現させた。また同時に上記のマルチカラーモザイクマウス (Rainbow マウス) を同時に用いて腫瘍が 1 つの幹細胞から clonal に増殖していることを確認した。病理学的な観察により、Kras 変異単独でがん化はこのような clonal な増殖に引き続き TM 投与後 16 週以降で起こり始めるが、同時にがん抑制遺伝子である p53 や Rb を欠失させることで、clonal な増殖の増強とともに早期に (TM 投与後 8 週以降) がん化が起こることがわかった。一方で分化した II 型肺胞上皮細胞 (alveolar type 2(AT2) cell) 由来: SPC-CreERT2/LSL KrasG12D により AT2 細胞特異的に TM 誘導により Kras 変異を発現させたところ、AT2 細胞の clonality な増殖は認められたが、腫瘍化することなく現在のところ全例 TM 投与後 8w 以内で死亡しており、おそらく肺サーファクタントの過剰分泌による窒息が死因と考えられる。このことは II 型肺胞上皮細胞の内 Bmi1 を発現する細胞から肺がんが発生する可能性を示唆する。

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 9 件)

1. Yanai H, Atsumi N, Tanaka T, Nakamura N, Komai Y, Omachi T, Tanaka K, Ishigaki K, Saiga K, Ohsugi H, Tokuyama Y, Imahashi Y, Ohe S, Hisha H, Yoshida N, Kumano K, Kon M, Ueno H. Intestinal cancer stem cells marked by Bmi1 or Lgr5 expression contribute to tumor propagation via clonal expansion. *Sci Rep.* 2017 Feb 8;7:41838. doi: 10.1038/srep41838. 査読有
2. Tanaka T, Atsumi N, Nakamura N, Yanai H, Komai Y, Omachi T, Tanaka K, Ishigaki K, Saiga K, Ohsugi H, Tokuyama Y, Imahashi Y, Hisha H, Yoshida N, Kumano K, Okazaki K, Ueno H. Bmi1-positive cells in the lingual epithelium could serve as cancer stem cells in tongue cancer. *Sci Rep.* 2016 Dec 22;6:39386. doi: 10.1038/srep39386. 査読有
3. Ohe S, Tanaka T, Yanai H, Komai Y, Omachi T, Kanno S, Tanaka K, Ishigaki K, Saiga K, Nakamura N, Ohsugi H, Tokuyama Y, Atsumi N, Hisha H, Yoshida N, Kumano K, Yamazaki F, Okamoto H, Ueno H. Maintenance of sweat glands by stem cells located in the acral epithelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 466(3):333-8, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.022. 査読有
4. Iizuka H, Kagoya Y, Kataoka K, Yoshimi A, Miyauchi M, Taoka K, Kumano K, Yamamoto T, Hotta A, Arai S, Kurokawa M. Targeted gene correction of RUNX1 in induced pluripotent stem cells derived from familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy restores normal megakaryopoiesis. *Exp Hematol.* 43(10):849-57, 2015. doi: 10.1016/j.exphem.2015.05.004. 査読有
5. Tanaka K, Kumano K, Ueno H. Intracellular signals of lung cancer cells as possible therapeutic targets. *Cancer Sci.* 106(5):489-96, 2015. doi: 10.1111/cas.12643. 査読有
6. Komai Y, Tanaka T, Tokuyama Y, Yanai H, Ohe S, Omachi T, Atsumi N,

- Yoshida N, Kumano K, Hisha H,
Matsuda T, Ueno H. Bmi1 expression in
long-term germ stem cells. Sci Rep.
4:6175-6186, 2014. doi:
10.1038/srep06175. 査読有
7. Hosoi M, Kumano K, Taoka K, Arai S,
Kataoka K, Ueda K, Kamikubo Y,
Takayama N, Otsu M, Eto K, Nakauchi
H, Kurokawa M. Generation of induced
pluripotent stem cells derived from
primary and secondary myelofibrosis
patient samples. Exp Hematol.
42:816-25, 2014. doi:
10.1016/j.exphem.2014.03.010. 査読有
8. Kobayashi CI, Takubo K, Kobayashi H,
Nakamura-Ishizu A, Honda H, Kataoka
K, Kumano K, Akiyama H, Sudo T,
Kurokawa M, Suda T. The IL-2/CD25
axis maintains distinct subsets of chronic
myeloid leukemia-initiating cells. Blood.
123:2540-9, 2014. doi:
10.1182/blood-2013-07-517847 査読有
9. Kagoya Y, Yoshimi A, Kataoka K,
Nakagawa M, Kumano K, Arai S,
Kobayashi H, Saito T, Iwakura Y,
Kurokawa M. Positive feedback between
NF- κ B and TNF- α promotes
leukemia-initiating cell capacity. J Clin
Invest. 124:528-42, 2014. doi:
10.1172/JCI68101. 査読有

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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
熊野恵城(KUMANO, Keiki)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90396721

(2)研究分担者
なし()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし()

研究者番号：

(4)研究協力者
なし()