

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：82606  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2014～2016  
 課題番号：26861134  
 研究課題名(和文) ヒト終末呼吸ユニット(TRU)上皮幹細胞分離・培養と肺腺癌発がんメカニズムの解明  
  
 研究課題名(英文) Isolation and culture of human terminal respiratory unit epithelial stem cells and elucidation of underlying tumorigenesis mechanisms of lung adenocarcinoma  
  
 研究代表者  
 山田 健二 (Yamada, Kenji)  
  
 国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・外来研究員  
  
 研究者番号：70645069  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：末梢肺に発生するTRU型肺腺癌は、非喫煙者・EGFR変異例が多いことなどが近年の研究でわかってきました。このタイプの肺癌は禁煙による予防効果が期待できないため、その本態解明と予防・根治法の開発が急務です。本研究ではこれまで長期培養が困難であったTRU型肺腺癌の起源細胞と想定されるヒト正常TTF-1陽性細胞の培養法を確立し、これまでほとんど認識されていなかったTTF-1/p63共陽性という特徴的な細胞を同定し、その性質の一部を明らかにしました。私はこの細胞をTRU上皮幹細胞かつTRU型肺腺癌の起源細胞と捉えることで、これまで明らかにされてきたTRU型肺腺癌の特徴をうまく説明できると考えています。

研究成果の概要(英文)：Recent studies revealed that lung adenocarcinoma originates in terminal respiratory unit (TRU-type ADC) is prevalent among non-smokers and frequently harbors driver oncogenic gene mutations represented by EGFR mutation. Anti-smoking campaigns are less effective in preventing this type of adenocarcinoma, therefore the development of new strategies for prevention or eradication is needed. In this study, I modified a recently introduced cell culture method and succeeded to establish two types of TTF-1 positive normal human TRU epithelial cells. One is TTF-1/p63 double-positive (DP) and the other is TTF-1 single-positive (TTF-1 SP). I partially characterized the former cells that have been underrecognized to date. I propose that the DP cells are TRU-type epithelial stem cells and the cells-of-origin of TRU-type ADC. This concept could explain some characteristics of TRU-type ADC from the point of view of cellular mechanisms.

研究分野：診断病理学、実験病理学、呼吸器病学、分子細胞生物学

キーワード：肺癌 TRU-type 肺腺癌 TTF-1 p63 組織幹細胞 培養法 Wntシグナル 発がんモデル

1. 研究開始当初の背景

肺癌の多くが喫煙との強い因果関係があることが知られているが、近年、終末呼吸ユニット(terminal respiratory unit: TRU)に発生する肺腺癌の一部に、「非喫煙者・アジア人・女性に多い、EGFR 変異例が多い、TTF-1(thyroid transcription factor-1)陽性」などに特徴づけられる一群が存在することが明らかになった。この一群は禁煙による発がん予防効果が期待できないことから、その本体解明は急務である。正常のヒト肺 TRU を構成する Club 細胞、II 型肺胞上皮細胞が TTF-1 陽性であることから、TRU-type の肺腺癌の起源細胞として、これらの細胞への分化能を有する TRU 上皮幹細胞の存在が想定されているが、その実体については諸説があり、未だ明確な結論はでていない。

2. 研究の目的

TRU 上皮幹細胞を分離培養し、解析することで、TRU-type の肺腺癌の発生機構やその生物学的特徴の理解を深める。

3. 研究の方法

(1) TTF-1 陽性細胞の分離・培養

① 新規培養法の開発

提供者同意および国立がん研究センター倫理審査委員会の承認を得て、国立がん研究センター中央病院にて外科的に切除された肺の非腫瘍部余剰組織から TRU を構成する TTF-1 陽性細胞の分離・培養を試みた。様々な種類の細胞が含まれる細胞分離直後の初代培養細胞から TTF-1 陽性細胞を優位に増殖・維持するために、feeder 細胞、種々の培地および添加物、酸素濃度などの条件検討を行った。

② TTF-1 陽性細胞の single cell cloning と各クローンの TTF-1/p63 の発現解析

FACS により single cell cloning を行い、TTF-1 陽性の初代培養細胞クローンを複数作製し、二重蛍光免疫染色およびウエスタンブロットで各クローンの TTF-1 および p63 の発現状態を解析した。

③ ヒト成体肺 TRU における TTF-1/p63 共陽性細胞の同定 (蛍光二重免疫染色)

(2) 幹細胞性維持に必要な niche の解明

① 培地添加因子が telomerase 活性に与える影響の評価 (TRAP assay)

② 培地添加因子が colony 形成能に与える影響の評価

③ ヒト肺 TRU における Wnt および TGF-β シグナル関連分子発現細胞の同定 (in situ hybridization)

(3) TTF-1 陽性細胞を用いた TRU-type 肺腺癌モデルの作製

① TTF-1 陽性不死化細胞株の作製

TERT の導入により TTF-1 陽性不死化細胞株を作製した。

② TTF-1/p63 共陽性細胞と TTF-1 単独陽性細胞

の EGF 依存性増殖の解析

③ TTF-1 陽性不死化細胞株への肺腺癌 driver oncogene の導入と免疫不全マウスへの移植

4. 研究成果

(1) TTF-1 陽性細胞の分離・培養

肺の発生開始時に前方前腸に TTF-1 の発現を誘導するのに Wnt シグナルが決定的な役割を果たすという事実から、Wnt3A と R-Spondin1 の conditioned medium の添加を試みた。ヒト胎児肺間葉系細胞 (IMR-90) feeder と ROCK 阻害剤 (Y-27632)、Wnt3A と R-Spondin1 の conditioned medium を用いた新規培養法により、従来長期培養が困難であったヒト TRU 由来 TTF-1 陽性細胞の培養に成功し (図 1、図 2)、2 種類の TTF-1 陽性細胞が含まれていることが明らかとなった (図 2、3)。1 つは当初から分離を目指していた TTF-1 単独陽性 (p63 陰性) 細胞、もう一つは TTF-1/p63 共陽性という、これまであまり認識されてこなかった形質を示す細胞であった。

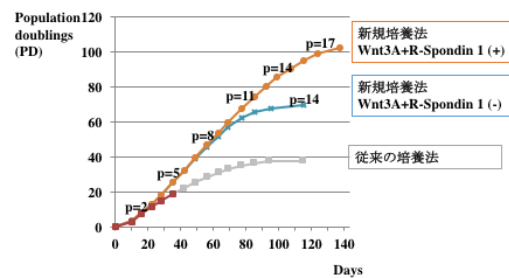


図1 各培養条件下でのヒト末梢肺由来初代培養細胞のgrowth curve  
従来の肺胞上皮専用培地として市販されている無血清培地(AEpiCM)で培養した場合、上皮細胞はPD20程度で増殖を停止し(図中の赤、四角)、その後は間葉系細胞に置き換わった(図中の灰色、四角)。ヒト胎児肺間葉系細胞フィーダー(IMR-90 feeder)とROCK阻害剤(Y-27632)とF-mediumを用いた新規培養法では、複製限界(PD60程度)まで上皮細胞を培養可能であった(図中の青、×)。さらにWnt3AとR-spondin1のconditioned medium (WR)を添加することで、複製限界を越え、PD100程度まで上皮細胞を培養可能であった(図中の橙、丸)。

Population doublings(PD):初代培養から培養中の細胞数が2倍に増加した回数  
p: passage

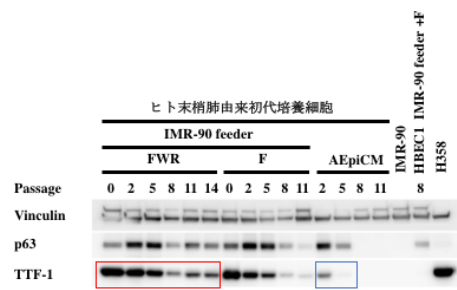


図2 3種類の培養条件下で培養したヒト末梢肺由来細胞のTTF-1/p63発現  
従来の培養法(AEpiCM)ではpassage 2までしかTTF-1陽性細胞の培養ができず、passage 5ではp63陽性細胞が主体となり、その細胞も増殖停止し、passage 8までには完全に間葉系細胞に置き換わった。IMR-90 feederとF mediumを用いた新規培養法では、長期にわたりTTF-1陽性細胞が培養維持されており、特にWRを添加した条件では、passage 14でもTTF-1陽性細胞が維持されていた。  
F, F medium; FWR, F medium + Wnt3A+R-Spondin1 conditioned medium

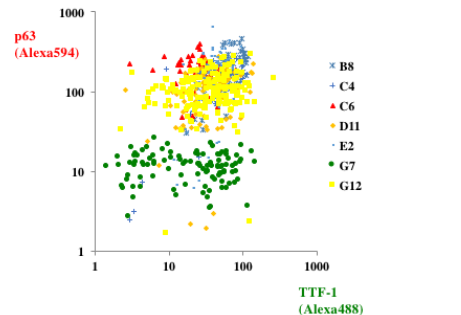


図3 Single cell cloningしたヒト末梢肺由来初代培養細胞のTTF-1/p63蛍光免疫染色とArrayScan®による解析  
 96-well plateにsingle cell sortingし、colonyを形成したヒト末梢肺由来初代培養細胞に対し、TTF-1/p63の蛍光二重染色を施行後、ArrayScan®にて解析し、各細胞のTTF-1、p63の発現強度を各クローン毎にplotした(図には7クローンのみplotした)。その結果、細胞形態的差異とも各クローン、少なくとも2種類のTTF-1陽性クローンは存在することが明らかとなった。  
 1) TTF-1/p63 共陽性 TTF-1(+)/p63(+) → 6クローン: B8, C4, C6, D11, E2, G7, G12  
 2) TTF-1単独陽性: TTF-1(+)/p63(-) → 1クローン: G7

p63 はヒト肺においては気道上皮基底細胞において発現しているが、TRUのClub細胞やII型肺胞上皮細胞では発現していない。そこでTTF-1/p63 共陽性という特徴的な形質を示す細胞がヒト成体肺において存在するかどうか調べたところ、TRU 入口部に相当する終末細気管支-呼吸細気管支・肺胞管移行部 (bronchio-alveolar duct junction: BADI)のClub細胞と密接に接して存在することがわかった(図4、5)。

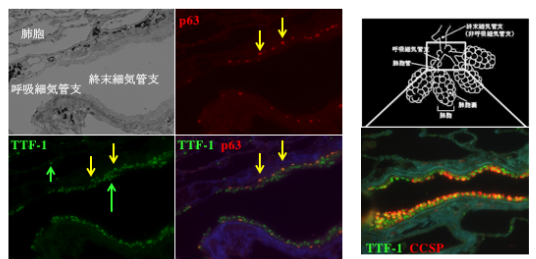


図4 (左) ヒト成体肺の細気管支・肺胞領域におけるTTF-1/p63 共陽性細胞の同定  
 蛍光二重免疫組織染色(TTF-1/p63)。細気管支肺胞管移行部(BADI)に存在する基底細胞様細胞ではp63に加えてTTF-1も発現している(黄色矢印)。この細胞とTTF-1(+)/p63(-)のClub細胞(緑長矢印)は密接に接して存在している。肺胞領域のTTF-1(+)/p63(-)細胞はII型肺胞上皮細胞(緑短矢印)である。  
 図5 (右) ヒト成体肺の細気管支・肺胞領域におけるTTF-1/p63共陽性基底細胞様細胞とTTF-1(+)/p63(-) Club細胞の関係  
 蛍光二重免疫組織染色(TTF-1/CCSP)。細気管支肺胞管移行部(BADI)に存在する基底細胞様細胞にはTTF-1が発現している。Club細胞に特異的に発現するCCSPの染色(赤色)を見ると、TTF-1/p63共陽性基底細胞様細胞とClub細胞が密接に関連して存在していることがわかる。

TTF-1/p63 共陽性細胞を single cell cloning し、それから生じた colony を subcloning すると TTF-1/p63 共陽性クローンは TTF-1/p63 共陽性クローンの他に TTF-1 単独陽性クローンへと分化することがわかった(図6)。

(2) 幹細胞性維持に必要な niche の解明  
 TTF-1/p63 共陽性細胞は in vitro で Wnt3A と R-Spondin1 の conditioned medium の添加により 100 PDs (population doublings) を超えるまで培養・維持できたが、これらの添加がない場合、テロメア長の短縮に起因すると考えられる通常の複製限界相当の 60 PDs 程度で細胞増殖が停止した。そこで、Wnt3A+R-Spondin1 が telomerase 活性に与える影響を TRAP assay で解析したところ、Wnt3A+R-

Spondin1 添加により TTF-1/p63 共陽性細胞の telomerase 活性が高く維持されていることがわかった(図7)。

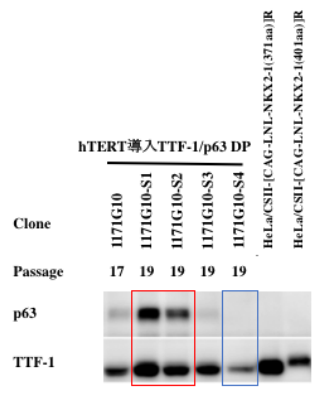


図6 hTERT導入不死化TTF-1/p63 DPクローン(1171G10クローン)のサブクローンのウエスタンブロット  
 hTERT導入HLCs2Nのsingle cell cloningにより樹立したTTF-1/p63 DPクローン(1171G10)培養中に出現した細胞形態の異なるクローンをクローニングシリンダーによりサブクローニングし、ウエスタンブロットで解析した。その結果、TTF-1/p63 DPサブクローン(S1, S2)の他にp63の発現が極めて低下したTTF-1陽性クローン(S3)および、TTF-1 SPクローン(S4)が出現することがわかった。

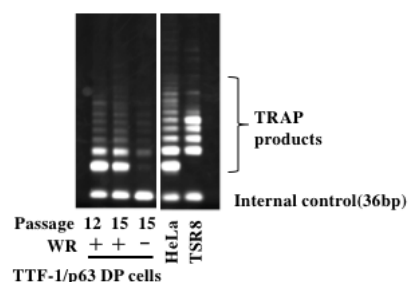


図7 Wnt+R-Spondin1によるtelomerase活性の変化 (telomeric repeat amplification assay, TRAP assay)  
 WRによりtelomerase活性が維持されていることがわかった。  
 WR: Wnt3A/R-spondin1 conditioned medium

また I 型 TGFβ 受容体阻害物質である A83-01 の添加によって TTF-1/p63 共陽性細胞の colony 形成能が亢進し、培養維持に重要であるという実験結果を得たが、2016年に TGF-β と BMP の両 SMAD シグナルの阻害により p63 陽性基底細胞の培養中の自然分化が抑制され、基底細胞が長期培養維持できることが他グループから報告された {Mou, H. et al., Cell Stem Cell 19, 217-231 (2016)}。

このように TTF-1/p63 共陽性細胞の培養維持に、Wnt シグナルの活性化と TGF-β/BMP シグナルの阻害が重要であることから、ヒト成体肺の TTF-1/p63 共陽性細胞の niche においても、Wnt リガンドの供給細胞や、TGF-β/BMP シグナルの阻害分子の供給細胞が存在するのではないかと考え、in situ hybridization 法を用いて Wnt シグナル、TGF-β/SMAD シグナル関連分子の発現細胞の同定を試みたが、実験に成功せず、現在のところヒト成体肺におけるこれらの niche 細胞の同定には至っていない。Probe の作製あるいは検出のテクニカルな問題と考えられるが、トラブルシューティングには多くの時間を要することからその他

の実験を優先させることにした。

### (3) TTF-1 陽性細胞を用いた TRU-type 肺腺癌モデルの作製

hTERT 導入により不死化させた TTF-1 単独陽性および TTF-1/p63 共陽性細胞それぞれについて細胞増殖の EGF 依存性を検討した。その結果、TTF-1/p63 共陽性細胞は EGF に増殖を依存していなかったが、TTF-1 単独陽性細胞はその増殖を EGF に完全に依存していることがわかった(図8)。

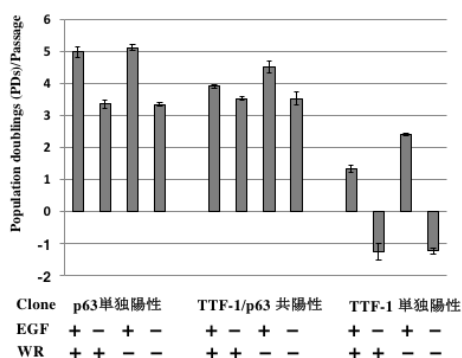


図8 3種類の不死化細胞のEGF依存性の検討

EGFが含まれる通常のFWR培地で培養してきたhTERT導入p63 単独陽性クローン、TTF-1/p63 共陽性クローン、TTF-1 単独陽性クローンの3種類の細胞を継代時にEGFとWRの有無を組み合わせた4種類の条件下で培養し、1 passage中のPD増加を播種細胞数、回収細胞数から算出した。TTF-1 単独クローンのみ増殖を完全にEGFに依存していることが明らかとなった。

WR, Wnt3A/R-spondin1 conditioned medium

このような性質をもつ hTERT 導入 TTF-1 単独陽性および TTF-1/p63 共陽性細胞を元に EGFR<sup>L858R</sup>、EML4-ALK などの肺腺癌の driver oncogene を誘導性に発現できる細胞をレトロ/レンチウイルスを用いて作製した。これまでの他の初代培養上皮細胞での研究結果から単独の oncogene のみでは腫瘍形成が難しいと予想されたため、これらの driver oncogene に加えて HPV16 型の E6/E7 と cMYC を同時に発現誘導できる遺伝子カセットを導入した。予備実験として、TTF-1/p63 共陽性細胞に HPV16E6E7-cMYC-EGFR<sup>L858R</sup> を TTF-1 単独陽性細胞に HPV16E6E7-cMYC-EML4/ALK を導入し免疫不全マウスの腎被膜下へ移植した。その結果、前者では生着を認めるものの、腫瘍形成は認められなかった。後者では、誘導性に発現させたがん遺伝子依存的に腫瘍形成したが、低分化な充実性腫瘍であり、ヒトの TTF-1 陽性

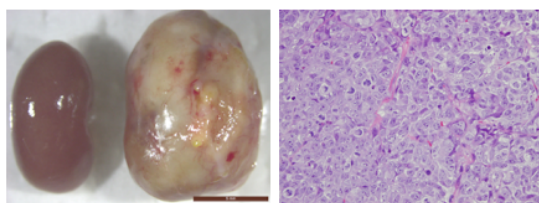


図9 不死化TTF-1単独陽性細胞にHPV16E6E7-cMYC-EML4/ALKを導入した細胞の免疫不全マウスへの移植

hTERTを導入し不死化したTTF-1単独陽性(TTF-1+/p63-)細胞に対し、HPV16E6E7-cMYC-EML4/ALKをDox依存性発現制御できる遺伝子カセットを導入、免疫不全マウス腎被膜下へ移植した。HPV16E6E7-cMYC-EML4/ALK依存性にマウスの腎被膜下へ移植した細胞は腫瘍を形成したが、組織像は低分化な充実性腫瘍であり、TTF-1陽性のヒト末梢型肺腺癌の組織像を再現することはできなかった。

末梢型肺腺癌に類似する組織像は得られなかった(図9)。発がん促進のため HPV16E6E7 と cMYC も同時に高発現させたために低分化な腫瘍が形成されたものと考えられた。そのため本研究の最終年度は EML4-ALK のみを誘導性に発現させるためのレンチウイルスを作製し、次期研究課題(16K21648)にて再度細胞に導入し、ヒト臨床肺癌検体に見られる TRU-type の肺腺癌に類似する腫瘍が形成されるかどうかを検討する方針とした。

## 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2件)

1. Inagawa Y, Yamada K, Yugawa T, Ohno S, Kiyono T, et al. A human cancer xenograft model utilizing normal pancreatic duct epithelial cells conditionally transformed with defined oncogenes. *Carcinogenesis*. 2014 Aug;35(8):1840 - 6. (査読あり)

2. Yamada K, Maeshima AM, Tsuta K, Tsuda H. Combined high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung: Clinicopathological and immunohistochemical study of 34 surgically resected cases. *Pathol Int*. 2014 Jan;64(1):28-33. (査読あり)

[学会発表] (計2件)

- 山田健二、TTF-1/p63 double-positive cells are candidate cells-of-origin of TRU-type lung adenocarcinoma、第104回日本病理学会総会、2015年5月1日、名古屋国際会議場
- 山田健二、The newly identified TTF-1/p63 double-positive cells is a candidate for cell-of-origin of TRU-type lung adenocarcinoma、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日、パシフィコ横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 健二 (YAMADA, Kenji)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・外来研究員

研究者番号：70645069