

論文概要

○ 論文題目

Identification and characterization of the TTF-1/p63 double-positive cells from terminal respiratory unit of the human lung.

(ヒト肺終末呼吸ユニットにおける TTF-1/p63 共陽性細胞の同定とその特徴)

○ 指導教員

人間総合科学研究科 生命システム医学専攻
野口雅之 教授

筑波大学大学院人間総合科学研究科 生命システム医学専攻

山田 健二

目的：

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 TTF-1 (thyroid transcription factor-1) 陽性の肺腺癌は、喫煙歴のないアジア人女性に多く、EGFR 変異陽性例が多いなどの特徴を有することが明らかになった。TRU-type 肺腺癌と呼ばれるこの一群は病因が不明であり、禁煙による予防効果が期待できないことから、その本態解明は急務であるが、どのような細胞からどのような分子メカニズムで発がんし、浸潤癌へ進展するののかについては未解明な部分が多い。そこで私は TRU-type 肺腺癌の起源細胞と想定される TTF-1 陽性のヒト正常組織幹細胞の体外培養法の開発を通じて、TRU-type 肺腺癌の本態解明を目指すことを目的として研究を進めた。

対象と方法：

ヒト正常末梢肺組織から細胞の分離・培養を試みた。培養法は 2012 年に Georgetown 大学のグループから報告された培養法を応用し、Feeder(F)、F medium(F)、ROCK 阻害剤である Y-27632(Y) の頭文字を取って FFY 法と呼ぶことにした。さらに、TTF-1 陽性細胞を優位に増殖させることを目的として、Wnt3A と R-spondin1 の conditioned medium(WR) の添加を試みた (FFY-WR 法)。FFY 法、FFY-WR 法、従来の肺胞上皮専用無血清培地を用いた培養法で増殖する上皮細胞の growth curve の作成を行い、培養経過中の細胞における TTF-1/p63 発現について、ウエスタンブロットと免疫染色で検討した。また、WR が telomerase 活性に与える影響については TRAP assay で検討した。さらに遺伝子非導入細胞および TERT 導入による不死化細胞を single cell cloning し、TTF-1/p63 発現の検討、サブクローン解析、EGF 依存性の検討を行った。

結果：

FFY-WR 法により、これまで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た。想定外のことに、主として増殖する細胞は TTF-1/p63 共陽性 [TTF-1/p63 DP (double positive)] という特徴的な形質を示していた。Single cell cloning の結果、増殖速度が緩徐である TTF-1(+)/p63(-) の TTF-1 single positive (TTF-1 SP) クローンも存在しており、subcloning の結果、TTF-1 SP クローンは TTF-1/p63 DP クローンから生ずることが明らかになった。また TTF-1 SP クロー

ンは増殖を EGF に完全に依存していた。ヒト成体肺において TTF-1/p63 DP 細胞は TRU の入口部である終末細気管支・肺胞管移行部に限局して存在し、Club 細胞と密接に接して存在していることが明らかになった。また、*in vitro* において TTF-1/p63 DP 細胞は WR 添加により telomerase 活性が維持され、通常の複製限界を大きく超えて 100 population doublings 以上まで培養・維持可能であった。

考察：

Georgetown 大学のグループは feeder 細胞から分泌される液性因子が telomerase 活性を亢進させることで様々な組織の上皮細胞が複製限界を超えて無限培養できると報告しているが、その液性因子は明らかになっていない。本研究において、原法と feeder 細胞が異なる FFY 法では複製限界を超えられなかったが、WR 添加により telomerase 活性が亢進し、長期培養が可能となったことから、その液性因子は R-spondin を含む Wnt agonist の可能性がある。

TRU-type の肺腺癌は TTF-1 SP 細胞に由来すると考えられてきたが、新たに同定した TTF-1/p63 DP 細胞がその起源細胞と考えることで、これまで説明が難しかった、TTF-1/p63 共陽性が特徴である ALK 陽性肺癌の起源細胞、TRU-type の肺腺癌の罹患感受性遺伝子としての TP63、上皮内腺癌から浸潤癌に進展する際に高発現する p63 標的遺伝子などに細胞分化の観点からの新たな説明が可能となると考えられる。

さらに TTF-1 SP 細胞は増殖を EGF に完全に依存していたことから、TTF-1/p63 DP 細胞に生じた EGFR 変異は TTF-1 SP 細胞の自律性増殖をもたらすと考えられ、これを II 型肺胞上皮の自律性増殖と言い換えれば、TRU-type 肺腺癌の初期像の特徴そのものである。

結論：

新規培養法(FFY-WR 法)により 2 種類の TTF-1 陽性細胞の培養が可能となった。そのうち TTF-1/p63 共陽性細胞はこれまであまり認識されていなかった特徴的な細胞種であり、TRU-type 肺腺癌の起源細胞候補である。