

Title	癌細胞のストレス応答と新しい実験モデルの開発
Author(s)	遠藤, 洋子
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/26144
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

博 士 論 文 題 名

癌細胞のストレス応答と新しい実験モデルの開発

学位申請者 遠 藤 洋 子

目次

略語一覧	1
緒論	3
課題1. Caspase-3 を介したアポトーシスと浸潤シグナルのクロストーク	
<序1>	5
<実験方法1>	5
<結果1>	6
<考察1>	9
課題2 低酸素下 IGF 刺激による小胞体ストレスを介した細胞死の誘導	
<序2>	11
<実験方法2>	11
<結果2>	13
<考察2>	18
課題3. 新しい癌細胞初代培養系を用いた非小細胞肺癌の培養と Neuregulin-1/HER3応答性	
<序3>	21
<実験方法3>	22
<結果3> 3-1. CTOS法による肺癌初代培養系の確立	25
3-2. 肺癌CTOSの増殖に必須な増殖因子の探索	28
<考察3>	31
結論	33
謝辞	34
引用文献	35

<略語一覧>

VEGF: vascular endothelial growth factor

MDR: multidrug resistance

CTOS: cancer tissue originated spheroid

FBS: fetal bovine serum

BSA: bovine serum albumin

HRP: horseradish peroxidase

LPA: Lysophosphatidic acid

IAP: inhibitor of apoptosis

HIF1 α : hypoxia inducible factor 1

IGF: insulin-like growth factor

IGF-IR: IGF-I receptor

mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1

TSC: Tuberous Sclerosis Complex

4EBP1: eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1

S6K: S6 kinase

GADD153: growth arrest-and DNA damage-inducible gene 153

CHOP: CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein

ATF4: cyclic AMP-responsive element binding protein 2/ activating transcription factor 4

IgG: immunoglobulin G

PARP: poly (ADP-ribose) polymerase

PERK: eukaryotic translation initiation factor 2 α kinase3

eIF2 α : eukaryotic translation initiation factor 2 α

IGFBP: IGF binding protein

EGFR: Epidermal growth factor receptor

TKI: tyrosine kinase inhibitor

HBSS: Hank's balanced salt solution

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

GFR: growth factor reduced

NRG1: neuregulin 1

IC₅₀: Half maximal (50%) inhibitory concentration

EGF: epidermal growth factor

FISH: fluorescence in situ hybridization

FFPE: formalin-fixed, paraffin-embedded

CAF: cancer associated fibroblast

< 緒論 >

癌は無数の細胞増殖を特徴とする疾患であるが、細胞増殖を標的とした薬剤だけでは必ずしも根治には至らない。これは、癌細胞がストレス応答を行い、環境に適応して生き延びるからである。放射線治療や抗癌剤などの治療によるストレスの他、癌微小環境におけるグルコースの欠乏、低酸素、アシドーシス等も大きなストレス要因である。低酸素環境下における癌細胞は、さまざまな細胞応答を行うことで、そのストレスに対処しようとする。①血管新生による低酸素環境改善、②増殖の低下や代謝の変化による低酸素環境への適応、そして③浸潤、転移による低酸素環境からの逃避などが例として挙げられる(図1)。この癌のストレス応答を標的とした治療が試みられており、その一つが血管新生阻害薬である。癌細胞は活発に細胞分裂を繰り返すことで増大するが、その増殖速度に見合った酸素や栄養を得るため、血管網の構築が必要である。血管新生は、主にvascular endothelial growth factor (VEGF)によって促進されるが、現在用いられている血管新生阻害剤は主にVEGFの作用を阻害する薬剤である。新たな血管の誘導を阻害する結果、癌細胞は血管から酸素や栄養が得られなくなり、腫瘍の増大阻止や縮小効果が期待されている。VEGF阻害剤は、現在大腸癌、肺癌、乳癌で臨床的に使用されており、従来の抗癌剤との併用で一定の治療成績が得られている。一方で、血管新生阻害剤で治療された腫瘍は低酸素に陥ることが報告されている(Paez-Ribes 2009 Cancer Cell)。また、低酸素は癌細胞にmultidrug resistant(MDR) 遺伝子を誘導することが知られており、多剤耐性の一因となっている(Comerford 2002 Cancer Res)。このように、癌細胞のストレス応答を研究することは、癌の根治につながると期待される。本研究では、抗癌剤または低酸素というストレス存在下での癌細胞の浸潤能亢進や細胞死促進のメカニズムを検討した。

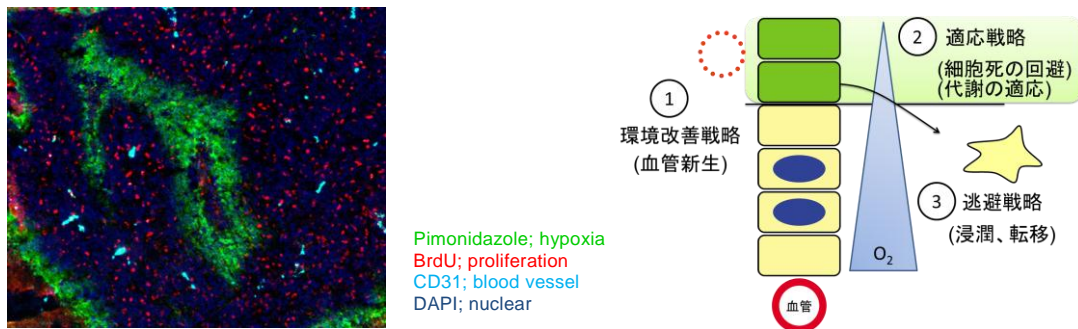


図1. 癌組織における低酸素領域と癌細胞の低酸素応答

- A) 膵臓癌細胞株AsPC-1のヌードマウス移植腫瘍の免疫組織学的染色。癌細胞の増殖(BrdU)に対して血管(CD31)の構築が不完全なため、低酸素領域(pimonidazol)が存在する。
- B) 低酸素下における癌細胞の生存戦略。低酸素領域における癌細胞は、①血管新生による環境改善、②細胞死の回避、代謝の適応などの環境適応、③浸潤、転移による逃避などの細胞応答を行う。

臨床腫瘍検体を利用した癌研究は、従来の病理組織学的解析に加えて、ゲノム解析、遺伝子発現解析、プロテオミクスなど、技術の進歩とともに膨大なデータが蓄積されつつある。しかし、これらのデータはいずれもサンプルを採取した時点のスナップショット的なデータであり、癌細胞の応答を研究する系が必

要である。癌のin vitro実験では多くの場合癌細胞株が使用されるが、癌細胞株は樹立の過程でクローンの選択が起こっており、さらに長年の血清入り培地中での継代によって遺伝子変異が蓄積していることから（Shoemaker 2006 Nat Rev Cancer）、臨床腫瘍組織の癌細胞とは異なる性質を示すことが多い。より臨床腫瘍に近い状態で癌の生物学的応答を研究するため、初代培養系の確立やマウス移植腫瘍モデルの確立が試みられてきた。しかし、いずれも成功率が低いことや、繊維芽細胞のコンタミネーションなどによって妨げられてきた。最近、我々は新しい癌細胞初代培養系の確立に成功した（Kondo 2011 PNAS）。本法では、癌細胞の細胞-細胞間接着を維持したまま大腸癌細胞をspheroid状で培養するもので、高純度の癌細胞を高い生存率で培養することが可能となった。我々は、このspheroid状の癌細胞塊をCancer Tissue-Originated Spheroid (CTOS)と名付けた。本研究では、このCTOS法を非小細胞肺癌に応用し、効率の良い肺癌初代培養系の確立を試みた。また、肺癌のin vitro培養に重要な増殖因子の同定を試みた。

課題 1. Caspase-3を介したアポトーシスと浸潤シグナルのクロストーク

<序 1>

癌組織中の癌細胞は、低酸素、アシドーシス、フリーラジカルの過剰産生など様々なストレスにさらされている。これらのストレスは細胞にアポトーシスを誘導するが、アポトーシス耐性機構を獲得した癌細胞は、このような微小環境下で生存することが可能である。実際、アポトーシスを伴わないCaspase-3の恒常的な活性化を示す癌細胞が存在する (Yang 2003 Cancer Res)。また、低酸素や抗癌剤、放射線治療などの亜致死的な刺激は、細胞に浸潤能を誘導することが報告されている (Imamura 1990 Cancer Res、Wild-Bode 2001 Cancer Res)。一見二つの独立した現象に見えるアポトーシスの誘導と浸潤能の亢進は、いずれもストレス微小環境内で観察される現象である。本研究では、ストレス環境下で活性化したCaspase-3が浸潤能の亢進に寄与するかどうかを検討した。

<実験方法 1>

(1) 細胞および培養方法

MM1細胞はラットhepatoma AH130の腹水より樹立した。MM1細胞は10%FBSを含むDMEMで培養し、低酸素 (1%O₂) またはエトポシド (VP-16) に暴露した。

(2) 浸潤アッセイ

ラット腹膜中皮細胞を35-mmディッシュにコンフルエントになるよう培養し、MM1細胞 2×10^5 個を中皮細胞の上に播種した。20時間後、中皮細胞の下へもぐりこんだMM1細胞の数を位相差顕微鏡にてカウントした。

マトリゲル浸潤アッセイは、5% マトリゲルでコートされたトランスウエルの上側チャンバーにMM1細胞 1×10^5 個を播種し、各リガンドおよび0.1%BSAを含む血清非含有培地を下側チャンバーに入れて培養した。16時間後、メンブレンをMay-Grunwald and Giemsa染色液で染色し、メンブレンの下側へ移動した細胞数を計測した。

(3) アポトーシスと細胞死アッセイ

核形態の観察はHoechst33342による染色にて行った。活性型Caspase-3の細胞染色は、Caspase-3 Intracellular Activity Assay Kit II (PhiPhiLux G2D2, Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA)を用いて行った。Caspase-3の活性はCPP32 Colorimetric Protease Assay Kit (Biovision, Mountain View, CA)を用いて測定した。

(4) イムノブロットと免疫細胞染色

ウエスタンブロットは常法に基づいて行った。一次抗体はCaspase-3、cleaved-Caspase-3 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)、ROCK1 (BD Transduction Laboratories, San Jose, CA)、 β -actin (clone AC-74, Sigma, St. Louis, MO)を使用した。二次抗体はhorseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-mouse IgGまたはgoat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, SA)を用いた。Focal adhesionの検出はanti-vinculin antibody (VIN-11-5, Sigma)を使用し、共焦点顕微鏡 (Radiance 2000, Bio-Rad, Hercules, CA)にて観察した。

(5) 試薬

VP-16は和光純薬株式会社 (大阪)より購入した。Y-27632およびC3はCalbiochemより、LPAはSigmaより購入した。Caspase阻害剤であるDEVDおよびzVADはペプチド研究所 (大阪)より購入した。

(6) rat-Caspase-3遺伝子のノックダウン

rat-Caspase-3遺伝子のノックダウンはレトロウイルスベクターpSuperRetro (Oligoengine, Seattle, WA)を用いたshRNAの導入により行った。

(7) 統計解析

実験は少なくともn=3以上で3回行い、平均値±標準偏差で示した。統計解析はGraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA)を用いてunpaired *t* test, one-way ANOVAを行い、 $P < 0.05$ を統計的有意差とした。

<結果 1>

ラットhepatoma腹水より樹立したMM1細胞を用いて、ストレス環境下におけるin vitro 浸潤アッセイを行った。アポトーシス誘導物質であるエトポシド (VP-16) 存在下もしくは低酸素下で培養すると、MM1細胞のラット腹膜中皮下への浸潤の亢進が認められた (図2A、B)。MM1細胞の細胞形態をvinculin染色にて観察したところ、VP-16処理によって細胞は紡錘形をとり、pseudopodiaおよびfocal adhesionの形成が観察された (図2C)。これは、浸潤誘導物質であるLPA処理後の細胞形態と類似していた。低酸素およびVP-16はいずれも細胞にアポトーシスを誘導する刺激であることから、我々は細胞死と浸潤形質の上昇が関連するかどうかを検討した。Caspase-3の活性化と核の形態を細胞染色にて観察したところ、高いCaspase-3活性を持つ細胞が必ずしもアポトーシスによる核断片化を起こさないことが判明した (図2D)。

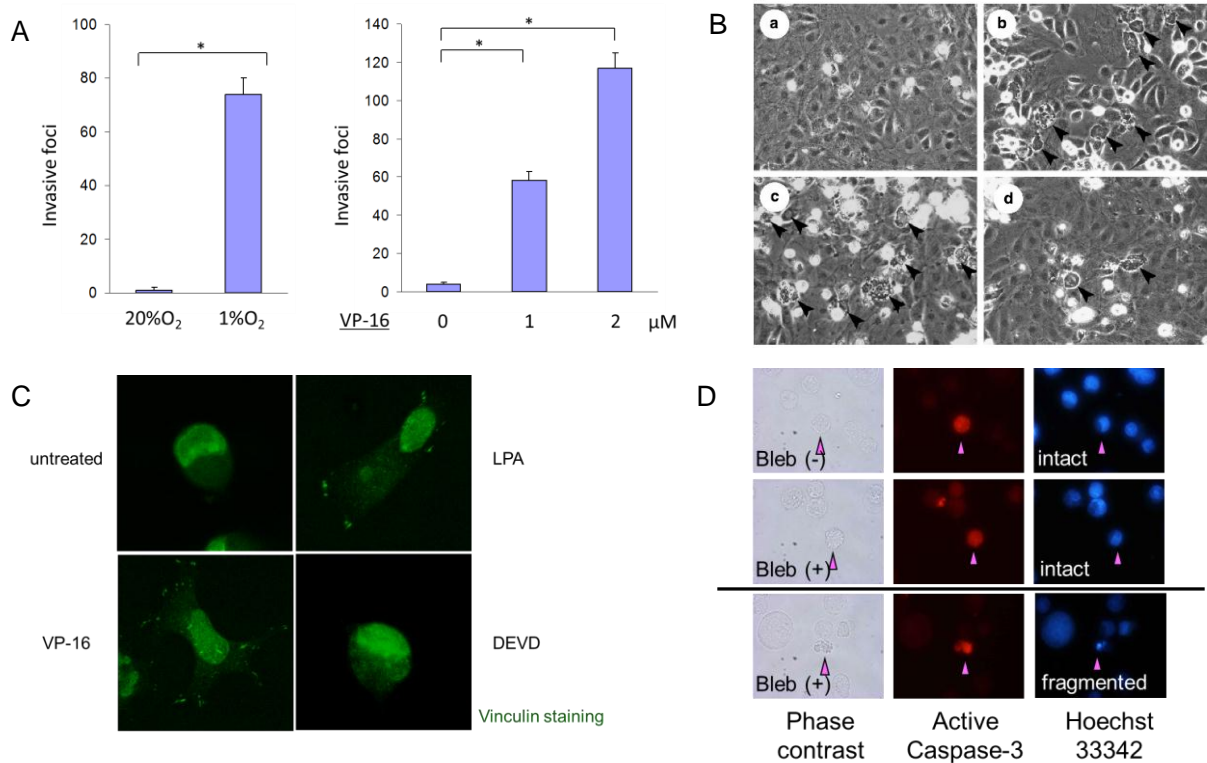


図2. VP-16および低酸素はMM1細胞に浸潤能を誘導する。

- A) ラットhepatoma腹水由来細胞株MM1細胞をラット腹膜中皮上に播種し、低酸素培養下(1%O₂)もしくはVP-16存在下で中皮下へ浸潤した細胞数を計測した。
- B) 浸潤アッセイの位相差像。(a)刺激なし、(b)LPA、(c)VP-16、(d)VP-16+DEVD。矢印:ラット腹膜中皮下へ浸潤したMM1細胞。
- C) MM1細胞のvinculin細胞染色。
- D) VP-16処理後24時間の位相差像(左)、Caspase-3の活性化(中央)およびhoeschst33342による核形態(右)の観察。Bleb; 細胞膜のBlebbingあり(+), または、なし(-)。

ストレス環境下での浸潤能の亢進のメカニズムを探るため、浸潤とcaspase-3活性を継時的に観察した。

VP-16 2μM存在下、もしくは低酸素下(1%O₂)でMM1細胞を培養すると、浸潤する細胞数とCaspase-3活性が相関して上昇した(図3A、B)。Caspase-3はアポトーシスを司るプロテアーゼであり、下流の様々な基質を開裂する(Woo 1998 Gen Dev)。しかし、アポトーシス以外にも、筋細胞の増殖と分化、サイトカインの成熟、細胞運動、受容体の内在化などにCaspase-3が活性化され機能を果たしているという報告がある(Algeciras-Schimnich 2002 Curr Opin Cell Biol)。癌細胞は一般的にアポトーシス耐性を獲得しているため、Caspase-3の活性化が浸潤能の亢進に寄与している可能性が考えられた。

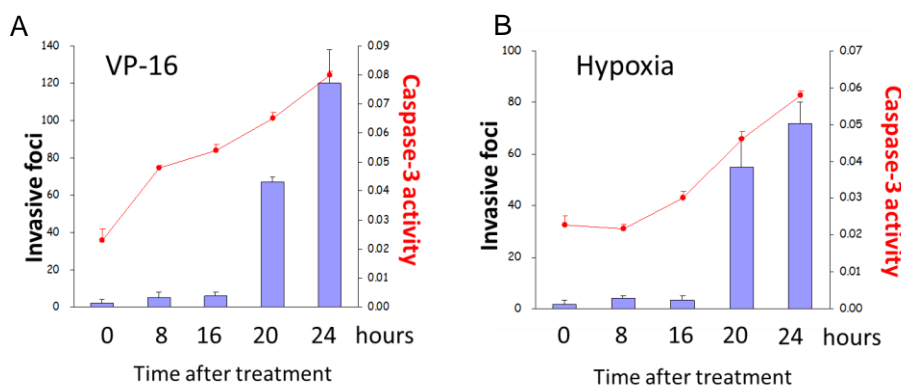


図3. VP-16および低酸素によって誘導された浸潤能はCaspase-3の活性と相関する。

VP-16 2 μM(A)または低酸素1%O₂(B)培養下のMM1細胞のinvasive fociの数(column)とCaspase3の活性(line)。

Caspase-3の活性と浸潤能の亢進に直接の関連があるかどうかを調べるため、Caspase-3の機能を低下させて浸潤能への影響を検討した。まず、Caspase-3阻害剤DEVEまたはzVADを用いてCaspase-3の活性を抑制した。VP-16処理後、または低酸素培養下のMM1細胞の浸潤能の亢進は、DEVDおよびzVADの添加によって抑制された(図4A)。LPAにより誘導されたMM1細胞の浸潤はCaspase-3阻害剤では抑制されないことから、Caspase-3による浸潤能の亢進はストレス環境下特異的な現象であることが示唆された。また、MM1細胞にCaspase-3のshRNAを導入することによってもストレス下の浸潤能は抑制された(図4B、C)。

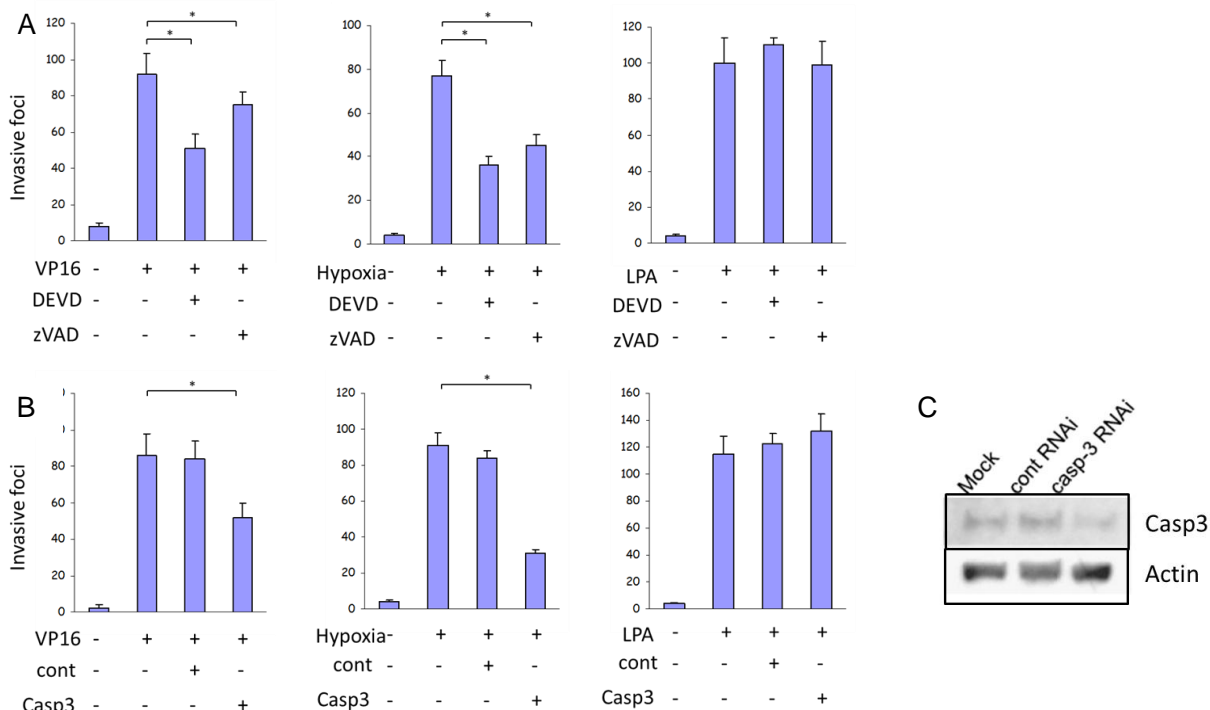


図4. VP16および低酸素により誘導された浸潤はCaspase-3の活性阻害により抑制される。

- A) Caspase-3阻害剤DEVDまたはzVAD存在下における、ストレス誘導MM1細胞の浸潤。
- B) Caspase-3のshRNA導入によるMM1細胞の浸潤。
- C) Caspase-3 shRNA またはcontrol-shRNA導入後のcaspase-3タンパク量をウエスタンブロット法にて検出。

続いて、Caspase-3による浸潤能亢進のメカニズムを検討した。ROCK1はRho-GTPaseの下流に存在するタンパクリン酸化酵素で、細胞の収縮、運動、浸潤等に関与している(Amano 2001 Biochem J)。また、ROCK1はアポトーシスおよび細胞運動時のblebbingに重要な役割を果たすことが報告されている(Imamura 2000 Jpn J Cancer Res, Ito 1999 Nat Med)。したがって、ROCK1がアポトーシスと浸潤のクロストークの接点である可能性が考えられた。ROCK1阻害剤であるY-27632またはRho阻害剤であるC3を添加すると、VP-16処理および低酸素培養下のMM1細胞の浸潤能の亢進が著しく阻害された(図5A)。Caspase-3によるROCK1の切断は、Rho阻害剤であるC3では抑制されなかったが、アポトーシス阻害剤であるDEVD添加によって部分的に回避された(図5B)。以上のことから、ストレス環境下においてアポトーシスシグナルはCaspase-3によるROCK1の切断を介して浸潤シグナルとクロストークすることが示された(図5C)。

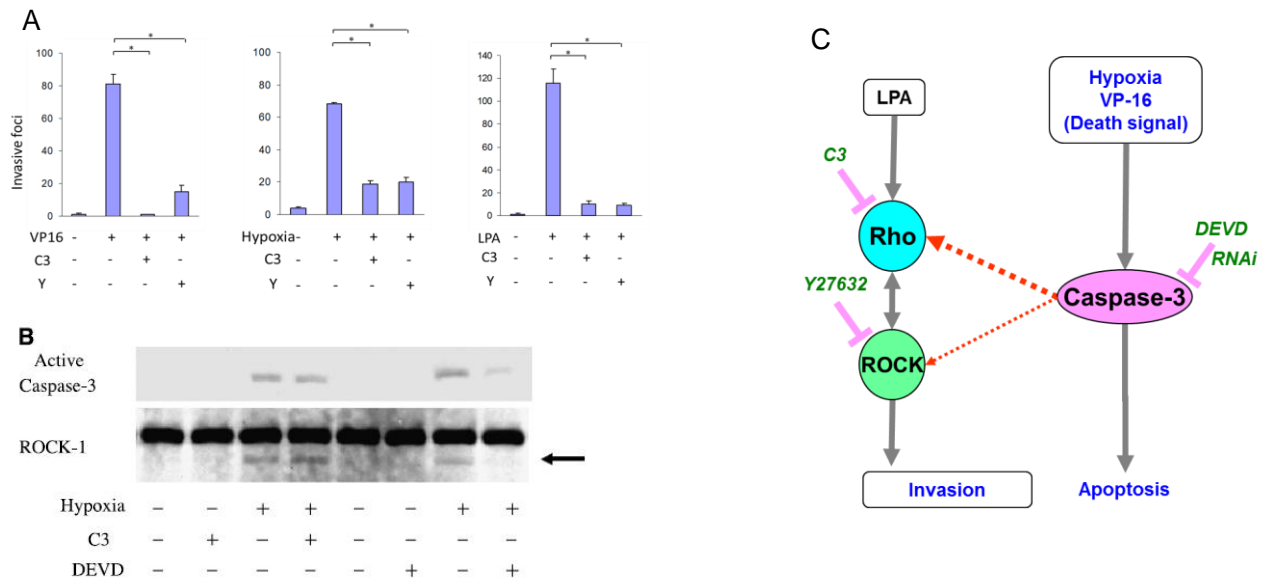


図5. アポトーシスと浸潤シグナルのクロストークにおけるRho/ROCK pathwayの関与

- A) Rho阻害剤C3またはROCK阻害剤Y-27632(Y)存在下におけるストレス誘導MM1細胞の浸潤。
- B) 低酸素下22.5時間培養後のMM1細胞のCaspase-3の活性化とROCK-1の開裂。矢印：開裂したROCK1
- C) Caspase-3を介したアポトーシスと浸潤シグナルのクロストークと、Rho/ROCK pathwayの関与。

<考察 1>

アポトーシスおよび浸潤の形態的な特徴である細胞膜のblebbingは、ROCK1の活性化によるmyosin light chain (MLC)のリン酸化によって誘導される (Sebbagh 2001 Nature Cell Biol)。基底状態のROCK1はhead-to-head ホモダイマーを形成することで自己阻害型構造をとっているが、Rho-GTPの結合またはCaspase-3によるC末端の切断によって構造が変化し、活性化される (Riento 2003 Nature Rev Mol Cell Biol)。本研究では、低酸素または抗癌剤暴露というストレス環境下で、Caspase-3の活性化とともにROCK1の切断が観察された (図5B)。癌細胞はIAP(inhibitor of apoptosis)ファミリーであるXIAPやsurvivinを高発現することによってアポトーシス耐性を獲得しているため、一定のCaspase-3活性を保ちながら、細胞死しない状態が存在する (Yang 2003 Cancer Res)。本研究の結果から、ストレス環境下で細胞死を回避した癌細胞が、Caspase-3の活性化によってROCK1を切断し、浸潤能を獲得する機序が示唆された。しかし、Rho阻害剤でもストレス誘導浸潤が大きく阻害されることから (図5A)、Rho-GTPを介したROCK1の活性化の寄与も大きいと考えられる。また、Caspase-3阻害剤およびRNAiによる浸潤能抑制効果が部分的であることから (図4 A, B)、Caspase-3を介さない、ストレス環境下におけるRho/Rockシステムの活性化経路が存在する可能性もある。

本研究では、ストレス環境下における亜致死的な刺激が、癌細胞の浸潤形質促進という悪性を誘導することが示された。低酸素は、間葉系幹細胞や神経幹細胞など、正常細胞の遊走を誘導することが報告されている (Vertelov 2013 Stem Cell Res and Ther, Zhang S 2012 Neurochem Res)。しかし、Caspase-3の活

活性化は正常細胞に容易に細胞死を誘導するので、Caspase-3を介したRho/ROCKシステムの活性化による浸潤の誘導は、癌細胞特異的であると考えられる。癌細胞のアポトーシス抵抗性のメカニズムを標的とすることで、癌細胞に細胞死を誘導するだけでなく、浸潤、転移という致死的な転帰の回避につながる可能性が示唆された。

課題2 低酸素下IGF刺激による小胞体ストレスを介した細胞死の誘導

<序 2>

固形癌に存在する低酸素領域は、癌細胞の抗癌剤耐性や浸潤形質の獲得など、癌の悪性化に深く関与している。細胞の低酸素応答を司る転写因子HIF1 α (hypoxia inducible factor 1)の研究を中心に、癌細胞の低酸素応答の分子メカニズムが明らかにされてきた (Semenza 2003 Nature Rev Cancer)。しかし、多くの研究は比較的短時間の低酸素応答を対象としたものであり、長期間にわたる慢性的な低酸素下における癌細胞の応答に関する知見は少ない。

Insulin-like growth factor (IGF)ファミリーはIGF-IとIGF-IIの2つのリガンドからなり、IGF-I レセプター (IGF-IR) に結合する。IGF-IRは膜貫通型チロシンキナーゼであり、インスリンレセプターと同様に細胞内シグナルを活性化する (LeRoith 2003 Cancer Lett)。IGF-IRシグナルは細胞分裂、形質転換、細胞の生存などを促進する。しかし、低酸素下におけるIGF-IRシグナルの役割は明らかにされていない。

mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) はIGF-IRシグナルの下流分子の一つであり、タンパク質の翻訳を促進する鍵分子である。mTORC1の過剰な活性化も多くの癌で報告されているが、低酸素やアミノ酸枯渇というストレス環境下では Tuberous Sclerosis Complex(TSC)1/2の活性化を介して、mTORC1が抑制される (図6、Arsham 2003 JBC, Hamanaka 2005 Biochem Biophys Res Commun)。RTK/PI3K/mTORC1は細胞の生存に重要なシグナル経路であるため、低酸素下でmTORC1が抑制されることは、癌の生存戦略としては一見矛盾しているように見える。本研究では、低酸素培養下の癌細胞をIGFで刺激し、下流のmTORC1を活性化させ、癌細胞の生存への影響を検討した。

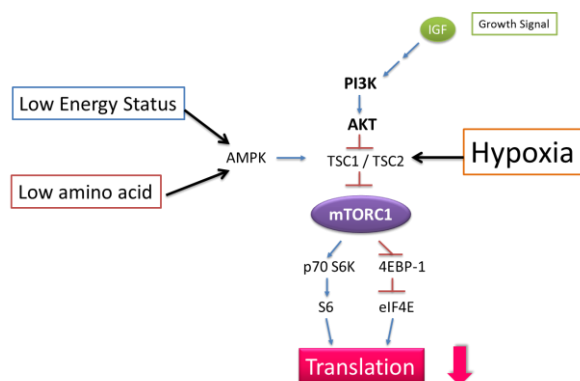


図6. 癌微小環境におけるPI3K/AKT/mTORC1の制御

増殖因子シグナルは、細胞内でPI3K、AKT、mTORC1を活性化して、タンパク質の翻訳を促進する。しかし、アミノ酸枯渇や低酸素などの癌微小環境下においては、TSC1/2が活性化されて、mTORC1活性が低下し、タンパク合成が低下する。

<実験方法 2>

(1) 細胞および培養方法

大腸癌細胞株COLO320および膵臓癌細胞株AsPC-1はAmerican Type Culture Collectionより入手した。これらの細胞は10%FBS存在下または非存在下のRPMI1640中で培養した。低酸素培養は、マルチガスインキュベーター (ASTECC, 福岡、日本) を用いて、1%O₂、5%CO₂下にて行った。無酸素培養 (0%O₂) は、アネロパックシステム (三菱ガス化学株式会社、東京、日本) を用

いて行った。細胞数の計測実験には、細胞培養用12ウェルプレート1ウエルあたりCOLO320を 3×10^5 個、AsPC-1を 1×10^5 個播種した。また、ウエスタンブロットおよびRT-PCR用には、細胞培養用60mmディッシュ1枚当たり、COLO320を 1.5×10^6 個、AsPC-1を 1×10^6 個播種した。COLO320細胞は、播種後6時間は常酸素下にて培養し、その後低酸素培養へ移行した。AsPC-1細胞は播種後17時間常酸素下にて培養し、血清非含有培地に交換後、低酸素培養または無酸素培養へ移行した。IGF-I、IGF-II、insulinはそれぞれ100ng/mL、100ng/mL、および100nMの濃度で添加した。生細胞数の計測は、トリパンプルー排除法にて行った。

(2) 試薬

Cycloheximide、tunicamycin、およびinsulinはSigma Aldrichより購入した。zVAD-fmkはペプチド研究所より購入した。IGF-IおよびIGF-IIはR&D Systemsより、LY294002、rapamycin、およびエトポシド (VP-16) は和光純薬株式会社より購入した。

(3) イムノブロット

ウエスタンブロットは常法に基づいて行った。AKT、4EBP1、S6K、S6、BADおよびリン酸化タンパクAKT (S⁴⁷³)、4EBP (Thr^{37/46})、S6K (Thr³⁸⁹)、S6 (Ser^{235/236})、およびBAD (Ser¹¹²)に対する一次抗体は、Cell Signaling Technologyより購入した。GADD153 (CHOP)、GRP78/BiP、ATF4に対する一次抗体はSanta Cruz Biotechnologyより購入した。抗 β -actin抗体はSigmaより、抗cytochrome c抗体はBecton Dickinsonより、抗porin抗体はInvitrogenよりそれぞれ購入した。二次抗体のHRP-抗ウサギIgGおよびHRP-抗マウスIgGはSanta Cruz Biotechnologyより購入した。

(4) 細胞質の分画

細胞質の分画は、Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit (Bio Vision)を用いて行った。 7.5×10^7 個のCOLO320細胞をトリプシンで回収し、PBSで洗浄した。細胞ペレットを、DTTとプロテアーゼ阻害剤を含むCytosol Extraction Buffer Mixで懸濁し、ピペットで混和した。 $700 \times g$ で遠心した後、 $10,000 \times g$ で再度遠心して、上清を細胞質分画として使用した。

(5) 半定量的RT-PCR

Total RNAはRNeasy Mini (Qiagen)を用いて抽出した。Total RNA $1 \mu\text{g}$ より、Superscript IIIを用いた逆転写反応によってcDNAを得た。PCR反応はiCycler (Bio-Rad)を用いて行った。

(6) RNA干渉

CHOP遺伝子のノックダウンはレトロウイルスベクターpSuperRetro (Oligoengine, Seattle, WA) を用いたshRNAの導入により行った。

(7) 統計解析

実験は少なくともn=3以上で3回行い、平均値±標準偏差で示した。統計解析はGraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いてunpaired *t* testを行い、P<0.05を統計的有意差とした。

<結果 2>

大腸癌細胞株COLO320を低酸素 (1%O₂)、血清非存在下で培養すると、一定の数を保ち長期間 (4日間) 生存する。この状態のCOLO320細胞に、IGF-Iまたはinsulinを添加すると、2日目以降に細胞数の著しい減少が認められた (図7A)。同様の現象はIGF-IIの添加によっても起こり、IGF-I、IGF-IIおよびinsulinは用量依存的にCOLO320の細胞数を減少させた (図7B)。低酸素培養下でIGFsまたはinsulinを添加すると、アポトーシスの特徴であるPARPの開裂およびCaspase-3の活性化が誘導された (図8A)。これらの誘導は、常酸素下 (20%O₂) では起こらないことから、低酸素特異的な細胞死誘導であると考えられた。Caspase阻害剤のzVAD-fmkを添加すると、IGFおよびinsulinによる細胞数の減少が抑制された (図8B)。これらのことから、低酸素下のIGF刺激による細胞数の減少は、アポトーシスによるものであることが示唆された。しかし、IGFはBADのリン酸化を介してミトコンドリアからのcytochrome cの流出を防ぐため、抗アポトーシスシグナルとして知られている (Baserga 2003 Int J Cancer, Yang 1995 Cell)。そこで、低酸素培養下のCOLO320におけるアポトーシスシグナルを検討した。

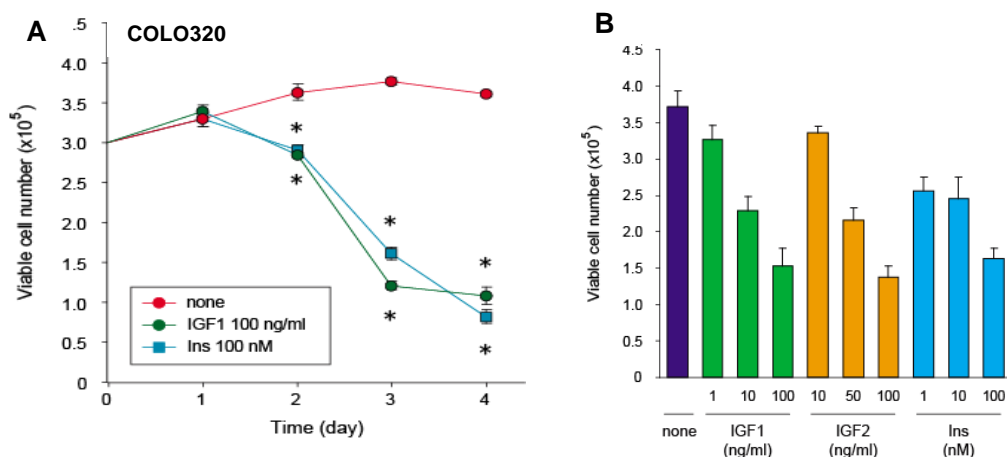


図7. 低酸素下IGF刺激は大腸癌細胞株COLO320に細胞死を誘導する

A) COLO320を低酸素、血清非存在下で培養し、IGF1 100ng/mLまたはInsulin 100nMで刺激して細胞数を計測した。

(n=3) student's *t* test * <0.05

B) 低酸素下で培養したCOLO320細胞を、IGF1、IGF2もしくはInsulinで刺激し、3日後の細胞数を計測した。

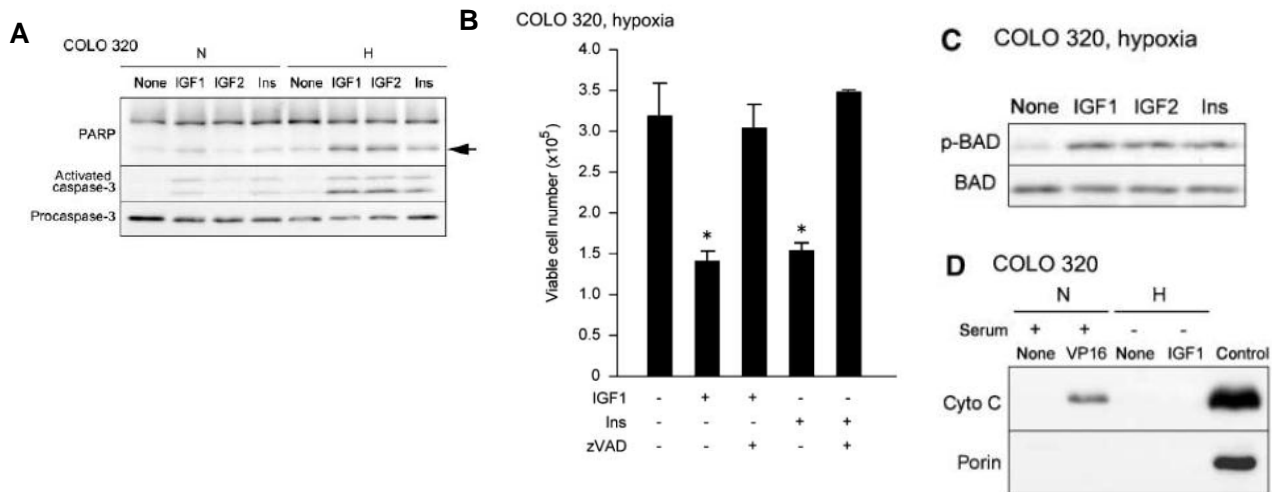


図8. 低酸素下IGF刺激はCOLO320細胞にアポトーシスを誘導する

- A) COLO320細胞を各条件で17時間培養し、PARPおよびCaspase-3の開裂をウエスタンブロット法にて確認した。
 B) アポトーシス阻害剤zVAD存在下でIGF刺激を行い、3日目の細胞数を計測した。(n=3) student's *t* test * <0.05
 C) 低酸素下IGFシグナルの増強によるBADのリン酸化。
 D) 細胞質分画のcytosome C およびPorin(ミトコンドリアタンパクのcontrol)のウエスタンブロット法による検出。

その結果、低酸素環境下でもIGFsによるBADのリン酸化は観察された(図8C)。また、ミトコンドリアを介したアポトーシスの指標であるチトクロムCの細胞質への流出は、低酸素下IGF刺激では起こらなかったが、ポジティブコントロールであるVP-16処理では明らかに認められた(図8D)。以上のことから、低酸素下IGFs刺激によるアポトーシスは、ミトコンドリアを介さない経路で起こっていることが示唆された。

低酸素下IGFs刺激がアポトーシスを誘導するシグナル経路を探索するため、PI3K/mTORの経路に着目した。COLO320細胞を常酸素下(20%O₂)または低酸素下(1%O₂)において血清非含有培地で培養し、IGFsまたはinsulinによって刺激した(図9A)。その結果、常酸素下ではAKT, 4EBP1, S6K, S6のリン酸化が上昇したのに対して、低酸素下ではAKTのリン酸化のみが常酸素下と同じレベルまで上昇し、4EBP, S6K, S6のリン酸化は部分的な上昇にとどまった。このことから、低酸素下ではIGF刺激によってPI3Kは完全に、mTORの下流は部分的に活性化されることが示された。

この知見が一般的であるかどうかを検討するため、膵臓癌細胞AsPC-1を用いて同様の実験を行った。AsPC-1細胞は、低酸素下(1%O₂)IGF刺激では細胞死しなかったが、無酸素下(0%O₂)IGF1刺激によってCOLO320細胞と同様の細胞死を起こした(図9D)。低酸素下、または無酸素下において、IGF1は部分的に4EBP, S6K, およびS6のリン酸化を上昇させた(図9B)。

続いて、PI3K/mTORシグナルがIGFsによる細胞死に及ぼす影響を検した。PI3K阻害剤であるLY294002またはmTOR阻害剤であるrapamycinを添加すると、COLO320細胞、AsPC-1細胞ともにIGFsによる細胞死の誘導が抑制された(図9C, D)。このことから、IGFsによる細胞死の誘導にPI3K/mTORの活性化が重要であることが示唆された。

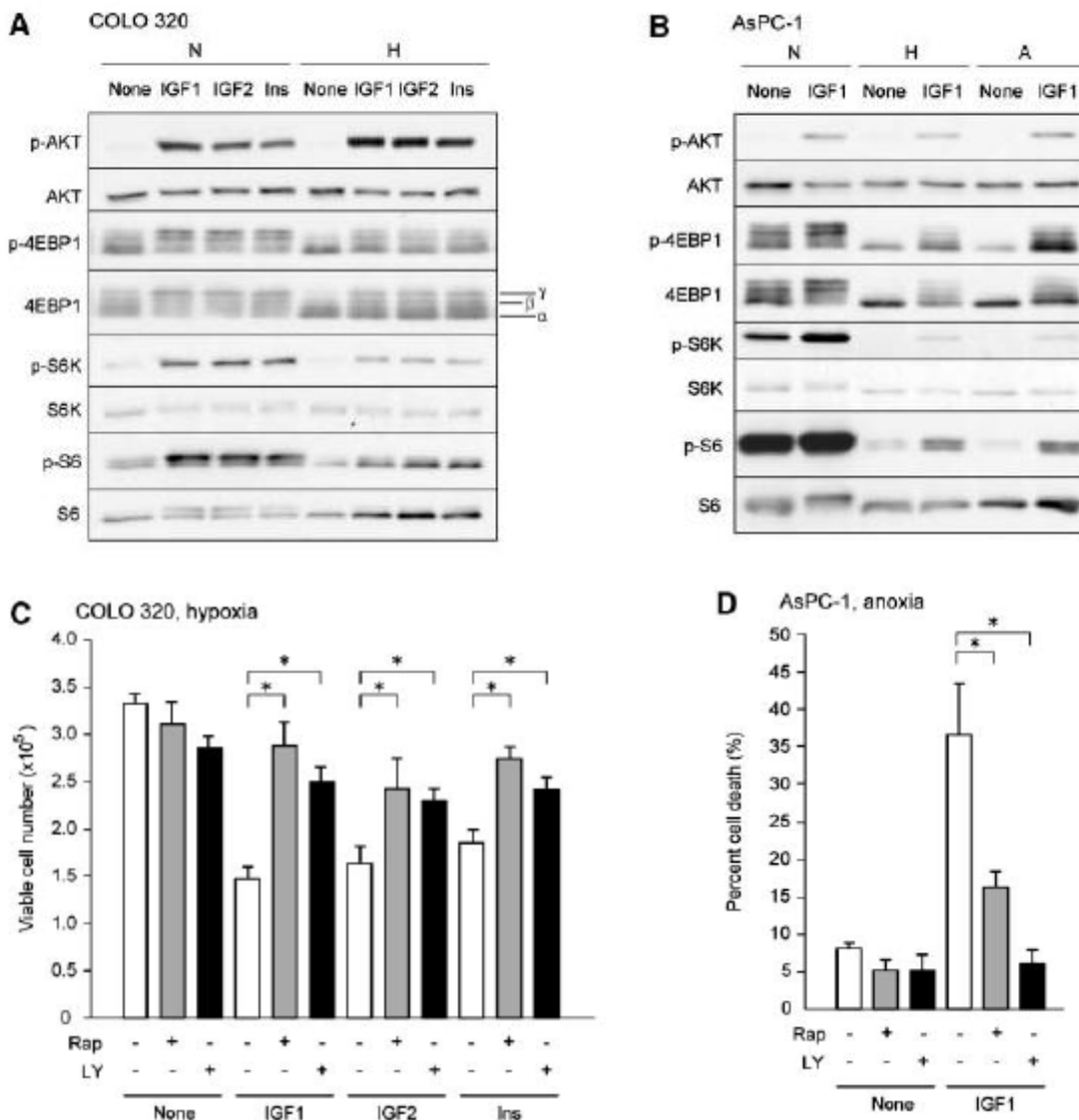


図9. 低酸素下IGF刺激によるアポトーシスの誘導にPI3K/mTOR経路が関与している

- A) COLO320細胞を各増殖因子で刺激し、20%O₂(N)または1%O₂(H)下で17時間培養後の細胞内シグナルをウエスタンブロット法で検出。
- B) AsPC-1細胞を20%O₂(N)、1%O₂(H)または0%O₂(A)で培養し、IGF1で刺激後24時間の細胞内シグナルをウエスタンブロット法で検出。
- C) COLO320細胞を低酸素下(1%O₂)で培養し、各増殖因子および各阻害剤で刺激後3日目の生細胞数を計測。
- D) AsPC-1細胞を無酸素下(0%O₂)で培養し、IGF1および各阻害剤で刺激後3日目の死細胞の割合(%)。
- LY; LY294002(10 μM)、Rap; Rapamycin 100nM (n=3) student's t test * <0.05

続いて、COLO320細胞が低酸素下IGFs刺激でアポトーシスするメカニズムについて、我々は小胞体ストレス (endoplasmic reticulum stress) に着目した。タンパク質は翻訳後、リボソームから小胞体に運ばれて糖鎖付加等の修飾を受け、機能的な3次元構造に折りたたまれるが、低酸素やグルコース欠乏などのストレス環境下ではその折りたたみが正確に行われず、異常タンパクが小胞体内に蓄積する。この異常タンパクに小胞体分子シャペロンBiPが結合することで、Unfolded Protein Response (UPR) が惹起される。

BiPは通常、PERK、IRE1、またはATF6という小胞体膜タンパクと結合してこれらの活性を抑制しているが、BiPが遊離することによりこれら膜タンパクがホモダイマーまたはオリゴマーを形成し、活性化する。その後、CHOPなどの一連の遺伝子群の転写活性化や、タンパク合成の抑制、あるいは細胞死等が誘導される(図10)。低酸素下ではmTORC1が抑制されタンパク質合成は低い状態に保たれているが、IGFによる刺激で過剰なタンパク合成が誘導され、小胞体ストレスが増強する可能性が考えられた。そこで、我々は小胞体ストレス関連分子の発現を、RT-PCRおよびイムノブロット法にて確認した(図11A)。

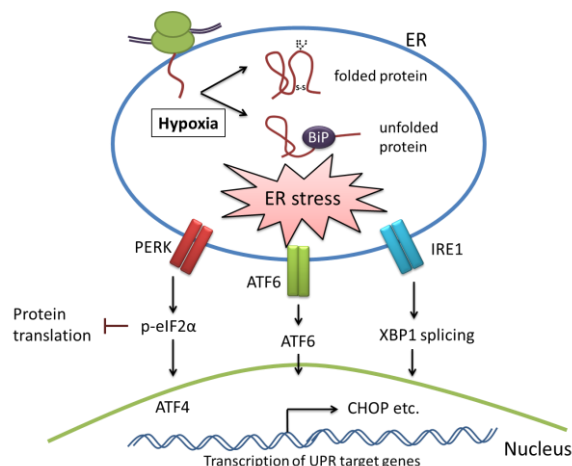


図10. 小胞体ストレスとUnfolded Protein Response (UPR)

COLO320細胞は、低酸素下、IGFシグナルの刺激によって、CHOP、BiP、ATF4などの遺伝子またはタンパク発現が上昇し、XBP-1 mRNAのスプライシングも観察された。

これら小胞体ストレス関連分子の上昇は、mTORC1阻害剤であるラパマイシンまたはPI3K阻害剤のLY294002の添加によって抑制された(図11B)。AsPC-1細胞では、無酸素下(0%O₂)培養単独で小胞体ストレスが誘導されたが、IGF1の刺激によってCHOPの誘導およびXBP-1のスプライシングがさらに増強された(図11C上段)。また、ラパマイシンまたはLY294002の添加によってCHOPのタンパク誘導およびPARPの開裂が低下し、IGF1によるアポトーシスが抑制された(図11C下段)。

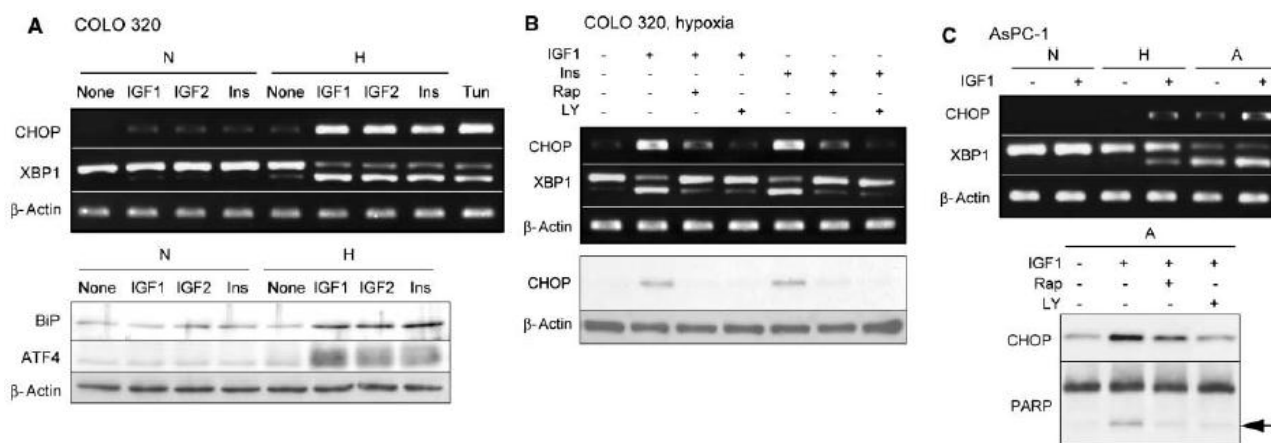


図11. 低酸素下IGF刺激は小胞体ストレスを誘導する

- A) COLO320細胞を20%O₂(N)または1%O₂(H)で培養し、IGF1、IGF2もしくはinsulin刺激後17時間のCHOPの発現およびXBP-1のスプライシングをRT-PCRで、BiPおよびATF4の発現をウエスタンブロットで検出した。小胞体ストレスのポジティブコントロールとして2μg/mLのtunicamycin(Tun)で処理した。
- B) COLO320細胞の低酸素下IGF刺激による小胞体ストレスは、mTORC1阻害剤(Rapamycin,100nM)またはPI3K阻害剤(LY294002, 10μM)によって抑制された。
- C) AsPC-1細胞を20%O₂(N)、1%O₂(H)または0%O₂(A)で培養し、IGF1刺激後24時間のCHOPの発現およびXBP-1のスプライシングをRT-PCRとウエスタンブロットで検出した。また、PARPの開裂(矢印)をウエスタンブロットで検出した。

mTORC1は4EBPおよびS6Kのリン酸化を介して、Cap-依存的なタンパク質の翻訳を促進する。IGFsおよびinsulinは低酸素下においてもmTORC1シグナルを活性化するので(図9A,B)、IGFs、insulin刺激によってタンパク合成が促進している可能性が考えられた。³⁵S取り込みによるタンパク合成を調べると、低酸素環境下でも、IGFによってわずかではあるが有意にタンパク合成が促進された(図12A)。タンパク合成阻害剤Cycloheximideを添加し、COLO320細胞の細胞死への影響を検討した。その結果、IGF1またはinsulin刺激によるCOLO320細胞数の減少は、Cycloheximideを添加することで著しく抑制された(図12B)。IGF1およびinsulinによるCaspase-3の活性化、CHOPの誘導およびXBP-1のスプライシングもCycloheximideの添加によって抑制された(図12C)。AsPC-1細胞においても、Cycloheximideは無酸素下IGF1刺激による細胞死を低下させ、小胞体ストレスも軽減した(図12D)。これらの結果から、低酸素下でのIGF刺激は、COLO320細胞およびAsPC-1細胞に過剰な小胞体ストレスを誘導すること、およびこの小胞体ストレスはPI3K-mTORC1シグナルの活性化によるタンパク合成の促進を介していることが示唆された。

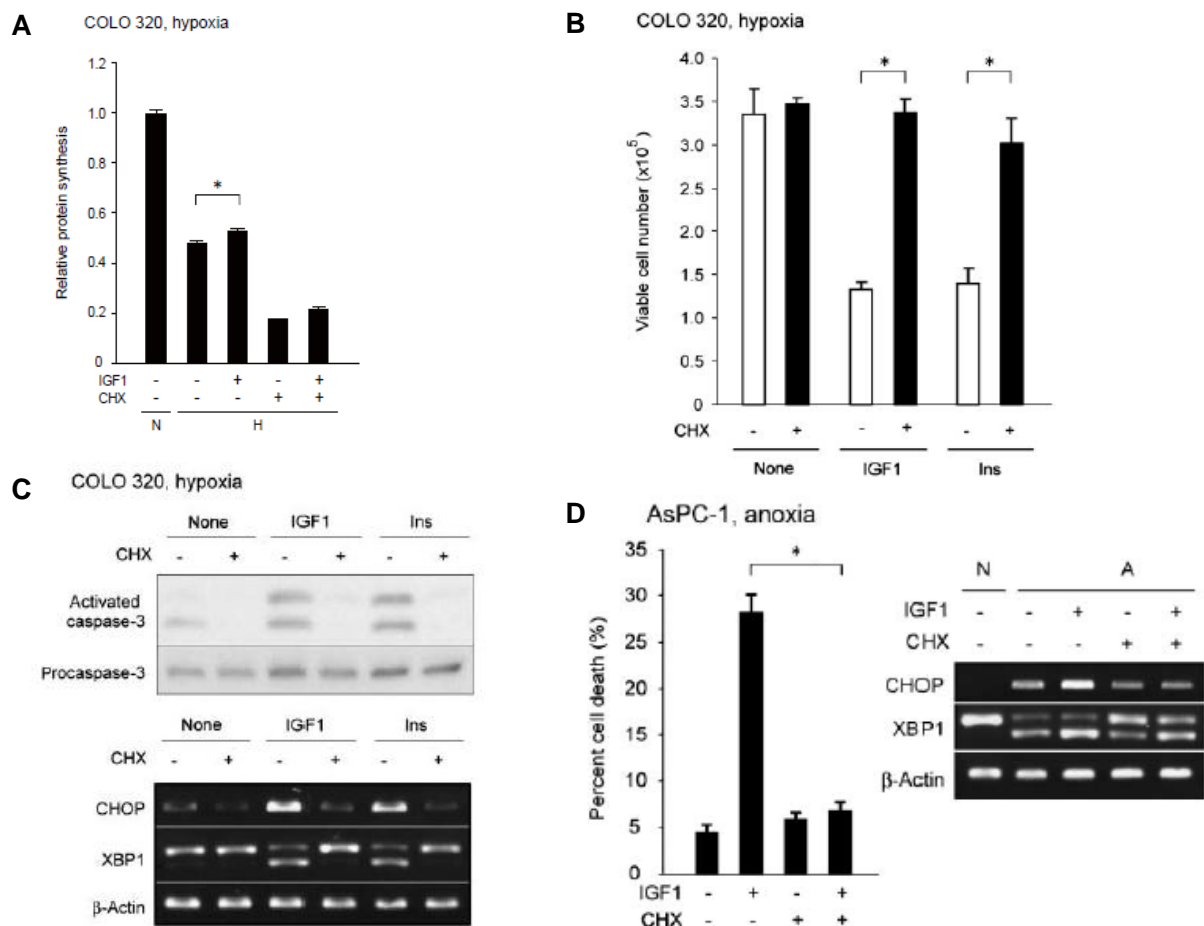


図12. 低酸素下IGF刺激による細胞死は、タンパク合成の阻害によって回避される

- A) ³⁵S取り込みによるタンパク合成の測定。(n=3) student's *t* test * <0.05
- B) COLO320細胞を1%O₂で培養し、IGF1、もしくはinsulin刺激後3日目の生細胞数。CHX; Cycloheximide (125ng/mL).
- C) 上段; Caspase-3の活性化をウエスタンブロットで検出。下段; CHOPの遺伝子発現およびXBP-1のスプライシングを半定量的RT-PCRで解析。COLO320細胞を1%O₂で培養し、各条件で刺激後17時間のタンパク質とRNAを回収した。
- D) 左; AsPC-1細胞を0%O₂、IGF1または12.5 μg/mL CHX存在下で3日間培養した際の死細胞率(%). 右; 各条件下で培養したAsPC-1細胞のCHOPの遺伝子発現とXBP-1のスプライシングを半定量的RT-PCRで解析。

最後に、COLO320細胞およびAsPC-1細胞にCHOPのshRNAを導入して細胞死への影響を検討した。CHOP (GADD153) は小胞体ストレスによる細胞死を誘導する鍵分子である (Oyadomari 2004 Cell Death Differ)。CHOPのknockdownによって、COLO320細胞およびAsPC-1細胞の低酸素下IGF刺激による細胞死が回避された (図13A、B)。以上の結果から、低酸素下のIGF刺激は過剰なタンパク合成を促進し、細胞に小胞体ストレスを惹起すること、またCHOPの上昇により細胞がアポトーシスすることが明らかとなった (図13C)。

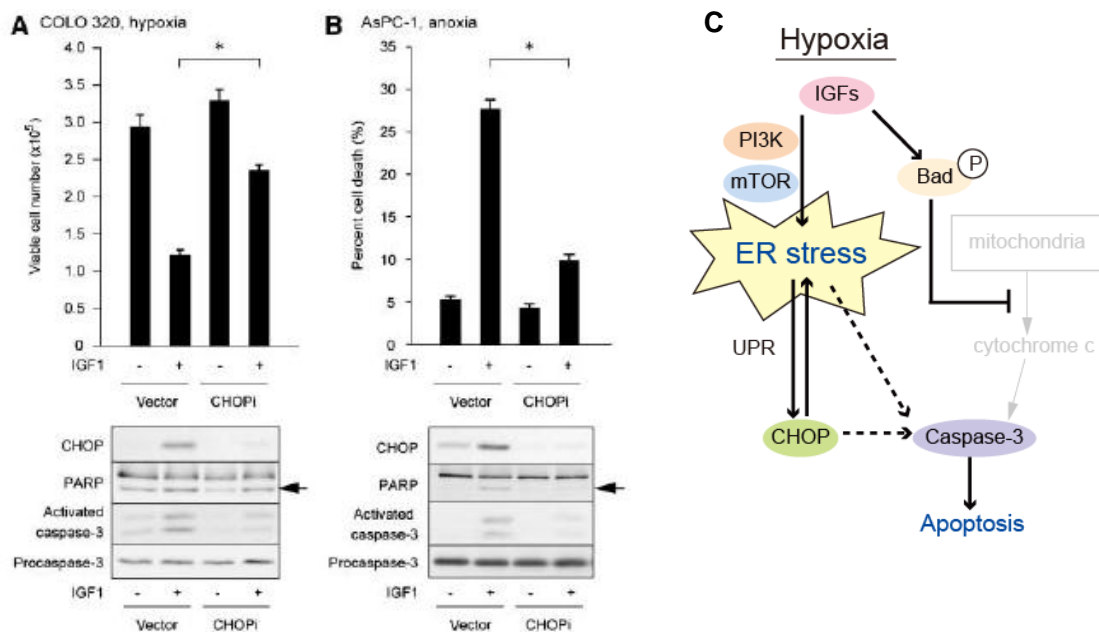


図13. 低酸素下IGF刺激による細胞死におけるCHOPの関与

- A) 上段;CHOPのshRNA導入による、低酸素下IGF刺激によるCOLO320細胞の細胞死の減少。下段;CHOP, PARP、active-Caspase3のウエスタンブロット。
- B) 上段;CHOPのshRNA導入による、無酸素IGF刺激によるAsPC-1細胞の細胞死の減少。下段;CHOP, PARP、active-Caspase3のウエスタンブロット。矢印:PARPの開裂 (n=3) student's *t* test * <0.05
- C) 低酸素下におけるIGFによる細胞死誘導のモデル

<考察 2>

IGF/PI3K/mTORC1シグナルは、細胞の増殖および生存に重要な役割を果たしている。正常組織においては、低酸素による心筋細胞、神経細胞などの細胞死を、IGFシグナルが阻害することが報告されている (Knezevic I. 2012 JBC, Liu W 2011 BMC Neuroscience)。しかし本研究では、低酸素環境下におけるIGFシグナルの活性化は、小胞体ストレスの増強によって癌に細胞死を誘導することを明らかにした。

IGF刺激による細胞死の原因の一つが、低酸素下における不適切なタンパク合成の促進によると考えられた。低酸素下では一般的にタンパク質の翻訳は抑制される (Hochachka 1996 PNAS) が、そのメカニズムとして ①PERKによるeIF2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α)のリン酸化 (図10)、②TSC1/2の活性化を介したmTORC1経路の阻害 (Arsham 2003 JBC)、③AMPK (AMP-activated protein

kinase) によるeEF2の阻害 (Liu 2006 Mol Cell) などがあげられる。低酸素下のCOLO320細胞をIGFで刺激すると、わずかではあるが有意にタンパク合成が上昇した (図12A)。低酸素下におけるタンパク合成は複数のシグナル経路で抑制されているため、IGF刺激単独ではタンパク合成を常酸素下のレベルまで復元することは困難である。しかし、わずかなタンパク合成の上昇であっても、小胞体ストレスを誘導するには十分な刺激であると考えられた。

IGF刺激による細胞死の原因の二つ目は、小胞体ストレスに応答したUPR遺伝子の発現上昇であると考えられた。低酸素下では全般的にタンパク合成は抑制されるが、UPR遺伝子の翻訳は継続される (Kaufman 1999 Genes Dev)。IGFまたはinsulinによる刺激は、直接UPR遺伝子の発現を上昇させる可能性も考えられた。アミノ酸枯渇もタンパク合成を低下させる環境要因であるが、アミノ酸枯渇によるCHOPの誘導にはIGF1/PI3K/mTORシグナルが必要であることが報告されている (Entingh 2001 Endocrinology)。

CHOPはC/EBPファミリーの一つであり (Ron 1992 Genes Dev)、定常状態でも低いレベルで発現しているが、遺伝子損傷、栄養飢餓、および小胞体ストレスなどのストレス環境下でその発現が上昇する。CHOPが小胞体ストレスによるアポトーシス誘導に重要な役割を果たすことは明らかであるが (Oyadomari 2004 Cell Death Differ)、その詳しいメカニズムは完全には解明されていない。ある文献では、CHOPがBcl-2の機能を抑制してミトコンドリア起因のアポトーシスを誘導すると報告されている (Matsumoto 1996 FEBS Lett, McCullough 2001 Mol Cell Biol)。また、CHOPは単なる小胞体ストレスの下流分子ではなく、それ自身が小胞体へのタンパク質の流入を増加させ、小胞体ストレスを増強させることも報告されている (Marchiniak 2004 Genes Dev)。

CHOP以外にも、小胞体ストレスによる細胞死の誘導には様々な系が関与している。ミトコンドリアを介したアポトーシスの誘導 (Li 2006 JBC)、小胞体からのCa²⁺流出によるカルパインの活性化 (Nakagawa 2000 JBC)、小胞体固有のCaspaseであるCaspase-12 (マウス) またはCaspase-4 (ヒト) の活性化 (Nakagawa 2000 Nature, Hitomi 2004 JBC) などがあげられる。我々の実験系では、Caspase-4のshRNA導入によってCOLO320細胞の細胞死は軽減されたが、AsPC-1の細胞死は影響を受けなかった (data not shown)。IGF刺激による小胞体ストレスを介した細胞死の誘導の下流のシグナルは、細胞によって異なると考えられた。

IGF/PI3K/mTORC1経路は、細胞分裂、形質転換、抗アポトーシスシグナルとして重要であり、IGF-II、IGF-IRの過剰発現は多くの癌で見つかっている (Baserga 2003 Int J Cancer)。また、この経路に抑制的に働くLKB1、TSC1/2、PTENは、癌抑制遺伝子として知られている。このように、IGFシグナルは発癌と深く関わっている一方で、骨肉腫や神経膠腫細胞では、IGF-Iによる細胞死も報告されている (Raile 2003 Horm Metab Res, Yang 1995 Cell)。また、IGF-1Rの細胞内ドメインを強制発現させた癌細胞は、マウスへの造腫瘍性が低下することも報告されている (Hongo 1998 Cancer Res)。環境に応じてIGFシグナルを低下させることも、癌細胞がストレス下で生存するための戦略の一つであると考えられる。低酸

素下では、HIFによってIGF-binding protein -1(IGFBP-1)、IGFBP-3などのIGF結合蛋白が分泌され、IGFシグナルが抑制される (Bacon 2004 Ann Med)。小胞体ストレスも、ATF4を介してIGFBP-1を誘導する (Entingh 2001 Endocrinology)。低酸素下におけるIGFBPの役割は完全には明らかになっていないが、IGFBPの局所的な上昇は、低酸素下における過剰なIGFシグナルの活性化を防ぎ、細胞死を回避することに役立つと考えられた。

本研究は、低酸素、血清非存在下におけるIGF刺激という *in vitro* の実験系で行ったが、癌細胞自身も autocrine的にIGFを分泌するので (Thomas 2009 Prostate, Joung 2007 BBRC)、血管から遠く離れ、増殖因子や栄養素が届かない *in vivo* の腫瘍微小環境を模倣するモデルの一つになりえると考えられる。今後、*in vivo* モデルを用いた低酸素環境における増殖因子の影響を検討する必要がある。

課題3. 新しい癌細胞初代培養系を用いた非小細胞肺癌の培養と Neuregulin-1/HER3

応答性

<序 3>

癌は先進国において死亡原因第一位であり、中でも肺癌は日本人の部位別死亡率第一位を占める。肺癌は組織学上、小細胞癌と非小細胞癌に大別され、その治療方針も大きく異なる。非小細胞肺癌に対しては有効な化学療法が存在しなかったが、近年開発された種々の分子標的治療薬は一定の治療効果がある。

Epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor (TKI)であるゲフィチニブ、エルロチニブは、EGFRに恒常的な活性化を引き起こす遺伝子変異を持つ症例に対して有効である (Lynch 2004 NEJM, Maemondo 2010 NEJM)。EGFR exon19の欠失、およびexon20 L858Rの点突然変異がその大部分を占め、EGFR TKIの効果を予測する有効なバイオマーカーとなっている。また、新たにEML4-ALK融合遺伝子が発見され、若年性肺癌の原因となる癌遺伝子であることが報告された (Soda 2007 Nature)。EML4-ALK融合遺伝子をもつ症例に対しては、ALK TKIであるクリゾチニブが奏効する。しかし、いずれの分子標的治療薬も増殖抑制効果は一時的で、やがては耐性細胞の出現により癌が再発する現状である。

癌の根治を目標として様々な基礎的研究が行われているが、その多くが癌細胞株を使った実験である。癌細胞株は患者腫瘍より樹立された癌細胞であるが、樹立の過程でクローンの選択がおこり、継代の過程で遺伝子変異が蓄積している (Shoemaker 2006 Nat Rev Cancer)。そこで、癌細胞の初代培養系の確立が試みられてきたが、多くは癌細胞のviabilityの低さや線維芽細胞等のコンタミネーションによって妨げられてきた。近年、我々は、大腸癌の臨床検体を用いて、癌細胞初代培養系 (Cancer Tissue-Originated Spheroid 法 ; CTOS法) を確立した (Kondo 2011 PNAS)。CTOS法の基本的理念は、「固形癌の癌細胞を細胞集塊として培養する」というものである (図14A)。我々は、癌細胞といえども単細胞にまで分散されると急速に細胞死することを見出し、細胞-細胞間接着を維持したまま癌細胞を調製、培養することで、大腸癌の初代培養の成功率を飛躍的に増大させた。CTOS法では、癌組織を機械的、酵素的に分散し、フィルターを通して癌細胞集塊を回収し、浮遊培養する (図14B)。我々は、得られた癌組織由来の細胞集塊を、Cancer Tissue-Originated Spheroid ; CTOSと名付けた。大腸癌のCTOSは、単なる単細胞の集合体ではなく、極性や分化形質を保持した機能単位であることが明らかとなった。本研究では、このCTOS法を応用し、肺癌初代培養系の確立を試みた。

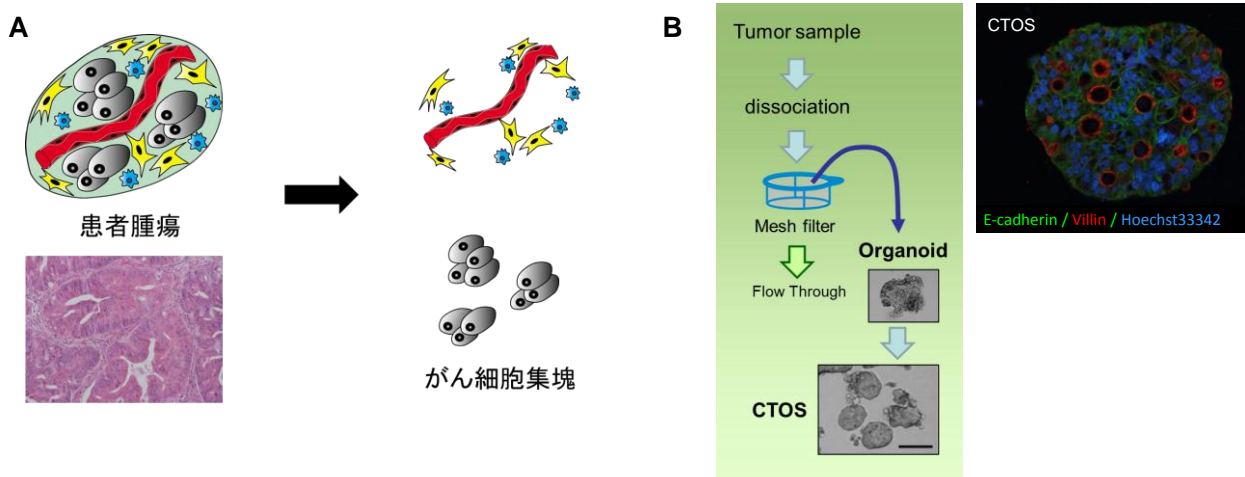


図14. CTOS法の基本理念と概要

- A) 臨床癌組織は、癌細胞、血管、繊維芽細胞、免疫系細胞などで構成される複雑な組織である。単細胞として分離した場合、細胞—細胞間、細胞—細胞外基質間の相互作用が失われることで、癌細胞は急速に細胞死する。CTOS法では、細胞—細胞間接着を維持したまま、癌細胞を細胞集塊(Organoid)として回収することで、viabilityの高い癌細胞を純粋に分離、培養することに成功した。
- B) CTOS法の概要(左)と、大腸癌由来CTOS(右)。大腸癌由来CTOSには、villinで染色される管腔構造が観察される。

<実験方法 3>

(1) 肺癌臨床検体からのCTOSの調製

大阪府立成人病センターにてインフォームドコンセントにより同意を得られた患者より、肺癌の臨床検体の供出を受けた。外科的手術検体をスカルペルにて1mm角程度に細分化し、Hank's balanced salt solution (HBSS)で洗浄して夾雑物を取り除いた。検体を100mLの蓋付き三角フラスコに移し、0.26U/mL Liberase DH (Roche ; 5401089)を含むDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)中で37°C 1-2時間、マグネットスターラーにて攪拌した。酵素的に分散された検体を500µm, 250µmの金属メッシュに通し、大きな断片を取り除いた。その後、さらに100µm, 40µmのセルストレイナー(BD FALCON)を通過させ、セルストレイナーの上に残った小断片(Organoid)と、セルストレイナーを通過したflow throughをそれぞれ別のチューブに回収した。HBSSで各分画を洗浄したのち、non-treated dish (EIKEN)にてStemPro® hESC (GIBCO) 中で培養した。

胸水の検体は、50mLチューブに分注したのち200xgで遠心して、ペレットを40µmのセルストレイナーに通した。その後、外科的手術検体と同様に細胞の回収、培養を行った。

(2) 免疫組織学的解析

免疫組織染色は腫瘍組織またはCTOSをホルマリン固定、パラフィン包埋したサンプルで行った。CTOSはMatrigel growth factor reduced (GFR) (BD Bioscience) に包埋した後、ホルマリンで固

定した。抗原賦活化はcitrate buffer (pH6.0)中でオートクレーブすることにより行った。

一次抗体は、E-cadherin (clone36/E-cadherin, BD), α -SMA (clone1A4, SIGMA), CD68 (cloneKP1, DAKO), EGFR (cloneD38B1, CST), cytokeratin 7 (cloneOV-TL12/30, DAKO), p53 (cloneDO-7, Novocastra), NCAM (AG1, DSHB), pAKT (Ser⁴⁷³) (clone D9E, CST), pHER3 (Y¹²⁸⁹) (clone21D3, CST), and Zo-1 (Invitrogen)を使用した。

(3) CTOSの培養

増殖因子の影響を調べる実験では、CTOSをMatrigel GFRへ包埋し、基本培地 (DMEM/F12, 2% BSA fraction V, 1× nonessential amino acids, 50 U/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin (all from Invitrogen), 50 μ g/mL ascorbic acid (SIGMA), 10 μ g/mL human transferrin (SIGMA), 0.1 mM β -mercaptoethanol (Wako), 1× trace elements A, B, C (Mediatech)へ各増殖因子を10ng/mLまたは100ng/mLの濃度で添加した。増殖因子は、NRG1 (Peprotech), Long-IGF1 (Gropen), bFGF (Invitrogen), Activin A (R&D Systems),または EGF (Invitrogen)を使用した。

抗HER3抗体の阻害効果を調べる実験では、CTOSをMatrigel GFRへ包埋し、10ng/mL NRG1存在下またはStenPro hESC®培養下で抗HER3抗体 (cloneH3.105.5, Calbiochem) を添加した。

(4) CTOSの薬剤感受性試験

エルロチニブ感受性試験は、CTOSをMatrigel GFRへ包埋し、各濃度のエルロチニブ (Toronto Research Chemicals) を含むStenPro hESCで培養した。薬剤の効果は7日間のCTOS増殖率で評価し、7日目のCTOSのサイズを0日目のCTOSサイズで補正した。CTOSサイズは画像解析ソフト Image J (National Institute of Health) で測定し、IC₅₀ (Half maximal (50%) inhibitory concentration) はGraph Pad Prism 4を使用して計算した。

(5) 動物実験

動物実験は、大阪府立成人病センターの動物実験指針に基づいて実施した。マウス移植腫瘍の作製は、CTOS約100個を50 μ LのMatrigel GFRに懸濁し、non-obese diabetic / severe combined immunodeficient (NOD/scid) マウスに移植して行った。マウス移植腫瘍より調製したCTOSには、語尾に”m”をつけて、primaryのCTOSと区別した。エルロチニブ (商品名タルセバ、中外製薬株式会社) は0.5%メチルセルロースに懸濁し、100mg/kgの用量で1日1回、5日間投薬、2日休薬のサイクルを2週間行った。

(6) ウェスタンブロット

CTOSを増殖因子非含有DMEM-F12でovernight培養し、StemProまたは10ng/mLの濃度の各増殖因子で刺激し、15分後に cell lysis buffer (10 mM Tris (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 1% NP40, 0.25% sodium deoxycholate, 0.05 M NaF, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 2 mM NaVO₄, 10 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin, 1 mM PMSF) にて溶解した。エルロチニブ存在下でのシグナル伝達の解析には、CTOSをovernight増殖因子非含有DMEM-F12で培養し、1 µMのエルロチニブで1時間処理した後、10ng/mLのepidermal growth factor (EGF) で15分間刺激した。一次抗体はpEGFR (Tyr¹⁰⁶⁸, cloneD7A5), EGFR (clone D38B1), pHER2 (Y^{1221/1222}, clone6B12), pHER3 (Y¹²⁸⁹, clone21D3), pAKT (Ser⁴⁷³, cloneD9E), AKT (clone40D4), pERK1/2 (Thr^{202/Tyr204}, cloneD13.14.4E), ERK1/2 (clone3A7) (以上Cell Signaling Technology)、HER2 (A0485) (DAKO)、HER3 (clone5A12) (NanoTools)、β-actin (cloneAC-15) (SIGMA) を使用した。

(7) フローサイトメトリー

CTOSを0.05% trypsin-EDTAで分散させ、40 µmのセルストレイナーを通して単細胞を回収した。細胞をFITC anti-human EpCAM (Miltenyi), PE anti-human CD45 (BD Pharmingen), またはPE anti-CD133 (Miltenyi)で染色し、FACSCalibur (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ)で解析した。アポトーシスの検出にはAnnexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Biovision)を使用し、細胞をAnnexin Vとpropidium iodide (PI)で染色した。データの解析にはFlowJo software (Tree Star, Inc., Ashland, OR)を使用した。

(8) 遺伝子解析

EGFRのexon18、19、20、21における遺伝子変異はダイレクトシーケンスもしくは、(株)三菱化学メディエンスへ(東京)の外部委託にて検出した。DNeasy Tissue Kit (QIAGEN)を用いてCTOSからDNAを抽出し、BigDye Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kitを使用してABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)にて解析した。FISH解析は(株)ジェネティックラボ(札幌)へ委託した。FFPEサンプルをDNA FISHに供し、EGFR遺伝子の増幅を画像解析で評価した。

(9) 統計解析

データはmean、SDで表示した。統計解析はStudent's *t* testで行い、*p*値が0.05以下を有意差と判断した。

<結果 3>

3-1. CTOS法による肺癌初代培養系の確立

非小細胞肺癌の手術検体をCTOS法にて酵素的、機械的に分散させ、セルストレイナーを通して $100\mu\text{m}$ または $40\mu\text{m}$ のメッシュの上に残ったフラグメント (Organoid) を回収した。調製直後のOrganoid 分画には多数の癌組織の小断片が存在するが、StemPro® hESC中でO/N培養すると、spheroid状の癌細胞塊が形成された (図15A)。胸水検体は酵素処理を必要とせず、遠心とfiltrationにて同様のspheroid状の細胞塊が得られた (図15B)。我々は、この癌細胞塊をCancer Tissue-Originated Spheroid ; CTOSと名付けた。

大腸癌のCTOSは、単細胞化することで急速なアポトーシスすることが報告されている (Kondo 2011 PNAS)。同様に肺癌CTOSをトリプシン-EDTAで単細胞化すると、経時的にアポトーシスする細胞が増加した (図15C)。このことから、肺癌においても細胞-細胞間接着を維持することが、癌細胞を高い生存率で培養するために極めて重要であることが示された。

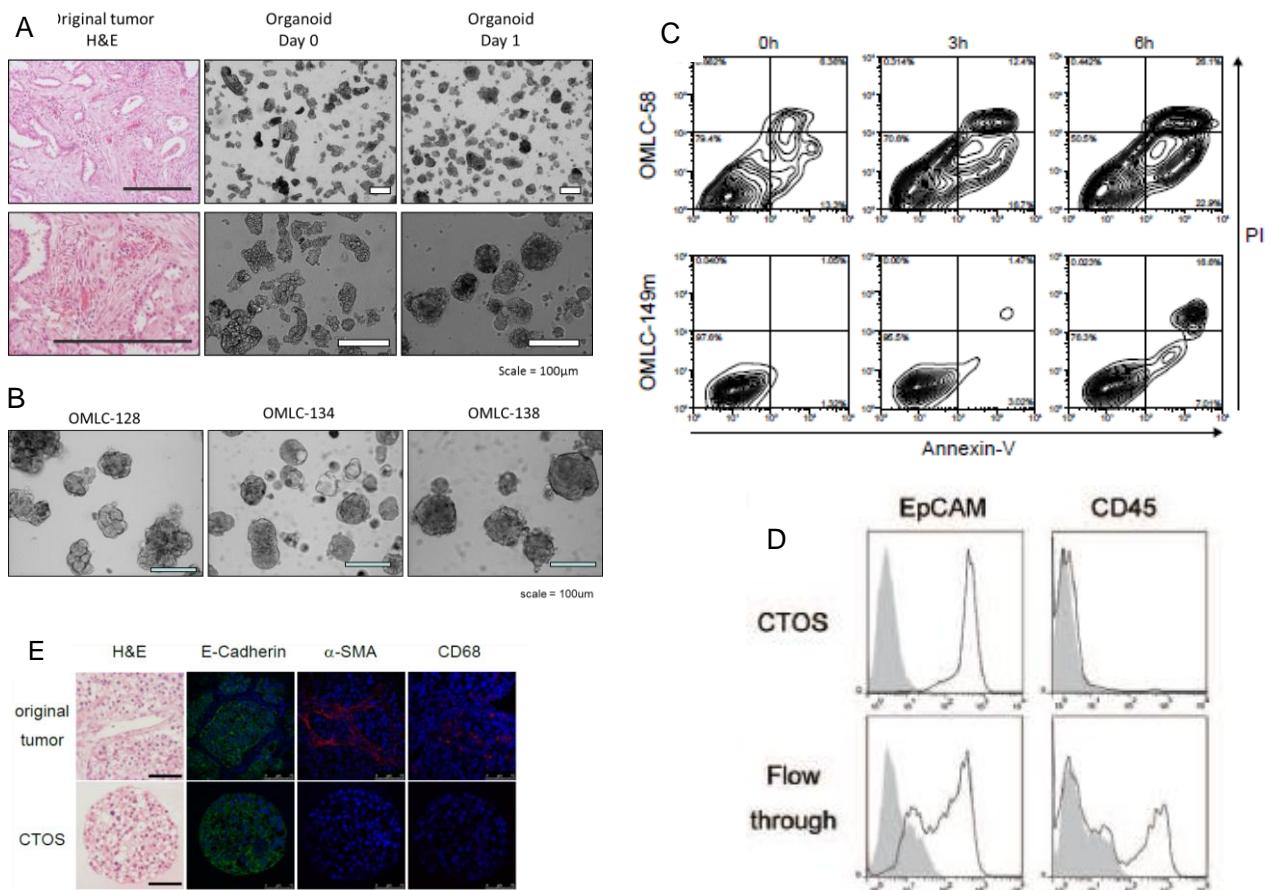


図15. 肺癌臨床検体からのCTOSの調製

- A) 肺腺癌手術検体のHE染色 (左)と調製直後のOrganoid (中)、および1日浮遊培養後のOrganoid (右)。
 B) 肺癌胸水3症例からのCTOS調製
 C) 肺癌CTOSをトリプシン-EDTAでシングル化し、3時間後、6時間後にアポトーシスをFACSで検出。
 D) CTOSおよびFlow through fractionのFACS解析。Solid line; specific antibody for EpCAM or CD45. Gray filled; isotype control.
 E) Original tumor (上段)またはCTOS (下段)の免疫染色。Scale bar: 75 μm

CTOSを構成する細胞を、フローサイトメトリーと免疫組織学的染色にて検討した。CTOSを構成する細胞は、ほぼすべてがEpCAM陽性の上皮細胞であり、CD45陽性の血球細胞は含まれなかった(図15D)。これに対して、Flow through分画にはEpCAM陽性細胞の他に、多数のCD45陽性細胞が含まれていた。免疫組織学的染色では、original tumorに α -SMA陽性のmyofibroblastやCD68陽性のmacrophageが含まれるのに対し、CTOSはE-cadherin陽性の上皮細胞のみで構成されていた(図15E)。これらのことから、CTOSは高い純度の上皮細胞で構成されていることが明らかとなった。

肺癌手術症例125例のうち、100例(80.0%)の検体よりCTOSの調製が可能であった(Table1)。また、肺癌胸水18例のうち8例(44.4%)からCTOSが得られた。失敗例の多くは、調製直後から癌細胞がほとんど存在しない検体であった。

肺癌CTOSを免疫不全マウスに移植すると、33.3%(6例/18例)の割合で移植腫瘍を形成した。得られた移植腫瘍は、由来する患者の臨床検体と同様の組織型を示した(図16A)。また、EGFR, CK7, TP53, NCAMなどの免疫染色性も、それぞれの患者検体とマウス移植腫瘍で維持されていた(図16B, and data not shown)。

TABLE 1. Success Rate of CTOS Formation from Lung Cancer Specimen

		Sample Number	CTOS Formation	Success Rate (%)
Surgical sample	Ad	82	64	78.0
	AdSq	6	6	100
	Sq	31	25	80.6
	Large	4	4	100
	Pleomorphic	2	1	50.0
Total		125	100	80.0
Pleural effusion	Ad	15	7	47
	AdSq	1	1	100
	Sq	2	0	0
	Total	18 (8) ^a	8 (8) ^a	44.4 (100) ^a

CTOS, cancer tissue-originated spheroid; Ad, adenocarcinoma; Sq, squamous cell carcinoma; AdSq, adenosquamous cell carcinoma; Large, large-cell carcinoma, Pleomorphic, pleomorphic carcinoma.
^aExcluding samples without any tumor fragments after filtration of the pleural effusion

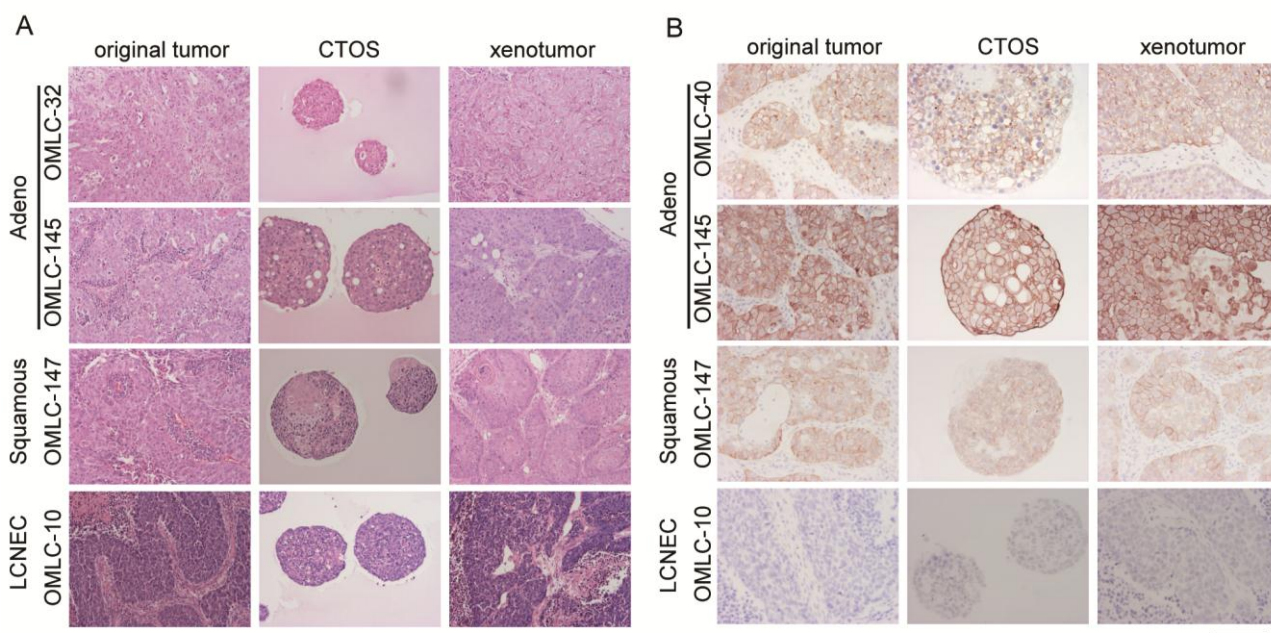


図16. CTOS移植腫瘍は由来患者腫瘍と同様の組織型を示す。Original tumor(左)、CTOS(中)、マウス移植腫瘍(右)のHE染色(A)とEGFR染色性(B)。Scale bar: 100 μ m

肺癌CTOSのin vitroにおける培養条件を検討したところ、Matrigel Growth Factor Reducedに包埋し、StemPro® hESC中で培養した場合が最もよく増殖することが判明した。この条件を利用して、我々は、肺癌CTOSを分子標的治療薬感受性試験に応用することを試みた。肺癌では、EGFR TKIであるゲフィチニブ、エルロチニブが臨床的に用いられている。10症例より得られた肺癌CTOSを用いてin vitroエルロチニブ感受性試験を行ったところ、症例間でエルロチニブ感受性に差が認められた（図17A）。感受性の高い5症例のうち、3症例はEGFRの恒常的活性化を引き起こす遺伝子変異（L858R、G719C）を、1症例はEGFRの遺伝子増幅を持つ症例であった。CTOSの利点の一つは、臨床検体を用いて細胞内シグナルを解析することができることである。我々は、この肺癌10症例のCTOSのEGFRシグナルをウエスタンブロット法にて解析した（図17B）。EGFRの遺伝子変異を持つ症例（OMLC-44, 65, 53）、およびEGFRの遺伝子増幅を持つ症例（OMLC-145）は、増殖因子非存在下においてもEGFRのリン酸化が認められ、EGFRの恒常的な活性化が示された。これらの症例ではEGFR下流のAKTおよびERKも恒常的に活性化しており、エルロチニブの添加によってリン酸化が抑制された。一方、OMLC-149はエルロチニブに高感受性を示す（図17A）が、EGFR遺伝子変異も遺伝子増幅もない症例である（図17C）。この症例は、増殖因子非存在下ではEGFRのリン酸化は観察されなかった（図17B）。しかし、他のEGFR wtの症例と異なり、AKTとERKのリン酸化はエルロチニブ添加後顕著に抑制された。

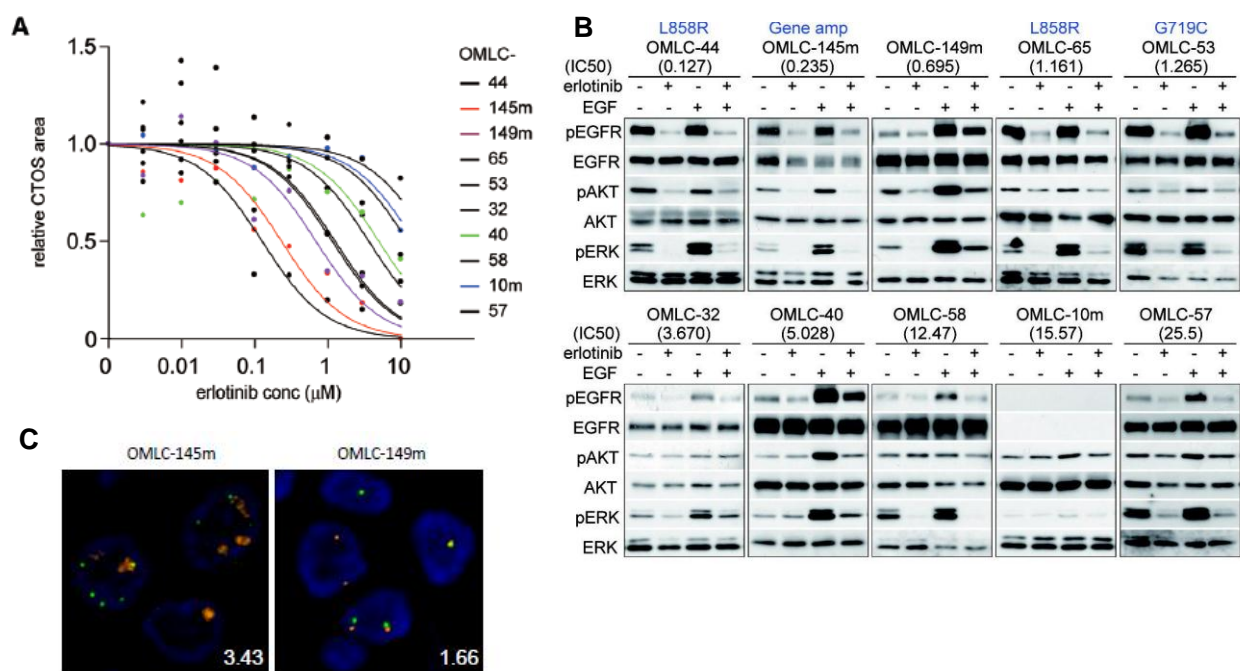


図17. 肺癌CTOSを用いたエルロチニブ感受性試験

- A) 肺癌CTOS 10症例のin vitroエルロチニブ用量反応曲線。CTOSをエルロチニブ含有培地で7日間培養し、CTOS面積の変化で評価した。
- B) EGFRシグナルのウエスタンブロット。CTOSを増殖因子非存在下でO/N培養し、エルロチニブ1 μMを添加して1時間培養後、10ng/mLのEGFで15分間刺激した。
- C) OMLC-145mおよびOMLC-149mのFISH解析。Orange = EGFR, Green = chromosome 7 centromere

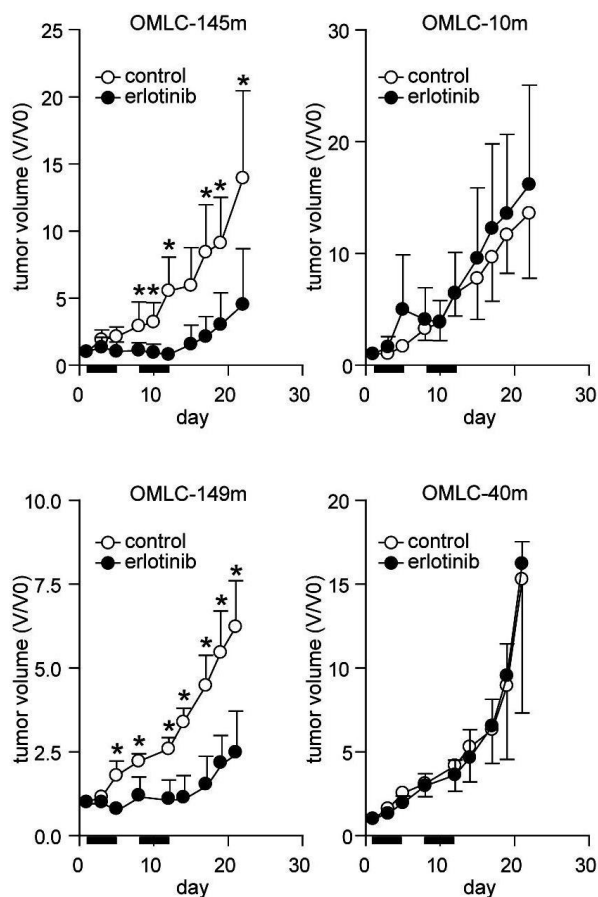


図16 CTOS移植腫瘍のエルロチニブによる治療

肺癌CTOS4症例のin vivoエルロチニブ治療効果。NOD/scidマウスにCTOSを移植し、エルロチニブを経口投与(1日1回、5日/週、2週間 図中黒アンダーバー)し、投与前の腫瘍容積と比較した(V/V0)。

OMLC-145m; EGFR gene amplification
 OMLC-10m; EGFR-nonexpresser
 OMLC-149m; EGFR-wt
 OMLC-40m; EGFR-wt

続いて、in vitroのエルロチニブ感受性試験が、in vivoの治療応答性を反映しているかどうかを検討した。4症例のCTOS OMLC-145 (EGFR遺伝子増幅、エルロチニブ高感受性)、OMLC-10 (EGFR非発現、エルロチニブ抵抗性)、OMLC-149 (EGFR wt、エルロチニブ高感受性)、OMLC-40 (EGFR wt、エルロチニブ抵抗性)をNOD/scidマウスに移植して腫瘍を形成させ、エルロチニブを経口投与し、その治療効果を比較した(図16)。その結果、in vitroの試験で高感受性を示した2症例はエルロチニブによって腫瘍増殖が抑制され、一方in vitroで抵抗性を示した2症例はin vivoにおいてもエルロチニブの効果は認められなかった。以上のことから、in vitroのエルロチニブ感受性試験はin vivoの治療応答性を反映していることが示された。

3-2. 肺癌CTOSの増殖に必須な増殖因子の探索

StemPro® hESCに含まれる増殖因子のうち、どの増殖因子が最も肺癌CTOSの増殖に寄与したかを検討した。StemPro® hESCに含まれるneuregulin 1 (NRG1)、long-IGF1、bFGF、およびactivinに加えて、肺癌で臨床的に重要なEGFを増殖因子非含有の基本培地に添加して、CTOSのin vitroにおける増殖を検討した(図17)。その結果、71.4% (10例/13例)の症例において、NRG1が最もCTOSの増殖を促進した(図17、and data not shown)。

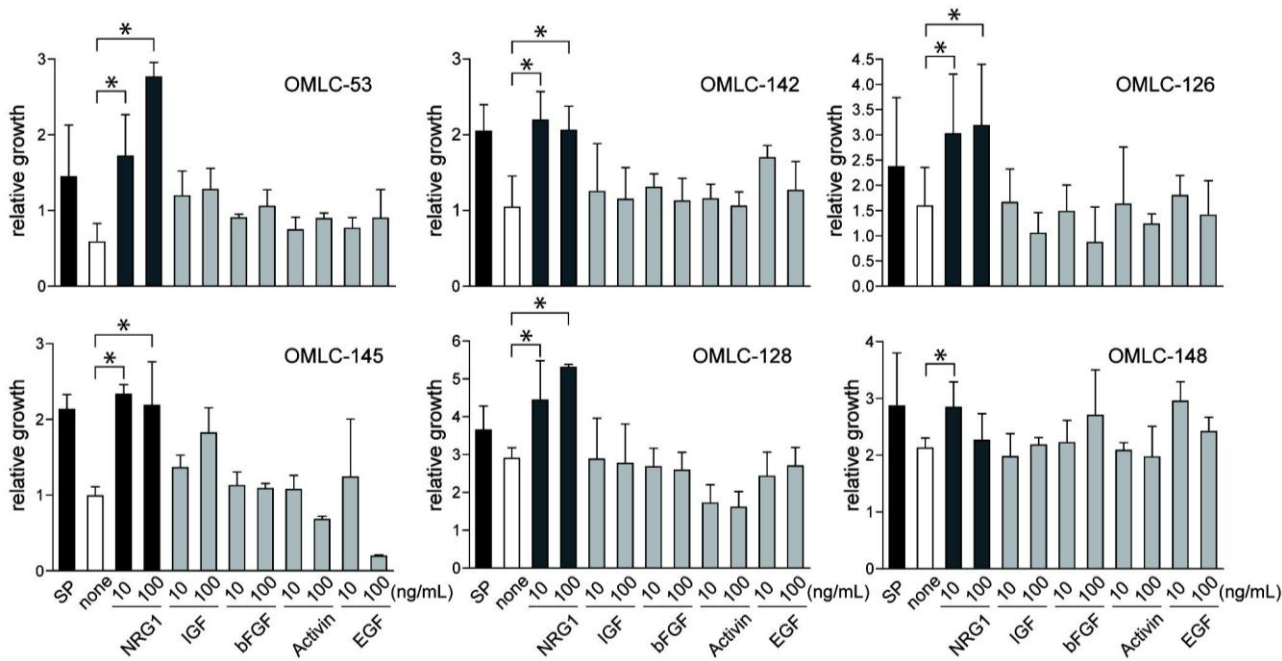


図17. 各増殖因子による肺癌CTOSの増殖

肺癌CTOS6症例をStemPro (SP)、増殖因子非存在下 (none)、NRG1、long-IGF (IGF)、bFGF、Activin、EGF 10ng/mLまたは100ng/mL存在下で7日間培養し、CTOS面積増大率で評価した。

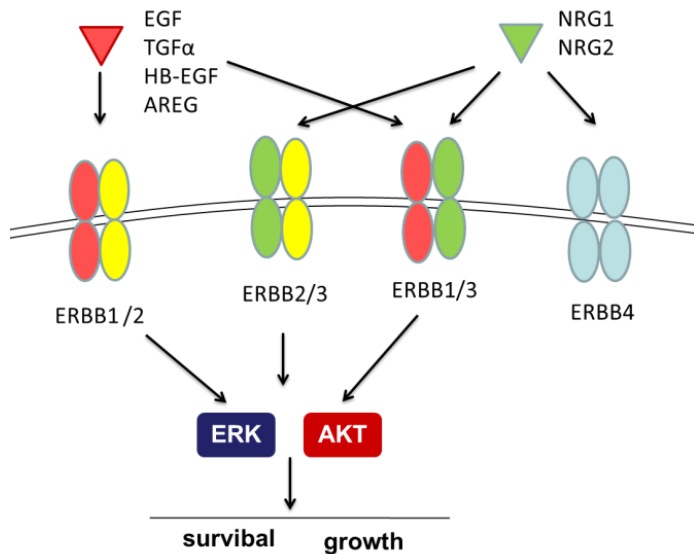


図18. ERBBファミリーreceptor tyrosine kinase
 EGF: epidermal growth factor
 TGF α : transforming growth factor
 HB-EGF: Heparin-binding EGF-like growth factor
 AREG: amphiregulin
 NRG: neuregulin

NRG1はEGFRファミリーreceptor tyrosine kinaseの一つ、ERBB3 (HER3) のリガンドである。ERBB3はチロシンキナーゼ活性を持たないが、他のRTKとヘテロダイマーを形成することにより細胞内シグナルを伝達する (図18)。ERBB3は細胞内ドメインに6つのPI3K P85結合部位を持つため、下流のシグナルを強く活性化することができる (Hynes 2005 Nat Rev Cancer)。特に、ERBB2/3のヘテロダイマーが最も強く細胞内シグナルを活性化すると報告されている。

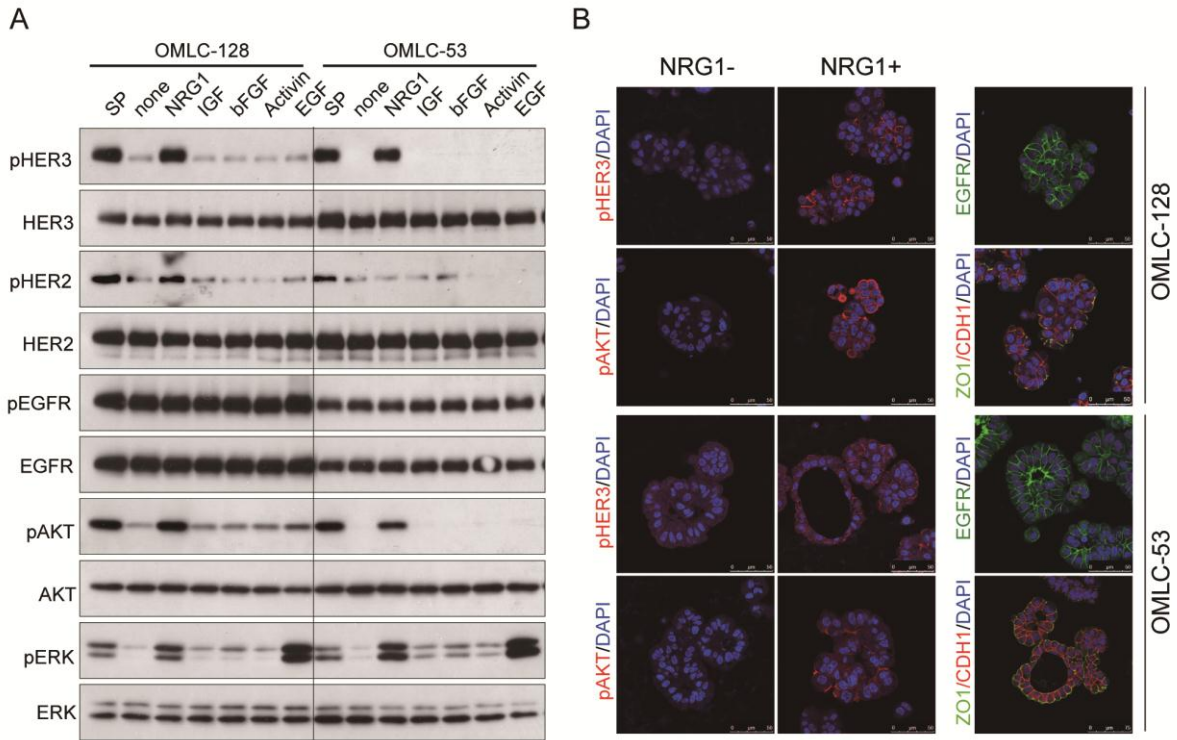


図19 各増殖因子によるCTOSの細胞内シグナルの活性化

A) CTOSを増殖因子非存在下でO/N培養し、各増殖因子10ng/mLで15分間刺激した後、細胞内シグナルをウエスタンブロット法にて検出した。

B) NRG1刺激後、6時間(pHER3)または1時間(pAKT)の細胞内シグナルを免疫染色にて検出した。

CTOSを用いて各増殖因子刺激後の細胞内シグナルをウエスタンブロット法にて検討したところ、NRG1が最も強くAKTのリン酸化を誘導した(図19A)。続いて、免疫染色にてNRG1刺激後の細胞内シグナルを観察した。OMLC-53のCTOSは、EGFRやZo1の染色で示されるように、apical側が外を向いた極性を示す(図19B)。NRG1刺激後、HER3およびAKTのリン酸化は、baso-lateral側に強く認められた。

最後に、HER3に対する中和抗体を用いてCTOSの増殖抑制効果を検討した。NRG1またはStemPro® hESC中のCTOSの増殖、および細胞内シグナルの活性化は、抗HER3中和抗体の濃度依存的に低下した(図20A、B)。このことから、肺癌CTOSの増殖にNRG1/HER3シグナルが重要な役割を果たすことが示された。

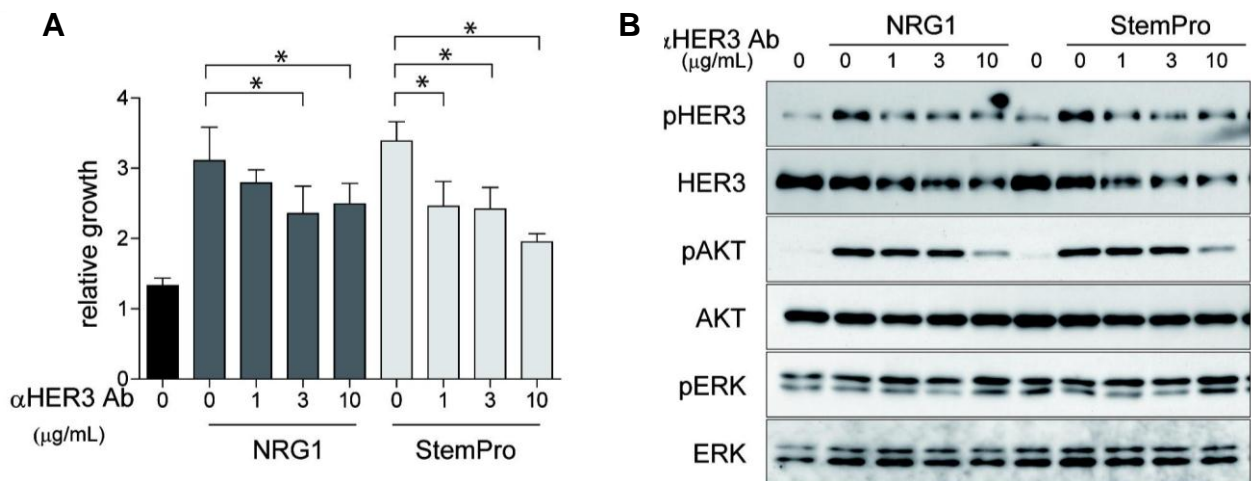


図20. 抗HER3中和抗体によるCTOS増殖および細胞内シグナルの抑制

- A) 10ng/mL NRG1存在下または、StemPro培養下のOMLC-128 CTOSに抗HER3中和抗体を添加し、7日間のCTOS面積増大抑制効果で評価した。
- B) 抗HER3中和抗体存在下、10ng/mL NRG1またはStemProでOMLC-128 CTOSを刺激後24時間の細胞内シグナルをウエスタンブロット法にて検出した。

<考察 3>

肺癌初代培養系の確立は長年にわたり試みられており、その代表的な方法が組織培養法 (histoculture) または分散化法 (dissociation-based culture) である。組織培養法では、腫瘍組織を小断片に細分化した後、直接 (Basak 2009 PLoS ONE, Mancini 2011 PLoS ONE) またはゲルに包埋して (Vescio 1990 PNAS, Yoshimasu 2009 Gen Thorac Cardiovasc Surg) 培養した。分散化法では、腫瘍組織を酵素処理して単細胞または少数のaggregateにまで分散させ、dish上 (Pfragner 2004 Wiley-Liss) またはゲル中に包埋して (Kobayashi 1997 Int J Oncol, Higashiyama 2010 Lung Cancer) 培養した。これらの方法では、培養細胞の中に腫瘍細胞以外の宿主細胞が多く混在する。これに対して、新しい癌細胞初代培養法 (CTOS法) は、高い生存率と純度で肺癌の初代培養が可能となった。また、CTOS法の培地StemPro® hESCに含まれる増殖因子は既知のものであり、再現性良くCTOSの培養が可能である。この点は、薬剤感受性試験やシグナル応答を解析する上で非常に重要である。一方で、免疫系細胞やcancer associated fibroblast (CAF) などの癌微小環境を構成する細胞は、癌細胞の生存や治療抵抗性に寄与することが知られている (Bremnes 2011 J Thoracic Oncol)。CTOSは純粋な癌細胞の集団なので、免疫系細胞やCAFとの共培養することによって、これら癌微小環境の影響を調べる事が可能になる。

肺癌CTOS調製の成功率は80.0%と、大腸癌の98.7%と比べると低い数字であった (Kondo 2011 PNAS)。これは、大腸癌組織に比べて肺癌組織の癌細胞含有率が低いからではないかと考えられた。CTOSが得られなかった失敗例のうち、多くが調製直後から組織断片がほとんど回収できない症例であった。肺組織はエラスチンを多く含有するため、コラゲナーゼ処理に加えてエラスターゼで組織を分散させることにより、

癌細胞の回収率を改善させることができる可能性がある。また、免疫不全マウスへの肺癌移植腫瘍形成率は33.3%と、大腸癌に比べて非常に低い成功率であった。肺癌、特に肺腺癌の細胞は、その支持体として肺組織を必要としている可能性があり、マウスの皮下では腫瘍を形成に必要な環境が整っていないと考えられた。もしくは、大腸がん比べて肺癌の血管新生能が低く、癌細胞の増殖に必要な増殖因子、栄養素等が十分に供給されないため、腫瘍形成率が低い可能性も考えられた。

癌幹細胞 (Cancer Stem Cell) 理論は、近年盛んに研究されてきた分野である。これは、癌組織中の癌細胞は一様な細胞集団ではなく、ごく少数の細胞 (Stem Cell) が造腫瘍能や薬剤耐性能をもち、治療抵抗性、再発、転移の原因となるという理論である (Nguyen 2012 Nat Rev Cancer)。癌幹細胞とCTOSは、①浮遊培養でspheroidを形成する、②特定の増殖因子を含む血清非含有培地で増殖する、③マウスに腫瘍を形成する、などのいくつかの共通点を有する。しかし、我々はCTOSと癌幹細胞由来spheroidは全く別個のものであると考える。肺癌ではCD133が癌幹細胞の細胞表面マーカーであるとの報告があるが

(Eramo 2008 Cell Death Differ)、我々の実験ではCD133の陽性率は検体によって大きく異なり (data not shown)、さらにオリジナルの腫瘍とCTOSでCD133陽性率が維持されていることから、CTOSで癌幹細胞がenrichされているとは言い難い。また、癌幹細胞由来spheroidは分化形質が低い報告されているが

(Eramo 2008 Cell Death Differ)、CTOSではcytokeratinの染色やNCAMの染色性がオリジナルの腫瘍と同様に保持されている。以上のことから、CTOSは少数の癌幹細胞由来のspheroidではなく、癌組織の全体的な性質を代表した細胞集団であると考えられた。

CTOSはin vitroおよびin vivoのエルロチニブ感受性試験に応用可能であり、細胞内シグナルの検討も可能であった (図17)。臨床の現場では、EGF TKIの使用はEGFR遺伝子に遺伝子変異をもつ症例に限られるが、一方でEGFR wtの中にもエルロチニブ感受性を示す症例が存在することが知られている。本研究で用いた10症例の中にも、1例ではEGFR wtであるがエルロチニブに高感受性を示した (OMLC-149、図17)。CTOS法を用いた感受性試験が、従来の遺伝子検査による分子標的治療薬の効果予測に加えて、新たな適応患者の選択に役立つことが示唆された。CTOSのアッセイと臨床治療成績を比較する臨床試験で検証する必要がある。

肺癌CTOSの増殖に寄与する増殖因子を検討したところ、HER3のリガンドであるNRG1が最も強くCTOSの増殖を促進した (図17)。NRG1は呼吸器系組織の恒常性維持にも重要な役割を果たしている。NRG1およびHER3は正常の肺胞上皮細胞に恒常的に発現しているが、NRG1はapical側に、HER3はbasal側に発現しているため、通常はリガンド-受容体の結合は起こらない。しかし、肺胞上皮細胞が障害を受けて極性が乱れた場合、NRG1がHER3に結合して速やかに細胞内シグナルを活性化し、組織の再生に役立つと報告されている (Vermmer 2003 Nature)。肺癌細胞は、この正常組織のwound-healingシステムを利用して増殖している可能性が考えられた。

肺腺癌由来CTOSはNRG1に高い応答性を示したが、扁平上皮癌由来CTOSはNRG1応答性が低かった

(図17)。扁平上皮癌のCTOS培養は、更なる条件の改善が必要であると考えられた。

NRG1は肺腺癌の増殖を著しく増加させたが、抗HER3抗体によって増殖が完全に抑制されることはなかった(図20)。これは、肺癌CTOSが極性を持つため、抗体がタイトジャンクションを通過することができず、効果がCTOS表面に限定されたためではないかと考えられた。

肺癌におけるHER3シグナルの重要性はEGFR 活性型変異で特に注目されており、EGFRによるPI3Kの活性化にHER3が必要であること(Engelman 2005 PNAS)、HER3-METのヘテロダイマーがEGFR TKI耐性に関与していること(Engelman 2007 Science)などが報告されている。本研究においては、EGFR wtのCTOSもNRG1によって増殖が促進されることから、NRG1-HER3シグナルは肺癌においてより一般的な増殖促進シグナルであることが示唆された。

CTOS法は患者個々人の薬剤感受性を予測する個別化医療へつながるだけでなく、肺癌のbiologyの研究プラットフォームとして有用であると考えられた。

<結論>

癌細胞は低酸素やアシドーシスのような微小環境において様々なストレス応答を行うことによって、生存あるいは悪性化している。癌細胞のストレス応答を研究し、治療標的とすることは癌の根治に向けた重要なアプローチであると考えられる。しかし、大過剰の酸素、栄養素、増殖因子下で樹立された癌細胞株の多くは低酸素環境下でも常酸素下と同様の細胞増殖、細胞応答を示し、患者体内の微小環境を再現することができない。我々が開発した新しい癌細胞初代培養法(CTOS法)は、細胞-細胞間相互作用、細胞極性、そして癌のheterogeneityを再現できる実験系である。このCTOS法を利用することで、より臨床の癌に近い実験モデルで癌細胞のbiologyを研究し、新たなバイオマーカーや治療標的を探索する。

〈謝辞〉

本研究に際し、終始御指導、御助言を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科 環境病因病態学分野、井上正宏教授に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、直接の御指導、御助言を賜りました、大阪府立成人病センター生化学部門、向井睦子主任研究員に深く感謝致します。

研究全般におきまして、多方面にわたり数多くの御助言、御協力を賜りました大阪府立成人病センター生化学部門および病理学部門の皆様に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、臨床腫瘍検体を御供与下さいました、大阪府立成人病センター 外科 岡見次郎先生、東山聖彦先生、呼吸器内科 熊谷融先生、内田純二先生、今村文生先生に深く感謝致します。

本論文を審査していただきました、本研究科、藤尾慈教授、辻川和丈教授、堤康央教授に深く感謝致します。

<引用文献>

- (1) Paez-Ribes M et al. *Cancer Cell* 2009; 15: 220-31
- (2) Comerford KM *Cancer Res* 2002; 12: 3387-94
- (3) Shoemaker RH. *Nat Rev Cancer* 2006;6:813-23
- (4) Kondo J et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:6235-40
- (5) Yang L et al. *Cancer Res* 2003; 63: 6815-24
- (6) Vertelov G et al. *Stem Cell Res and Ther.* 2013; Epub ahead of print
- (7) Zhang S et al. *Neurochem Res* 2012; 37: 2659-2666
- (8) Imamura F et al. *Cancer Res* 1990; 50: 2018-21
- (9) Wild-Bode C et al. *Cancer Res* 2001; 61: 2744-50
- (10)Woo M et al. *Genes Dev.* 1998; 12: 806-19
- (11)Algeciras-Schimmich A *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 721-6
- (12)Amano T et al. *Biochem J* 2001; 354: 149-59
- (13)Imamura F et al. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 811-6
- (14)Ito K et al. *Nat Med* 1999; 5: 221-5
- (15)Sebbagh M et al. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 346-352
- (16)Riento K et al. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 446-456
- (17)Semenza GL *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-32
- (18)LeRoith D *Cancer Lett* 2003; 195: 127-37
- (19)Arsham AM et al. *J Biol Chem* 2003; 278: 29655-60
- (20)Hamanaka Y et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 318-26
- (21)Baserga R et al. *Int J Cancer* 2003; 107: 873-7
- (22)Yang E et al. *Cell* 1995; 80: 285-91
- (23)Feldman DF et al. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 597-605
- (24)Oyadomari S et al. *Cell Death Differ* 2004; 11: 381-9
- (25)Knezevic I. et al. *J Biol Chem* 2012; 287:12913-26
- (26)Liu W et al. *BMC Neuroscience* 2011; 12:64
- (27)Hochachka PW et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9493-8
- (28)Liu L et al. *Mol Cell* 2006; 21: 521-31
- (29)Kaufman RJ *Genes Dev* 1999; 13: 1211-33
- (30)Entingh AJ et al. *Endocrinology* 2001; 142: 221-8
- (31)Thomas R et al. *Ptostate* 2009; 69: 263-75

- (32)Joung YH et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 358: 773-8
- (33)Ron D et al. *Genes Dev* 1992; 6: 439-53
- (34)Matsumoto M et al. *FEBS Lett.* 1996; 395: 143-7
- (35)McCullough KD et al. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 1249-59
- (36)Marciniak SJ et al. *Genes Dev* 2004; 18: 3066-77
- (37)Raile K et al. *Horm Metab Res* 2003; 35: 786-93
- (38)Yang E et al. *Cell* 1995; 80: 285-91
- (39)Hongo A et al. *Cancer Res* 1998; 58: 2477-84
- (40)Bacon A et al *Ann Med* 2004; 36: 530-9
- (41)Lynch TJ et al. *N Engl J Med* 2004;350:2129-39.
- (42)Maemondo M et al. *N Engl J Med* 2010;362:2380-8.
- (43)Soda et al. *Nature* 2007 Aug 2; 448(7153):561-6
- (44)Hynes NE, Lane HA. *Nat Rev Cancer* 2005;5:341-54.
- (45)Basak SK et al. *PLoS ONE* 2009; 4: e5884
- (46)Mancini R et al. *PLoS ONE* 2011; 6: e21320
- (47)Vescio RA et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 691-695
- (48)Yoshimasu T et al. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 57: 138-143
- (49)Pfragner R et al. *Wiley-Liss* 2004; 1-21
- (50)Kobayashi H et al *Int J Oncol* 1997; 11: 449-455
- (51)Higashiyama M et al. *Lung Cancer* 2010; 68: 472-477
- (52)Bremnes RM et al. 2011 *J Thoracic Oncol* 2011; 4: 824-33
- (53)Bremnes RM et al. 2011 *J Thoracic Oncol* 2011; 1: 209-17
- (54)Nguyen JV et al. *Nature Rev Cancer* 2012; 12: 133-143
- (55)Eramo A et al. *Cell Death Differ* 2008; 15: 504-514
- (56)Vermeer PD et al. *Nature* 2003;422:322-326.
- (57)Engelman JA et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:3788-3793.
- (58)Engelman JA et al. *Science* 2007;316:1039-43.