

「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」
平成 20 年度採択研究代表者

佐谷 秀行

慶應義塾大学医学部先端医科学研究所遺伝子制御研究部門・教授

人工癌幹細胞を用いた分化制御異常解析と癌創薬研究

§ 1. 研究実施の概要

正常細胞から特定の遺伝子を用いて腫瘍を誘導し、その中に治療抵抗性を示す癌幹細胞を同定する。そしてこれら人工的に誘導した癌幹細胞 (iCSC) の特性を詳細に解析することによって、癌幹細胞およびニッチを標的とした新たな創薬を推進することが本研究のねらいである。本年度の研究によって、以下の所見を得ることができた。

1. マウス骨肉腫 iCSC を用いて未分化性を維持するためのニッチと考えられる因子の候補を見出した。
2. マウス白血病 iCSC の作製過程において腫瘍の基となる細胞 (cell-of-origin) が造血幹細胞であること、しかし *Ink4a/Arf* が不活化した細胞では分化していても腫瘍が生じることを明らかにした。
3. マウス脳腫瘍 iCSC を用いて、脳腫瘍細胞の脳内浸潤をリアルタイムでモニターすることに成功し、浸潤阻害剤のスクリーニングの基盤を作ることができた。
4. *Ink4a/Arf* や *p53* の変異を持たない正常マウス卵巣上皮細胞を用いて卵巣癌を誘導することに成功した。
5. *CD44* と *HMWHA* (高分子量ヒアルロン酸) の結合が癌幹細胞の未分化性維持に働いているという所見に基づき、その結合およびシグナルを遮断する分子の取得を *in vitro virus* (IVV) 法を用いて行い、候補となる分子及び抗体を得ることができた。
6. 骨肉腫 iCSC 細胞を *RNAi library* で処理し、iCSC の分化能あるいは腫瘍形成能を制御する分子を取得するための実験を開始した。

§ 2. 研究実施体制

(1) 「佐谷」グループ

① 研究分担グループ長:佐谷 秀行(慶應義塾大学、教授)

② 研究項目

- 胃癌モデルにおける CD44 の癌幹細胞維持機構
- 分化細胞からの癌幹細胞の樹立
- 人工骨肉腫癌幹細胞を用いた解析
- 人工白血病癌幹細胞を用いた解析
- 分化度の変化と腫瘍形質の関連解析
- 人工脳腫瘍幹細胞を用いた解析
- 化合物ライブラリーの構築、薬剤スクリーニング

(2)「柳川」グループ

① 研究分担グループ長:柳川 弘志(慶應義塾大学、教授)

② 研究項目

- 癌幹細胞の機能解析と抗ニッチ創薬
- 癌幹細胞の分化の制御ネットワーク解析

(3)「高子」グループ

① 研究分担グループ長:高子 徹(第一三共株式会社、所長)

② 研究項目

- RNAi library を用いた分子スクリーニング

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

1) 癌幹細胞未分化性維持機構の解明

【目的】我々はマウス骨髄ストローマ細胞から *c-Myc* 過剰発現、*Ink4a/Arf*^{-/-}の条件により骨肉腫 iCSC AX 細胞を樹立した¹⁾。この細胞はクローンから派生したにも関わらず *in vivo* で形成する腫瘍は、未分化部分、最終分化像(骨形成部、軟骨形成部)を含み、分化の階層性を示す。腫瘍の進展に重要な、未分化で増殖能をもつ細胞は治療の標的であると考えられる。そこで我々はこの骨肉腫幹細胞の未分化性維持に関わる機構の解明を目的に実験を行った。

【方法、結果】①我々はまず腫瘍の微小環境が癌幹細胞の未分化性を維持する可能性に注目した。腫瘍組織を、周辺正常組織を含めて採取し *single cell* に分画したところ、①腫瘍細胞 (AX)、②血液細胞(マクロファージ)、③ストローマ細胞が得られた。微小環境構成細胞であるマクロファージ、ストローマ細胞が分泌する液性因子、及び AX 細胞が発現するレセプターに注目したところ3つの因子(A, B, C)が候補として考えられた。これらはいずれも *in vitro* の骨分化

assay (Alizarin RedS 染色)において、分化を抑制することが明らかとなった。このうち因子 A は最も強力に骨分化を抑制し、腫瘍の増殖も亢進させることから *in vivo* において骨肉腫幹細胞のニッチを構成する重要な因子である可能性が示唆される。

2) Myc 誘導性前駆 B 細胞性白血病・リンパ腫の起源細胞の同定

【目的】骨髄由来の造血系未熟細胞に N-Myc 遺伝子導入によって成立した前駆 B 細胞性白血病・リンパ腫 (precursor B lymphoblastic leukemia/lymphoma: pre-B LBL) の起源細胞の同定と、分化した細胞から発癌可能か否かについて検討を行った。

【方法、結果】N-Myc を導入した骨髄細胞を造血幹細胞、リンパ性前駆細胞・骨髄系前駆細胞にソートし限界希釈法にてそれぞれの腫瘍形成能を調べた。その結果、造血幹細胞から非常に高頻度 (1:184) に腫瘍が形成した一方、リンパ性前駆細胞 (1:558)、骨髄性前駆細胞 (1:9286) では腫瘍形成能が低下することがわかった。つまり、N-Myc を発現した造血幹細胞が iCSC となり pre-B LBL を形成することがわかった。更にコミットした前駆 B 細胞から直接腫瘍が形成するかどうか検討を行ったところ、野生型の前駆 B 細胞からは全く腫瘍が形成されなかったのに対し、腫瘍抑制因子である Ink4a 及び Arf 遺伝子を欠損した前駆 B 細胞からは腫瘍が直接形成されることがわかった。これらの結果から、より分化した細胞は Ink4a 及び Arf 遺伝子が N-Myc 発現による iCSC への誘導を防御していることが示唆された。今後、造血幹細胞由来の腫瘍細胞及び、Ink4a 及び Arf 欠損前駆 B 細胞由来の腫瘍細胞における薬剤抵抗性や発現遺伝子解析を行うことで将来的に診断マーカーや治療標的となり得る分子の同定を実施していく。

3) CD44 陽性腫瘍細胞の性質の解明

【目的】本研究は、癌幹細胞マーカー CD44 陽性癌細胞の性質の解明と CD44 の機能阻害による癌治療戦略を考案することを目的として行った。

【方法、結果】①胃癌幹細胞の候補として考えられている CD44 陽性胃癌細胞について、その性質を明らかにするため、正常マウスおよび胃癌自然発症モデル *K19-Wnt1/c2mE* マウスを用いて解析した。その結果、正常なマウスの胃において、扁平上皮と腺上皮の境目の領域 (squamo-columnar junction; SCJ) には、少数の CD44 陽性細胞を含む胃腺が存在していることを見出した (図1)。また、この CD44 陽性細胞は、癌組織で高発現することが知られている CD44 バリエントフォームを発現していることや、増殖マーカーを発現しないことが分かった (図1)。

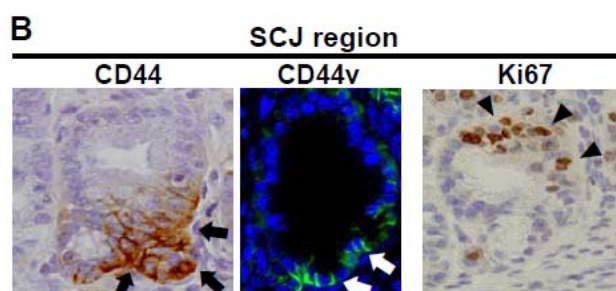


図1 正常マウス胃 SCJ 領域に存在する CD44 陽性細胞

次に、この細胞が、どのような細胞であるかについて検討した。組織幹細胞の多くは、静止期に

あるかあるいは非常にゆっくりと増殖する性質を有することが知られており、

5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を取り込ませて標識すると、その BrdU 標識は幹細胞に長期間保持されることが知られている。

そこで SCJ 領域に存在した CD44 陽性細胞においてこの幹細胞様性質の有無を調べるために、BrdU 標識を行うと、CD44 陽性細胞は、周囲の CD44 陰性細胞と比較して長期間に渡り BrdU を保持する能力を有していることがわかった。このことから、胃

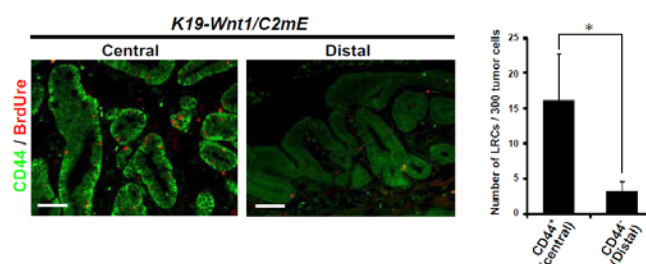


図2 マウス胃癌組織における幹細胞様性質を有する CD44 陽性胃癌細胞の存在

幹細胞あるいは前駆細胞としての性質を有していることが示唆された。そこで次に、*K19-Wnt1/c2mE* マウスの胃腫瘍で CD44 陽性癌細胞について同様に BrdU 標識を行い検討した結果、腫瘍において認められる BrdU 長期保持細胞の大部分は CD44 陽性であることが分かった(図2)。すなわち、マウス胃癌細胞のうち CD44 陽性群に幹細胞様細胞の多くが含まれていることが分かった。以上より *K19-Wnt1/c2mE* マウスに生じる胃癌は正常マウス胃 SCJ 領域に存在する胃幹細胞あるいは前駆細胞と考えられる CD44 陽性細胞の癌化に伴う拡大によって発生すると考えられた³⁾。

4) 癌抑制遺伝子 p53 の発現抑制によるマウス卵巣上皮細胞の形質転換と卵巣癌幹細胞の作成

【目的】本研究は、卵巣癌の発生母地と考えられている卵巣上皮細胞に癌遺伝子を導入することでマウス卵巣癌幹細胞を樹立することを目的として行った。

【方法、結果】癌化を抑制することが知られている p53 は正常上皮細胞への癌遺伝子導入の際にも活性化され、人工癌幹細胞の作成において障害となっている。一方で p53 は細胞分化にも関係しており、これまでに報告されているマウス卵巣癌モデルでも p53 遺伝子の不可逆的な不活化によって作成した場合、ヒトの卵巣癌で見られるような分化した組織構築を取らず、未分化癌を形成することが分かっている。また、p53 が正常である細胞株では癌幹細胞を頂点とした階層性の性質をもたないことが我々の解析で明らかになっている²⁾。そこで、我々はヒトの卵巣癌に類似したマウス癌モデルの作成を目的とし、p53 の発現を一時的に抑制した後、癌遺伝子

In vivo imaging of induced ovarian cancer

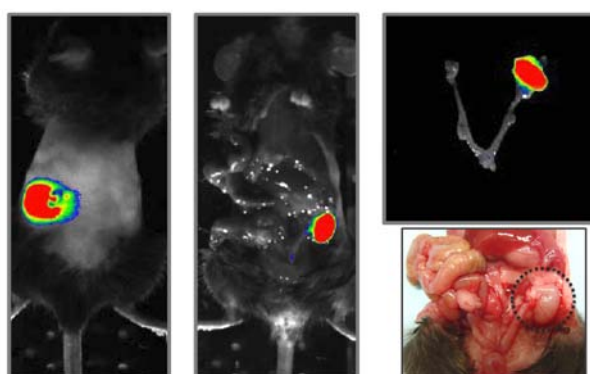


図3 マウス卵巣癌細胞より作成した卵巣癌の生体内イメージング(Integrinsense 750 使用)

に類似したマウス癌モデルの作成を目的とし、p53 の発現を一時的に抑制した後、癌遺伝子

導入し、卵巣上皮細胞を形質転換できるかを検討した。まず、EpCAM 陽性卵巣上皮細胞をFACSにて分離し、その後 p53 の発現を一時的に抑制させた。さらに癌遺伝子である c-Myc および活性型 K-Ras を、レトロウイルスベクターを用いて感染させた。その結果、正常卵巣上皮細胞を癌化させることに成功した。

この作成した癌細胞をマウスの卵巣へ移植すると、全例で致死性の卵巣癌が生じることを見出した(図3)。さらに、このマウスに生じた卵巣癌細胞を腫瘍から分離し、別のマウスに二次移植を行うと同様の卵巣癌を新たに形成することができることから、自己複製能を有する卵巣癌幹細胞を含んでいることも明らかになった。さらに、免疫組織学的検討から、このマウス卵巣癌の組織像はヒトの卵巣癌のうち、漿液性腺癌と類似した特徴を有していることが分かった。以上の結果、p53 の siRNA を用いて一時的な発現抑制を行うことで、正常な卵巣上皮細胞に対して癌遺伝子の導入が可能となり、人工卵巣癌幹細胞を作製することが出来た。

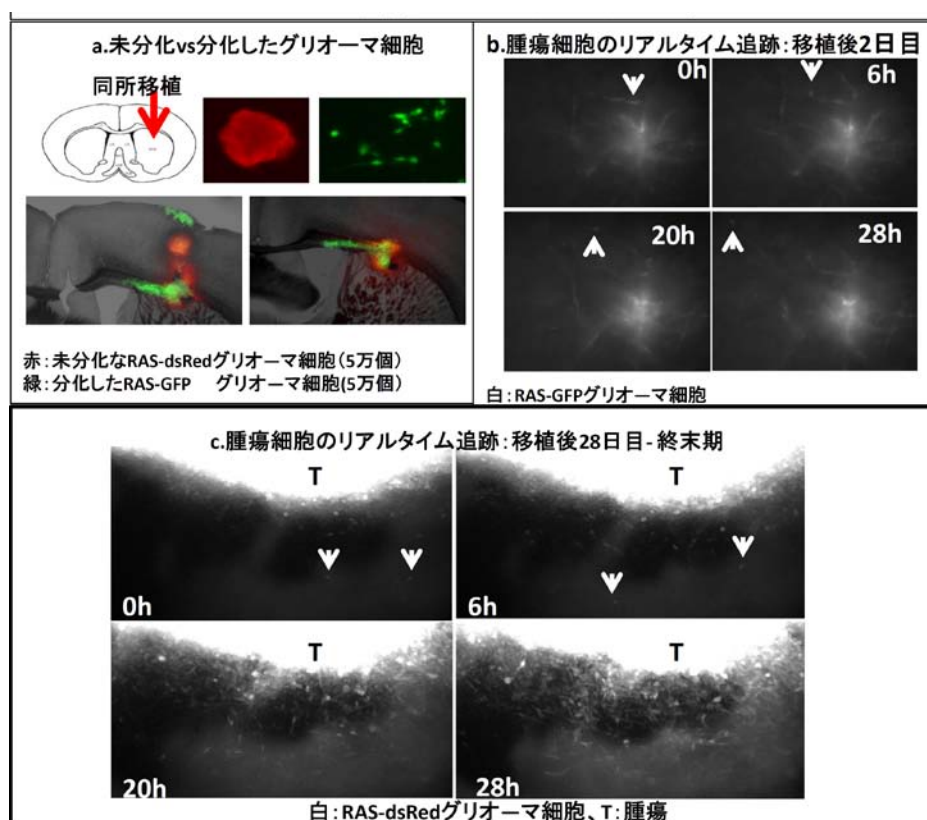


図4 脳切片培養を用いた腫瘍細胞浸潤の解

5) グリオブラストーマ iCSC モデルを用いた浸潤性克服戦略の開発

【目的】本研究は、悪性脳腫瘍グリオブラストーマ iCSC モデルを使用し、腫瘍形成及び浸潤過程を可視化することにより、浸潤がもっとも高い時期・細胞を同定し、新たな抗浸潤療法を考案することを目的として行った。

【方法、結果】私達は INK4a/Arf^{-/-}マウス由来の神経幹細胞分画に H-Ras を過剰発現させ、形質転換した幹細胞をマウスの前脳に同所移植を行ったところ、全例でヒトのグリオブラストーマに近い組織像を呈する脳腫瘍を形成することに成功した⁴⁾。さらに、このモデルで H-Ras と同時に GFP が発現することを利用し、脳切片培養を用いて腫瘍細胞の追跡を行い、腫瘍形成及び浸潤の経時的な解析を行った(図4)。

腫瘍細胞の異型・増殖が移植 3 週間後より著明になったのに対し、グリオーマ細胞の正常脳への浸潤は移植翌日より始まり、終末期の 5 週目までの全段階で確認された。脳梁方向への浸潤が特に高率に認められ、また、白質線維及び血管に沿って遊走した腫瘍細胞は複数の増殖巣をつくることが明らかになった。さらに、運動能には分化度による明らかな差もみられず、浸潤能の低い腫瘍細胞は観察されなかった。

6) CD44-HMWHA (高分子量ヒアルロン酸) のニッチ機構解析と抗ニッチ創薬

6-1) CD44ICD に結合する分子の選択と検証

【目的】CD44 と HMWHA (高分子量ヒアルロン酸) の結合が上皮間葉転換⁵⁾および癌幹細胞の未分化性維持に働いているという知見に基づき、*in vitro virus* (IVV)法を用いてその結合およびシグナルを遮断する分子の取得を目指す。

【方法、結果】ヒト・グリオーマ細胞(U251MG)由来の cDNA から IVV スクリーニングにより得た CD44 細胞内ドメイン(CD44ICD)に結合する候補タンパク質群について、細胞内での相互作用を共免疫沈降実験により調べた。その結果、TPA 処理により遊離された CD44ICD と、基本転写因子と転写制御因子の機能を持つことが知られている結合因子 A、サイクリンキナーゼ活性化因子である結合因子 B、および E3 ユビキチンリガーゼとしての機能が知られている結合

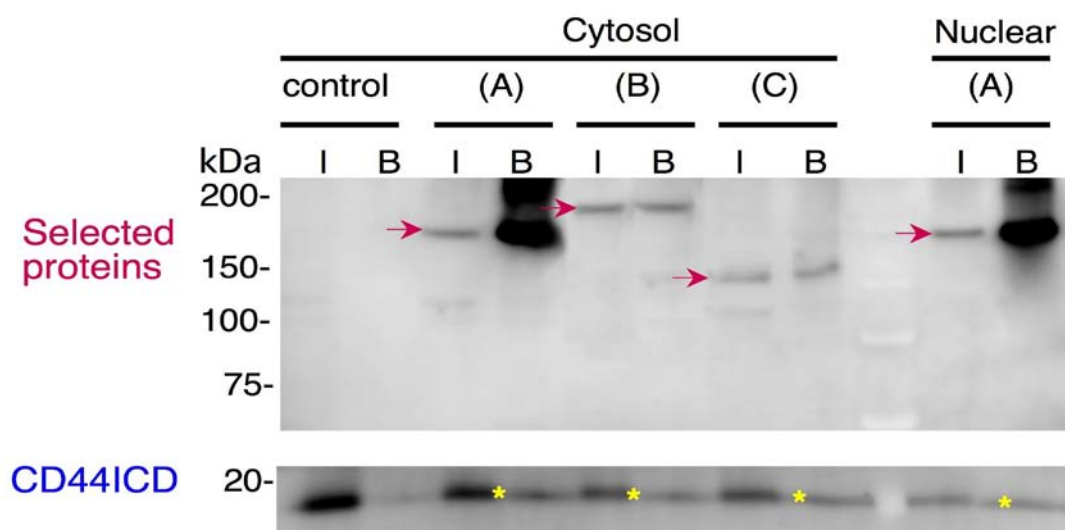


図5 CD44ICD と結合候補因子との免疫沈降

I, Input cell lysates; B, Beads-bound proteins.

因子 C の 3 種類が、細胞内でそれぞれ相互作用し得ること、そのうち結合因子 A は核内においても相互作用することを突き止めた(図 5)。結合因子 A は c-fos プロモーターに結合し、転写活性化する機能が知られている。また CD44ICD は TRE および CBP/p300 を介して transactivation の機能をもつことが知られている。CD44ICD の transactivation は結合候補 A を介して機能している可能性が考えられる。加えて、結合因子 A は HDAC とも相互作用することが知られており、CD44ICD のクロマチンリモデリングとの関連性が示唆される。

さらに CD44ICD の分子ネットワークを解明する目的で、人工癌幹細胞である AX 細胞より調製した cDNA ライブラリーから CD44ICD に結合する分子のスクリーニングを新規開発したマイクロ流体チップを用いた IVV 法により行った。その結果、クロマチンリモデリング因子のひとつが選択された。プルダウン実験によってタンパク質レベルで、CD44ICD との結合を確認し、さらに競合実験においてその結合は選択的であることがわかった。CD44ICD のクロマチンリモデリングへの関与は大変興味深い知見である。その他にも、CD44ICD に結合するタンパク質としては、受容体型チロシンキナーゼの下流の Ras から MAP キナーゼに至る経路上の制御タンパク質、Ca²⁺リザーバー関連、および基本転写因子のタンパク質群が候補として選択されてきた。これらの結果は、CD44ICD の細胞内シグナル伝達や核内の転写への関与を強く示唆しており、大変興味深い。

6-2) iCSC に特異的に結合する抗 CD44 抗体のスクリーニング

【目的】マウス脾臓より抽出した mRNA を鋳型として一本鎖抗体 cDNA ライブラリーを構築し、IVV 法により CD44 と高分子量ヒアルロン酸(HMWHA)との結合を特異的に阻害する一本鎖抗体のスクリーニングを行い、高親和性の抗ニッチ抗体の取得を目指す^{6,7)}。

【方法、結果】一本鎖抗体の IVV ライブラリー存在下 HMWHA コーティングプレート上に接着できない AX 細胞から IVV を回収する方法でスクリーニングを行った後、さらに CD44 の細胞外領域をマイクロ流体チップに結合させて抗 CD44 抗体のスクリーニングを行った。計 6 ラウンドスクリーニングした結果、32 個のクローン内の 4 種類の重複した配列を得た。この内の 2 つのクローン (AXD6-12-54、AXD6-12-51) は、AX 細胞の HMWHA コーティングプレートへの接着を阻害した。阻害活性の高い AXD6-12-54 は、免疫染色では AX 細胞の細胞表面を検出することができ(図6)、AX 細胞の遊走活性を阻害した(図7)。AXD6-12-54 はマウス肉腫から抽出した基底膜を使った AX 細胞の浸潤活性も阻害した(図8)。また、CD44 の細胞外領域に対する親和性を BIACORE により測定した結果、解離定数(Kd)は 1.6nM と見積られ、CD44 に高い親和性を有する抗体であることがわかった。さらに、AX 細胞より抽出した膜面分を電気泳動しウエスタンブロットを行い、AXD6-12-54 で染色した結果 85kDa の単一バンドが検出され、市販の抗 CD44 抗体を用いた場合と同一のバンドであった(図9)。以上の結果より、AXD6-12-54 は抗 CD44 抗体であり、癌幹細胞と高分子量ヒアルロン酸との相互作用を阻害し、ニッチを制御することが可能な抗体であることがわかった。

一方、一本鎖抗体の IVV ライブラリー存在下 HMWHA コーティングプレート上に接着できな

いAX細胞からIVVを回収する方法だけを繰り返し行うスクリーニングを計7ラウンド行った結果、AX細胞の遊走活性を阻害する6個のクローンが得られた。AX細胞より抽出した膜画分を電気泳動しウエスタンブロットを行い、この内の1つのクローン(AXY7-29)で染色した結果、CD44とは異なる分子量の位置に単一バンドが検出された。以上の結果より、AXY7-29はCD44以外のニッチにかかわる分子を認識する抗体であることがわかった。

図6 免疫染色

図7 遊走活性

図8 浸潤活性

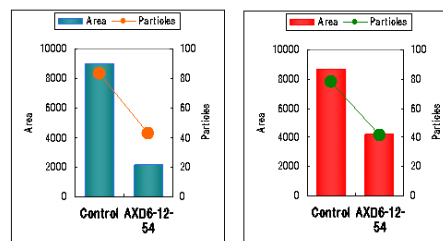
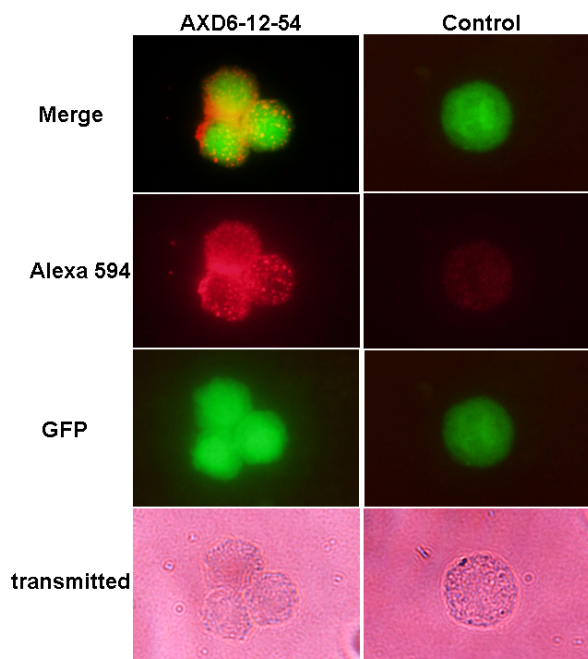
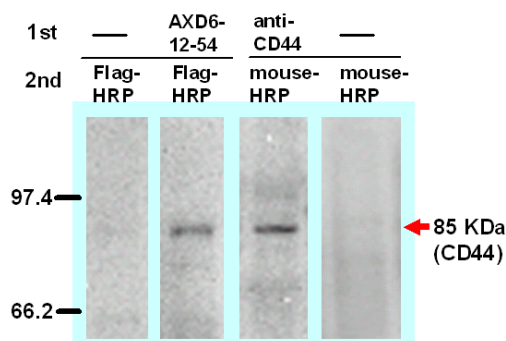


図9 ウエスタンブロット



7) RNAi library を用いた骨肉腫 iCSC 細胞の分化能、腫瘍形成能制御分子の同定

【目的】本研究は、研究代表者グループで得られたiCSCの成果を分子機構に結びつけて創薬研究に発展させることを目指すため、CSCの分化能、腫瘍形成維持能を決定づけている重要分子のスクリーニングをRNAi libraryを用いて実施した。

【方法、結果】骨および軟骨への分化能力をもつ骨肉腫iCSC細胞をRNAi libraryにて処理し、Alizarin Red染色で赤色に発色させることを指標に骨細胞への分化誘導、分化方向の変化を引き起こす分子の同定を行っている。また、腫瘍形成能の低いAO細胞をRNAi libraryにて処理後、マウスに移植して腫瘍形成能が促進する分子の探索を現在実施中である。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Kubota Y, Takubo K, Shimizu T, Ohno H, Kishi K, Shibuya M, Saya H and Suda T: M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *J Exp Med* 206: 1089-1102, 2009 DOI:10.1084/jem.20081605
2. Kai K, Nagano O, Sugihara E, Arima Y, Sampetreatan O, Ishimoto T, Nakanishi M, Ueno N, Iwase H and Saya H: Maintenance of HCT116 colon cancer cell line conforms to a stochastic model but not a cancer stem cell model. *Cancer Sci* 100: 2275-2282, 2009 DOI:10.1111/j.1349-7006.2009.01318.x
3. Ishimoto T, Oshima H, Oshima M, Kai K, Torii R, Masuko T, Baba H, Saya H and Nagano O: CD44⁺ slow-cycling tumor cell expansion is triggered by the cooperative actions of Wnt and prostaglandin E2 in gastric tumorigenesis. *Cancer Sci* 101: 673-378, 2010 DOI:10.1111/j.1349-7006.2009.01430.x
4. Tamase A, Muraguchi T, Naka K, Tanaka S, Kinoshita M, Hoshii T, Ohmura M, Shugo H, Ooshio T, Nakada M, Sawamoto K, Onodera M, Matsumoto K, Oshima M, Asano M, Saya H, Okano H, Suda T, Hamada J and Hirao A: Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 17163-17168, 2009 DOI:10.1073/pnas.0905016106
5. Takahashi E, Nagano O, Ishimoto T, Yae T, Suzuki Y, Shinoda T, Nakamura S, Niwa S, Ikeda S, Koga H, Tanihara H and Saya H: TNF- α regulates TGF- β -dependent epithelial-mesenchymal transition by promoting hyaluronan-CD44-Moesin interaction. *J Biol Chem* 285: 4060-4073, 2010 DOI:10.1074/jbc.M109.056523
6. Tabata N, Sakuma Y, Honda Y, Doi N, Miyamoto-Sato E and Yanagawa H: Rapid antibody selection by mRNA display on a microfluidic chip. *Nucleic Acids Res* 37, e64, 2009 DOI: 10.1093/nar/gkp184
7. Sumida T, Doi N and Yanagawa H: Bicistronic DNA display for in vitro selection of Fab fragments, *Nucleic Acids Res* 37, e147, 2009 DOI: 10.1093/nar/gkp776

(4-2) 知財出願

- ① 平成 21 年度特許出願内訳(国内 2 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)