

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。そして得られた知識と技術を用いて iPS 細胞の腫瘍化を抑制し正常な分化を遂げさせるための方策を考案することを目的とする。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. マウス各組織の正常細胞を用いて iCSC を誘導し、それらを少数、同系マウスの同所に移植することにより、ヒト組織に類似した構造と性質を持つ、致死的な癌組織を構築することが出来た。現時点で白血病、乳癌、卵巣癌、脳腫瘍、骨肉腫、悪性黒色腫の iCSC が作製できている。iCSC を用いて、癌幹細胞の起源細胞、腫瘍化の分子背景、ニッチの候補因子などの探索を行っている。
2. 骨肉腫においては腫瘍形成性が高く比較的治療感受性の高い iCSC と、腫瘍形成能が低く治療感受性も低い分化のレベルが変化することにより高い腫瘍形成性に変化する iCSC の二種の細胞を同定し、それらの性質の違いを分子レベルで解析した。
3. 骨肉腫 iCSC に対して選択的な抗腫瘍活性と脂肪細胞誘導活性を示す薬剤の探索を行ったところ、選択的な抗腫瘍活性や顕著な脂肪細胞誘導活性を持った化合物を放線菌とケミカルライブラリーから見出すことに成功した。
4. 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。
5. 胃癌モデルマウスを用い、癌幹細胞マーカーである CD44 のスプライスバリエント (CD44v) が細胞の抗酸化能を促進し、腫瘍形成や治療抵抗性において重要な役割を果たしていることを分子レベルで解明した。

### § 2. 研究実施体制

(1)「佐谷」グループ(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)

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)「土居」グループ

① 研究分担グループ長: 土居 信英 (慶應義塾大学、准教授)

### ② 研究項目

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

## (3)「赤羽」グループ

① 研究分担グループ長: 赤羽 浩一 (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) 各種マウス組織における iCSC の樹立 (佐谷研究室)

【目的】 マウスの各種正常組織より組織幹細胞、前駆細胞、分化細胞などを取り出して、それらの細胞に最小限の遺伝子操作を加えることで自己複製能と分化能を持ち、更に少数の細胞を同系マウスに同所移植を行うことで致死的な腫瘍を形成できる人工癌幹細胞 (induced cancer stem cells: iCSCs) を作製し、癌幹細胞の性質の解析と治療戦略の構築を行うことを目的とした。

【方法、結果】 これまでの研究によって以下の iCSC を樹立することに成功した。

表 1 : 樹立できたマウス iCSC

腫瘍	起源細胞	導入遺伝子	類似組織型
白血病	正常造血幹細胞/ 前駆細胞	N-myc c-myc	Pre-B LBL
骨肉腫	INK4a/ArfKO 間葉系幹細胞/ 骨軟骨前駆細胞	c-myc	Osteosarcoma
脳腫瘍	INK4a/ArfKO 神経 幹細胞/前駆細胞	RasV12 c-myc	Glioblastoma PNET
乳がん	INK4a/ArfKO 乳腺幹細胞	RasV12	Basal type
卵巣がん	正常卵巣上皮細胞	RasV12+c-myc	Scrous adeno- carcinoma-like

これらの iCSC を用いた癌幹細胞の機能解析を現在実施中である。造血系 iCSC の起源細胞を探索する目的で行った研究において、細胞分裂期の制御分子である Cdh1 が、造血系幹細胞及び前駆細胞の遺伝子損傷ストレスを緩和する作用を持つことを見出した<sup>9)</sup>。更に脳腫瘍（グリオーマ）iCSC の共同研究において、NKX2.2 という分子がグリオーマ癌幹細胞の自己複製に関わることを見出した<sup>7)</sup>。骨肉腫 iCSC については、以下の 2) においてその成果を述べる。

## 2) iCSC を用いた分化能転換薬剤の探索（佐谷研究室、土居研究室、赤羽研究室）

【目的】我々は、これまでの研究によって、マウス骨髄ストローマ細胞から c-Myc 過剰発現、Ink4a/Arf<sup>-/-</sup> の条件により骨肉腫 iCSC を樹立した。この iCSC の性質を詳細に解析し、その腫瘍形成能を抑制できる薬剤の探索を行うことを目的とした。

【方法、結果】樹立した骨肉腫 iCSC には、骨および軟骨への分化能力を持つクローン（AX クローン）と、骨・軟骨・脂肪の 3 方向に分化能力を持つクローン（AO クローン）が存在し、AX は AO に比べて明らかに腫瘍形成能と自己複製能が高いことが分かった。AO では転写因子 PPAR $\gamma$  が有意に高く、脂肪分化能を失い PPAR $\gamma$  が低下した場合に、AX 化して腫瘍形成性が上昇することを見出した<sup>5)</sup>。

この所見に基づき、AX から AO への変換を評価できる cell-based assay を確立し、種々のケミカルライブラリーを用いて、AX (スクリーニングではより AX の性質が顕著である AXT クローンをを用いた) に対する選択的細胞毒性と脂肪細胞誘導活性を指標に化合物のスクリーニングを行った。その結果、フタルイミド誘導体からは化合物 TC11 が、アニリノキナゾリン誘導体からは化合物 Q15 が人工癌幹細胞に対して顕著な選択的毒性を示すことがわかった (IC<sub>50</sub> は数  $\mu$  M)。しかし、両化合物の脂肪細胞誘導活性は弱かった。

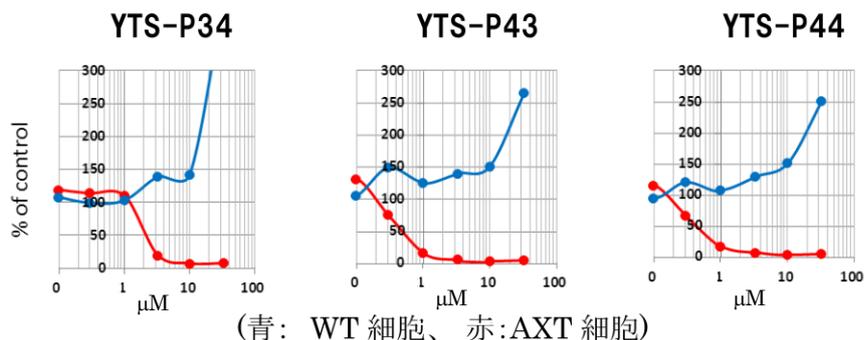


図1 3化合物の人工癌幹細胞(AXT)に対する選択毒性

次いで、5000種の化合物からなるケミカルライブラリーから人工癌幹細胞(AXT)に対し強い毒性を示すものを1次スクリーニングし、WST-1アッセイ値が化合物無添加のコントロールと比較し30%未満を示した化合物108個を選択した。2次スクリーニングではAXT細胞とWT(マウス骨髄ストローマ由来正常細胞)に対してWST-1アッセイで細胞毒性を評価し正常細胞に障害を与えず、AXT細胞をより強く殺傷する3化合物(YTS-P34、YTS-P43、YTS-P44)を選択した(図1)。またAXT細胞を分化誘導培地で培養し脂肪細胞への分化誘導を強く起こしoil red染色される5化合物(YTS-P34、YTS-P43、YTS-P29、YTS-P39、YTS-P76)を選択した(図2)。YTS-P34、YTS-P43、YTS-P44については約100mgを目標に合成を開始した。今後マウスを用いた*in vivo*アッセイでの評価を中心に検討を進める。脂肪細胞誘導との関連でPPAR $\gamma$ の発現誘導が起こるかどうかについても調べる予定である。

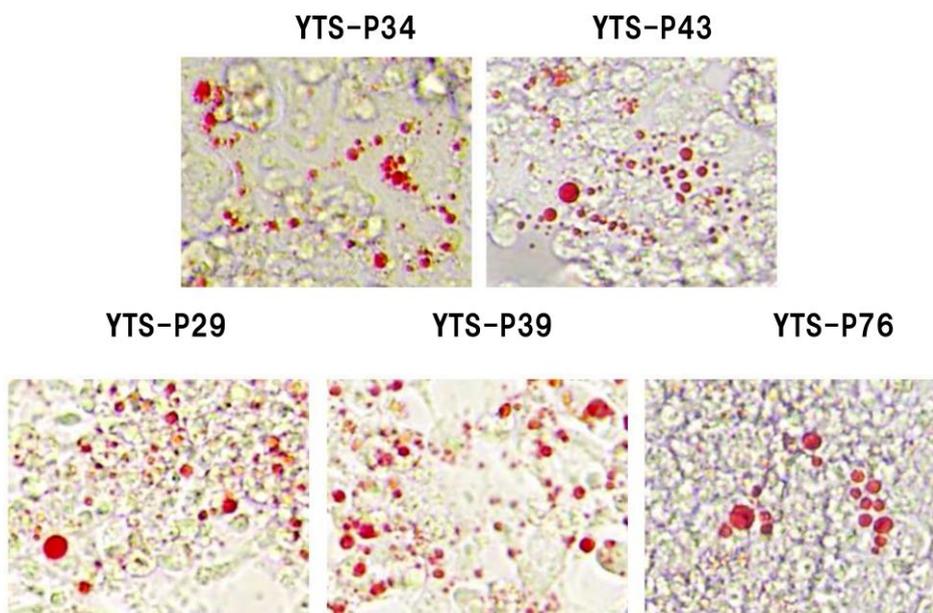


図2 5化合物の人工癌幹細胞(AXT)に対する脂肪細胞へ分化誘導効果

また AX から AO、逆に AO から AX へと転換するために必要な分子機構を解析するために RNAi library を用いた分子スクリーニングを実施し、候補となる分子を現在探索中である。現時点では、発現抑制することによって AO が AX 化する有力な候補分子が上がってきており、その分子の作用を *in vitro*、*in vivo* の両面から解析している。

3) 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 (佐谷研究室、土居研究室)

【目的】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、その検証を試みた。

【方法、結果】研究分担者らが独自に開発した *in vitro virus* (IVV) 法はタンパク質の多様な機能スクリーニングに応用可能な技術である<sup>1,2,4,10</sup>。その IVV 法を用いて、ヒト・グリオーマ細胞 U251 由来の cDNA ライブラリーから CD44ICD に結合する因子をスクリーニングしたところ、3種類のタンパク質(GTFIIi、CDK5RAP2、MIB1)が得られた。培養細胞内での結合実験をおこなったところ、3種類のタンパク質のうち基本転写因子 GTFIIi については、細胞質画分において全長 CD44 および CD44 の膜貫通領域および CD44ICD との結合が確認できた。

4) 癌幹細胞マーカーCD44 の機能解析に基づく腫瘍形成抑制戦略の考案 (佐谷研究室)

【目的】癌幹細胞のマーカーである CD44 の機能を胃癌モデルマウスを用いて解析し、その所見に基づいて腫瘍形成を抑制する戦略を考案することを目的とする。

【方法、結果】マウス胃癌において CD44 を発現する癌細胞と発現が極めて低い癌細胞を比較したところ、CD44 発現癌細胞では活性酸素 (ROS) が有意に低いことが分かった。この ROS 量の調節が CD44 によるものかを検証するために、CD44 高発現癌細胞において CD44 の発現を RNA 干渉法(RNAi)を用いて抑制してみると、細胞内 ROS 量が増加した。そこで、その分子機構を解析した結果、抗酸化物質であるグルタチオンの細胞内含有量が CD44 発現抑制により著明に低下し、細胞内 ROS の蓄積を誘導することが分かった。

さらに解析を進めた結果、CD44 のバリエーションフォーム (CD44v) はグルタチオン合成の材料となる細胞外シスチンの取り込みに関わるトランスポーターxCT を細胞膜上で安定化させることで、その機能を亢進させることが明らかになった<sup>8)</sup>。(図 3)

現在 CD44v と xCT の相互作用を阻害することによる腫瘍形成抑制実験を実施している。

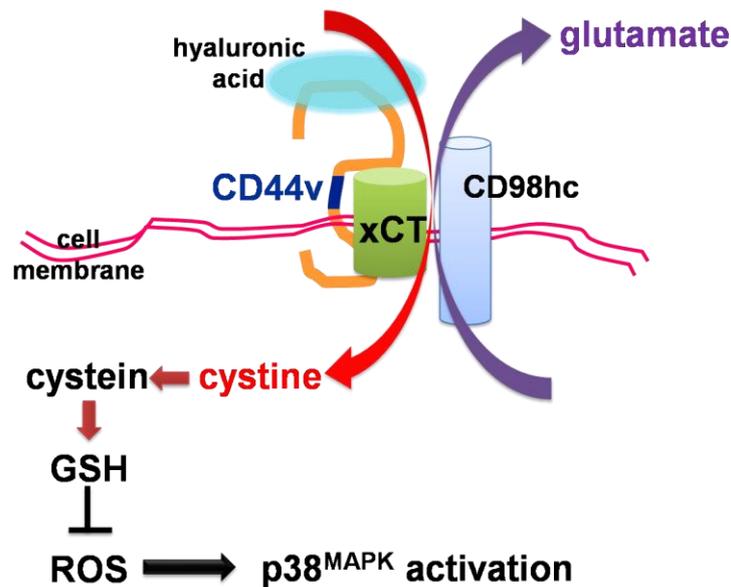


図3 CD44vによる細胞内酸化ストレス抑制機構

#### §4. 成果発表等

##### (4-1) 原著論文発表

###### ●論文詳細情報

1. Matsumura, N., Tsuji, T., Sumida, T., Kokubo, M., Onimaru, M., Doi, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Yanagawa, H.: mRNA display selection of a high-affinity, Bcl-XL-specific binding peptide. *FASEB J* 24: 2201-2210, 2010 (DOI:10.1096/fj.09-143008)
2. Horisawa, K., Imai, T., Okano, H. and Yanagawa, H.: The Musashi family RNA-binding proteins in stem cells. *Biomol. Concepts* 1: 59-66, 2010 (DOI: 10.1515/BMC.2010.005)
3. Ishimoto T, Oshima H, Oshima M, Kai K, Torii R, Masuko T, Baba H, Saya H and Nagano O: CD44<sup>+</sup> slow-cycling tumor cell expansion is triggered by the cooperative actions of Wnt and prostaglandin E2 in gastric tumorigenesis. *Cancer Sci* 101: 673-678, 2010 (DOI:10.1111/j.1349-7006.2009.01430.x)
4. Miyamoto-Sato, E., Ishizaka, M., Fujimori, S., Hirai, N., Masuoka, K., Saito, R., Ozawa, Y., Hino, K., Washio, T., Tomita, M., Yamashita, T., Oshikubo, T., Akasaka, H., Sugiyama, J., Matsumoto, Y., Yanagawa, H.: A comprehensive resource of interacting protein regions for refining human transcription factor networks: Domain-based interactome. *PLoS ONE* 5: e9289, 2010 (DOI:10.1371/journal.pone.0009289)

5. Shimizu T, Ishikawa T, Sugihara E, Kuninaka S, Miyamoto T, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Tsunoda T, Miya F, Morioka H, Nakayama R, Kobayashi E, Toyama Y, Kawai A, Ichikawa H, Hasegawa T, Okada S, Ito T, Ikeda Y, Suda T, and Saya H: *c-MYC* overexpression with loss of *Ink4a/Arf* transforms bone marrow stromal cells into osteosarcoma accompanied by loss of adipogenesis. *Oncogene* 29: 5687-5699, 2010 (DOI:10.1038/onc.2010.312)
6. Ozawa, Y., Saito, R., Fujimori, S., Kashima, H., Ishizaka, M., Yanagawa, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M.: Protein complex prediction *via* verifying and reconstructing the topology of domain-domain interactions. *BMC Bioinformatics* 11: 350, 2010 (DOI:10.1186/1471-2105-11-350)
7. Muraguchi T, Tanaka S, Yamada D, Tamase A, Nakada M, Nakamura H, Hoshii T, Ooshio T, Tadokoro Y, Naka K, Ino Y, Todo T, Kuratsu JI, Saya H, Hamada JI and Hirao A: NKX2.2 suppresses self renewal of glioma-initiating cells. *Cancer Res* 71:1135-45, 2011 (DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-2304)
8. Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, Oshima H, Oshima M, Ikeda T, Asaba R, Yagi H, Masuko T, Shimizu T, Ishikawa T, Kai K, Takahashi E, Imamura Y, Baba Y, Ohmura M, Suematsu M, Baba H and Saya H: CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc- and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell* 19: 387-400, 2011 (DOI:10.1016/j.ccr.2011.01.038)
9. Ishizawa J, Kuninaka S, Sugihara E, Naoe H, Kobayashi Y, Chiyoda T, Ueki A, Araki K, Yamamura K, Matsuzaki Y, Nakajima H, Ikeda Y, Okamoto S and Saya H: The cell cycle regulator Cdh1 controls the pool sizes of hematopoietic stem cells and mature lineage progenitors by protecting from genotoxic stress. *Cancer Sci* Jan 22, 2011 (DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.01884.x.)
10. Shiheido H, Takashima H, Doi N and Yanagawa H: mRNA display selection of an optimized MDM2-binding peptide that potently inhibits MDM2-p53 interaction. *PLoS ONE* 6:e17898, 2011(DOI:10.1371/journal.pone.0017898)

#### (4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 1件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 3件)