

「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、誘導性白血病の中に iCSC 分画を同定することができた。また、骨肉腫では、腫瘍の基となる細胞 (cell-of-origin) が少なくとも 2 種類存在することを見出し、それらの細胞はそれぞれ分化のレベルが異なり、骨・軟骨の 2 方向に分化できる能力を持った細胞が、脂肪・骨・軟骨の 3 方向に分化できる細胞より、腫瘍形成能が高いことを見出した。しかし、3 方向分化能をもつ細胞は増殖が遅く、抗癌剤に抵抗性を示すが、マウスに移植するとやがて脂肪への分化能を失って 2 方向分化細胞となり、急速に腫瘍化することが明らかになった。この研究によって、癌には分化度が変化することによって癌幹細胞としての性質を獲得する、潜在的癌幹細胞 (latent CSCs) が存在することを見出した。また腫瘍形成活性の強い CSCs (active CSCs) と latent CSCs は分化を制御する転写因子の発現によって双方向性に変化することが分かり、分化プログラムの変更が腫瘍形成能や薬剤抵抗性を制御するという新たな概念を提示することができた。今後は他の iCSC についても latent CSC が存在するか否かについて検討し、腫瘍形成のスイッチを制御する生体内の因子、更に化合物の探索を行う。また、CD44 とヒアルロン酸の結合が癌幹細胞にとってニッチとして働いているか、更にはいかなる細胞内シグナルによって制御されているかについて解析を進め、その連携を遮断することによる新規治療法を考案していきたい。

## 2. 研究実施内容 (文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

### 1) 分化プログラム制御による癌幹細胞機能抑制剤の開発

#### 【目的】

本研究は、癌幹細胞の機能に分化プログラムがどのように関与するかについて調べ、分化度の変化による新たな治療戦略を考案することを目的として行った。

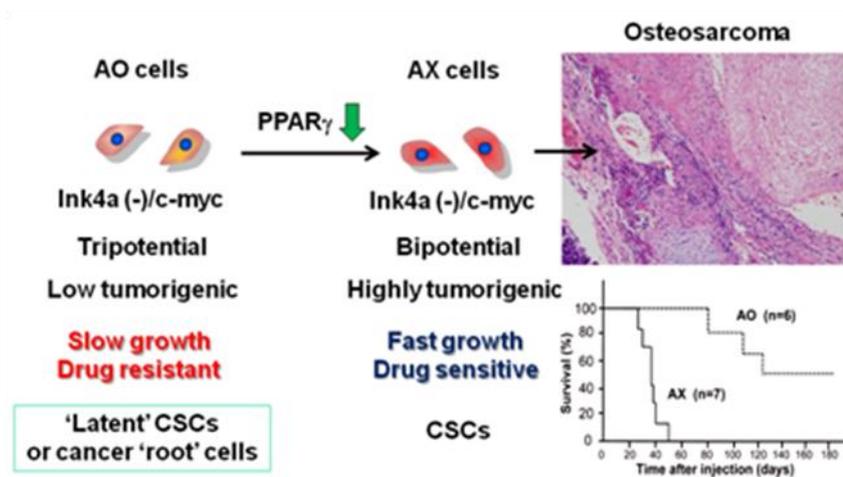


図1 骨髄由来間葉系細胞より誘導した2種類の細胞

### 【方法、結果】

①私達は c-myc 過剰発現と INK4a 欠損によって骨髄由来間葉系細胞 (bone marrow-derived stroma cells: BMSCs) から骨肉腫を誘発することに成功したが、これら c-myc が導入された BMSCs を single cell cloning したところ、2つの異なった性質をもつ細胞が取得できた。一つ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) であり、もう一つは骨・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) であった (図1)。

AX 細胞は AO 細胞より腫瘍形成能と自己複製能が高いことが分かり、癌幹細胞としての性質を持っていた。ただ、AO クローンは細胞周期回転が遅く、抗癌剤に対して抵抗性を示し、さらに脂肪分化のマスター転写因子である PPAR $\gamma$  の発現が抑制されることによって AX 化し腫瘍形成能が急速に高まることから、潜在的な癌幹細胞 (latent CSCs) と位置付けることができる。

②AX から AO への変換を評価できる cell-based assay 系を構築することに成功した。このアッセイを AO 細胞に応用することにより脂肪分化能を抑制する化合物を評価することができる。つまり分化プログラムを遺伝子ではなく、化合物でコントロールできる系を樹立することを目指す。化合物は、①すでに薬剤として臨床に用いている既存薬、②安全性試験は終了しているが治験の途中でドロップした薬剤、③新規化合物の三種について検討を行う予定であるが、①と②の化合物の収集システムを構築し、本年度より本格的な収集をスタートする。化合物の収集とアッセイを実施しながら適宜構造変更を行うために、すでに同志社大学内インキュベーション施設: D-egg 内に新たに研究室スペースを確保したので、シードとなる化合物の取得を目指す。また、GFP-ヒストン H2B を全身の細胞で発現するメダカを作製し、化合物の細胞周期への影響や細胞死の影響について、in vivo で評価する系を構築することに成功した<sup>1)</sup>。本システムは今後候補薬剤の安全性評価に用いる。

### 2) 白血病 iCSC を用いた抗癌剤抵抗性の解析

骨髄由来の造血幹細胞および前駆細胞に N-Myc 遺伝子導入によって成立した白血病細胞

胞 (precursor B lymphoblastic leukemia/lymphoma: Pre-B LBL) では、表面マーカーの異なる細胞群間において、腫瘍形成能と抗癌剤感受性に違いがあることが明らかになり、iCSC と考えられる細胞分画を取得することができた。それらの細胞の遺伝子発現の特徴的变化について詳細な情報を得ることができたので、これらマーカーを指標として iCSC の能力を制御できる遺伝子あるいは化合物のスクリーニングを実施する。

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

誘導性胃癌を用いた実験で、CD44 と HMWHA の結合が、癌幹細胞の自己複製能を維持するために必要な因子であることを見出した。具体的には、CD44KO マウスでは癌幹細胞の増加が抑制され、やがて枯渇するために腫瘍の発生は途中で止まることがわかった。また、CD44 が細胞内にもたらすシグナルを明らかにする目的で、CD44 細胞内ドメイン (CD44ICD) に結合するタンパク質を IVV 法によってスクリーニングし、20 種類の結合候補分子を得ることに成功した。そのうち、6 種類の候補因子が CD44ICD 特異的に結合することを明らかにした。CD44ICD 等のタンパク質の核内移行に関与する 6 種の核移行シグナル(NLS)のコンセンサス配列を IVV 法によってランダム配列から同定した<sup>2)</sup>。また、IVV 法によって iCSC と HMWHA の結合を解離することのできる一本鎖抗体のスクリーニング実験を行い、複数個の濃縮された抗体の取得に成功した。抗原の同定をプルダウン実験により実施中であるが、少なくともそのうち 1 つの一本鎖抗体は抗 CD44 抗体であることが予想された。また IVV 抗体法によって、CD44 と HMWHA の結合を特異的に阻害することのできる抗体のスクリーニングを実施中である。

## 3. 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
- ・分化度の変化と腫瘍形質の関連解析
- ・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
- ・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

- ・癌幹細胞の固定・機能解析と抗ニッチ創薬
- ・癌幹細胞の自己統括と分化の制御ネットワーク解析

## 4. 研究成果の発表等

### (1) 論文発表 (原著論文)

1. Sampetean O, Iida S, Makino S, Matsuzaki Y, Ohno K, Saya H: Reversible whole-organism cell cycle arrest in a living vertebrate. *Cell Cycle* 8: 620-627, 2009
2. Kosugi. S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M., Yanagawa, H.: Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin  $\alpha$  . *J. Biol. Chem.*, 284,478-485, 2009