

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. 研究実施体制

(1)「佐谷」グループ

① 研究代表者: 佐谷 秀行 (慶應義塾大学、教授)

② 研究項目

- ・各種 iCSC の開発と分化プログラム制御による癌幹細胞機能抑制剤の開発
- ・iCSC を用いた癌幹細胞ニッチの同定と薬剤感受性克服戦略の考案
- ・ヒト細胞を用いた iCSC の作製
- ・CD44-xCT 相互作用抑制による細胞内活性酸素誘導

(2)「土居」グループ

① 主たる研究代表者: 土居 信英 (慶應義塾大学、准教授)

② 研究項目

- ・CD44-HMWHA のニッチ機構解析
- ・癌幹細胞の機能解析と抗ニッチ創薬

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

(1)「佐谷」グループ

① 研究のねらい

遺伝子改変マウスにおいて発生した腫瘍あるいは正常細胞から特定の遺伝子を用いて誘導した腫瘍を用い、その中に治療抵抗性を示す癌幹細胞を同定・単離・維持する。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、それぞれの臓器に特異的な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第一の目的である。そして、iCSC と iPS 細胞の類似点および相違点を明確にし、癌幹細胞に対する特異的治療法が iPS

細胞の腫瘍化の予防や抑制に用いることができるかについて調べ、iPS 細胞に正常な分化を遂げさせるための方策を考案することを第二目的とする。iCSC、iPS 細胞という人工的に誘導した細胞を用いることによって、創薬研究のパラダイムを変化させ、実際の候補となる薬剤を選択し、癌幹細胞に対する治療とともに iPS 細胞からの腫瘍化を予防あるいは制御する戦略を提案することを本グループの研究のねらいとする。

②研究の具体的内容

1) 各種 iCSC の開発と分化プログラム制御による癌幹細胞機能抑制剤の開発

これまでにマウスの正常細胞を用いて 6 種類の iCSC を作製することができた。それらの細胞を用いて本年度は以下の所見を得た。

- A) マウス白血病 iCSC は造血幹細胞を起源としていることが分かったが、*Arf* 遺伝子が不活化した細胞では分化した細胞からも iCSC が誘導可能であること、そして *Arf* 遺伝子欠損 iCSC から生じた白血病細胞は薬剤抵抗性が高いことを見出した。更に、*Arf* 遺伝子欠損 iCSC から生じた白血病は、*p53* 遺伝子が正常であることから、Mdm2 の阻害剤である Nutlin が著効であることを、モデルを用いて示した¹⁾。
- B) 脳腫瘍 iCSC を用いて、ヒトグリオブラストーマと組織構築の酷似した腫瘍モデルを作製することに成功した。また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²⁾。
- C) 正常マウス卵巣上皮細胞の幹細胞/前駆細胞分画が EpCAM 分子で選択できることを見出し、この細胞の *p53* を一時的に siRNA で抑制し、*c-Myc* と *RasV12* を同時発現することにより、卵巣がん iCSC を誘導することに成功した³⁾。

2) iCSC を用いた癌幹細胞ニッチの同定と薬剤感受性克服戦略の考案

昨年までの研究で骨肉腫の iCSC を樹立することに成功した (*Oncogene* 29: 5687-5699, 2010)。

この iCSC から誘導された骨肉腫は、未分化な部分と骨や軟骨の方向に分化した部分を含む極めて不均一な組織構築を呈するが、その複雑な構築は培養中には生じず、生体に移植した時にのみ生じることが分かった。腫瘍周辺の微小環境を解析したところ、腫瘍に接して(あるいは腫瘍内に入り込んで)存在する間葉系細胞(特に線維芽細胞)から分泌される FGF2 が iCSC の未分化性を維持するためのニッチの一部として働いていることが分かった(図1)

⁴⁾。

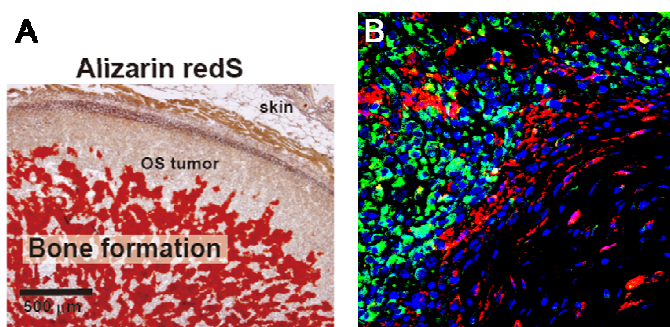


図1 腫瘍周囲細胞による iCSC の未分化性維持
iCSC 由来の骨肉腫では正常組織と接した部分では未分化性が維持され、腫瘍内部は骨分化が進む(A)。右の B 図では、腫瘍細胞(緑)が正常組織に接しているところに多くの FGF2 陽性線維芽細胞(赤)が存在し、その未分化性を維持している⁴⁾。

3) ヒト細胞を用いた iCSC の作製

ヒト iCSC 作製の第一段階として、SV40 により不死化した絨毛上皮細胞に RasV12 を導入し、ヌードマウスに移植することによりヒト絨毛上皮癌に組織学的、免疫組織化学的に類似した腫瘍を作製することに成功した⁵⁾。

4) CD44-xCT 相互作用抑制による細胞内活性酸素誘導

接着分子 CD44 は癌幹細胞のマーカーとして知られ、そのスプライスバリエントフォーム (CD44v) は癌幹細胞および癌化した iPS 細胞に高く発現している。この分子の癌幹細胞における機能を明らかにすることにより、抗癌幹細胞治療あるいは抗ニッチ治療を考案することを目的とした。

CD44 の癌幹細胞における機能については、「癌幹細胞自身の機能維持」と「ニッチ形成」という両面から解析を行った。前者は佐谷グループで主に行い、後者は土居グループで行った (土居グループの成果は後述)。佐谷グループは昨年までの研究で、CD44v に対する特異的抗体を用い⁶⁾、CD44v はシスチントランスポーター xCT と会合し、細胞膜上での発現を安定化することによりシスチンの取り込みを上昇させ、その結果グルタチオン合成を増加させて細胞内酸化ストレスの低下に寄与していることを見出した (Cancer Cell 19: 387-400, 2011)。さらに本年度は土居グループとの共同研究で、CD44 が細胞内ドメインで M2 型ピルビン酸キナーゼと会合し、その活性を抑制することによって細胞内代謝を変化させ、より還元型グルタチオンの合成を高めているという所見を得ることができた (図2)⁷⁾。つまり癌幹細胞では CD44v の高発現によって酸化ストレスが抑えられるために、治療に対する抵抗性が高まると考えることができる。この概念に基づけば、CD44v の発現抑制や、CD44v-xCT 間の相互作用の抑制、更には xCT トランスポーターの機能阻害は、細胞内の酸化ストレス上昇を招き、治療効果を高めることができると考えられる。慢性関節リウマチあるいは潰瘍性大腸炎の薬剤として長く使用されてきたスルファサラジンは、xCT トランスポーターを阻害することが分かったので、胃癌モデルマウス及び CD44v 高発現大腸癌細胞を移植したマウスにスルファサラジンの投与を行い、その腫瘍形成抑制効果を検討した。その結果、単剤投与でもこれら2つのマウスモデルにおいて、腫瘍細胞の分化が誘導され、有意な腫瘍形成抑制作用が見られた。更に低用量のシスプラチンとの併用によって顕著な腫瘍抑制効果を得ることができた。

そこで、CD44v による酸化ストレス回避作用を阻害し、悪性化を抑制する目的で、現在、iPS 細胞移植によって生じる奇形腫の形成に対するスルファサラ

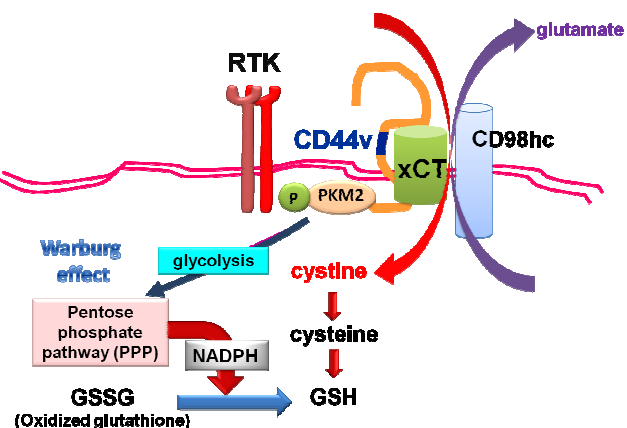


図2 CD44 による還元型グルタチオン合成促進機構
CD44はxCT安定化を介するシステイン量の増加と、解糖系を活性化することによる NADPH 産生量増加の2つの機構で GSH 量を増加させる⁷⁾。

ジンの効果を検討している。また、iPS 細胞由来のキメラマウスの腫瘍発生抑制、iPS 細胞を分化させたのち移植した組織の腫瘍化の抑制についても、現在実験を進めている。

(2)「土居」グループ

①研究のねらい

「佐谷」グループが開発した人工癌幹細胞を用いて得られた所見に基づき、その性質を抑制するための標的の探索や、阻害能を持つ化合物の同定を行い、癌幹細胞に対する治療とともに iPS 細胞からの腫瘍化を予防あるいは制御する戦略を構築することを本グループの研究のねらいとする。

・CD44-HMWHA のニッチ機構解析と抗ニッチ創薬

【目的】骨肉腫 iCSC 及び胃癌 iCSC 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の一つであるという所見から、CD44-HMWHA がどのような機構で癌細胞の分化を抑制しているかについて骨肉腫 iCSC に対する一本鎖抗体を用いて解明する。

【方法、結果】これまで IVV 法により CD44 と HMWHA との結合を特異的に阻害する一本鎖抗体のセレクションを行い、AX 細胞が HMWHA コーティングプレートへ接着することを強く阻害するクローン AXD6-12-54 を得ているが、今回 HMWHA コーティングをしていない通常の細胞プレートへの接着を阻害する一本鎖抗体のセレクションを行った。全部で7ラウンドの選択実験後得られたクローン AXT7-30 は AXT 細胞の細胞プレートへの接着を阻害し、免疫染色実験では AXT 細胞に結合していることが確認された。さらに WST-1 アッセイによる増殖阻害実験では濃度依存的に AXT 細胞の増殖を抑えた。CytoTox-Glo Cytotoxicity Assay により評価した結果、強い殺細胞活性 ($IC_{50} = 3 \text{ nM}$)を有していた。一本鎖抗体の抗原を探索する目的でまず CD44 に対する結合をビアコアにより調べたところ、驚くべきことに CD44 に対して強い親和性を示した。抗 CD44 抗体が殺細胞活性を如何に惹起させるのか興味深い。今後既に得られている抗 CD44 一本鎖抗体 AXD6-12-54 も含め AXT7-30 を大量に調製しマウスを用いた増殖や転移などの抗腫瘍活性の評価を実施していく。

・CD44 R1 と xCT の相互作用を阻害する抗 CD44 R1 一本鎖抗体の試験管内選択

【目的】これまでの研究により、癌幹細胞マーカーである CD44 R1 はシスチントランスポーター xCT と細胞膜上で複合体を形成して、細胞外のシスチンの取り込みに寄与し、抗酸化物質である還元型グルタチオン (GSH) 合成を増加させ、それによって細胞内酸化ストレスを低下させることが明らかにされた (Cancer Cell, 2011)。本研究では、IVV 法を用いて xCT と CD44R1 との結合を阻害し、細胞内グルタチオン濃度を正常に戻すヒト抗 CD44R1 一本鎖抗体を取得することを目的とし、癌細胞のアポトーシスを誘導する新しい抗癌剤開発の足がかりとなることを期待する。

【方法、結果】

xCT と CD44 R1 との結合部位に対する抗体の取得を目的としていることから、はじめにバリエーション領域の無い CD44 W 抗原タンパク質を固定したレジンで前処理後、マイクロ化学チップに結合させた CD44 R1 抗原タンパク質に対して一本鎖抗体のセレクションを行った。全部で4ラウンドの選択実験後4組の重複配列が得られた。CD44 W および CD44 R1 に対する親和性をビアコアによって検証した結果、UME4-42、UME4-35、UME4-4B の3クローンは CD44 R1 に対して nM オーダーの K_D を有していた。各抗体とも CD44 W にも親和性を示したが、 K_D を比較すると CD44 R1 に対する親和性が2倍から3倍高いことが分かった。また、細胞表面の膜タンパク質に結合するペプチドをセレクションできる新たな系を構築したので⁸⁾、今後、細胞表面の CD44R1 に直接結合する抗体のセレクションに応用することが期待できる。

・放線菌由来の癌幹細胞機能抑制剤と分化能転換剤の開発

【目的】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-/- 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】 土壌等のサンプルより単離した放線菌の培養液47株を新たに評価した。AXT 細胞に対する選択的毒性を示した 2011-K15 は C18 逆相 HPLC により活性ピークを同定した。また AXT 細胞が脂肪細胞への分化誘導を示した2株(2010-K4、2011-K9)はオイルレッド O 染色陽性だけでなく PPAR γ の発現を誘導することが分かった。2011-K9 からは C18 逆相 HPLC により4成分を単離精製しイソフラボン類であるグリシテイン、カリコシン、ゲニステイン、プラテンセインを同定した。ゲニステイン類は各種癌に対する抗腫瘍作用やエストロゲン受容体に作用することが示されてきている。従って脂肪細胞への分化誘導に特化した生物活性だけではないことから本株の検討は終了とした。イソフラボン類は培地成分の大豆の中に配糖体として多く含まれているが、放線菌の作用により糖が切断され活性成分として選択されてきたものと考えられる。また脂肪酸はオイルレッド O 染色に対して陽性を示すが PPAR γ の発現誘導を示さないことが分かった。大豆には脂肪酸も大量に含まれていることから、今回の知見を踏まえ大豆を含まない培地での放線菌培養を実施しスクリーニングを再検討した。その結果 2010-K8、2011-K17、2011-K34 の3株はオイルレッド O 染色陽性を示した。もっとも効果の高い 2010-K8 について現在優先的に検討を進めている。

・ケミカルライブラリーからの癌幹細胞転移抑制剤のスクリーニング

【目的】骨肉腫 iCSC の腫瘍形成能のうち遊走活性に着目し転移を抑制できる薬剤の開発を目的にケミカルライブラリーからスクリーニングを行う。

【方法、結果】

全部で 45 種類のアニロキナゾリン誘導体および 29 種類のフタルイミド誘導体⁹⁾について AXT 細胞に対する増殖阻害活性を評価した後、阻害活性を示さない濃度において遊走活性を評価した。その結果、化合物 Q50 は AXT 細胞の遊走活性を顕著に阻害した。さらにマウス肉腫から抽出した基底膜を使った AXT 細胞の浸潤活性をも強く阻害した。以上の結果、新規アニロキナゾリン

誘導体 Q50 を抗癌幹細胞薬の候補化合物として選出することができた。マウスを用いた増殖や転移などの抗腫瘍活性の評価を実施する目的で、Q50 を計5ステップで合成し動物実験用のサンプルを大量調製した。合成標品を用いて AXT 細胞と WT 細胞に対する遊走活性を評価したところ、AXT 細胞の遊走活性だけを顕著に阻害し高い選択性を有することが分かった。ビオチン化修飾した Q50 を作成し、AXT 細胞より調製した mRNA ライブラリーから結合タンパク質の選択実験を行い標的分子を探索し、作用機序の解明を進める予定である。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Sugihara E, Shimizu T, Kojima K, Onishi N, Kai K, Ishizawa J, Nagata K, Hashimoto N, Honda H, Kanno M, Miwa M, Okada S, Andreeff M and Saya H: Ink4a and Arf are crucial factors in the determination of the cell of origin and the therapeutic sensitivity of Myc-induced mouse lymphoid tumor. *Oncogene* 2011 (in press) (DOI:10.1038/onc.2011.462)
2. Sampetean O, Saga I, Nakanishi M, Sugihara E, Fukaya R, Onishi N, Osuka A, Akahata M, Kai K, Sugimoto H, Hirao A, and Saya H: Invasion precedes tumor mass formation in a malignant brain tumor model of genetically modified neural stem cells. *Neoplasia* 13: 784-791, 2011 (DOI: 10.1593/neo.11624)
3. Motohara T, Masuko S, Ishimoto T, Yae T, Onishi N, Muraguchi T, Hirao A, Matsuzaki Y, Tashiro H, Katabuchi H, Saya H and Nagano O: Transient depletion of p53 followed by transduction of c-Myc and K-Ras converts ovarian stem-like cells into tumor-initiating cells. *Carcinogenesis* 32: 1597-1606, 2011 (DOI:10.1093/carcin/bgr183)
4. Shimizu T, Ishikawa T, Iwai S, Ueki A, Sugihara E, Onishi N, Kuninaka S, Miyamoto T, Toyama Y, Ijiri H, Mori H, Matsuzaki Y, Yaguchi T, Nishio H, Kawakami Y, Ikeda Y and Saya H: Fibroblast growth factor-2 (Fgf2) is an important factor that maintains cellular immaturity and contributes to aggressiveness of osteosarcoma. *Mol Cancer Res* 10: 454-468, 2012 (DOI:10.1158/1541-7786.MCR-11-0347)
5. Kobayashi Y, Shimizu T, Naoe H, Ueki A, Ishizawa J, Chiyoda T, Onishi N, Sugihara E, Nagano O, Banno K, Kuninaka S, Aoki D and Saya H: Establishment of a choriocarcinoma model from immortalized normal extravillous trophoblast cells transduced with HRASV12. *Am J Pathol* 79: 1471-1482, 2011 (DOI:10.1016/j.ajpath.2011.05.019)

6. Masuko K, Okazaki S, Satoh M, Tanaka G, Ikeda T, Torii R, Ueda E, Nakano T, Danbayashi M, Tsuruoka T, Ohno Y, Yagi H, Yabe N, Yoshida H, Tahara T, Kataoka S, Oshino T, Shindo T, Niwa S, Ishimoto T, Baba H, Hashimoto Y, Saya H, and Masuko T: Anti-tumor effect against human cancer xenografts by a fully human monoclonal antibody to a variant 8-epitope of CD44R1 expressed on cancer stem cells. *PLoS One* 7:e29728, 2012 (DOI:10.1371/journal.pone.0029728)
7. Tamada M, Nagano O, Tateyama S, Ohmura M, Yae T, Ishimoto T, Sugihara E, Onishi N, Yamamoto T, Yanagawa H, Suematsu M and Saya H: Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells. *Cancer Res* 72: 1438-1448, 2012 (DOI:10.1158/0008-5472.CAN-11-3024)
8. Doi N, Yamakawa N, Matsumoto N, Yamamoto Y, Nagano T, Matsumura N, Horisawa K and Yanagawa H: DNA display selection of peptide ligands for a full-length human G protein-coupled receptor on CHO-K1 cells. *PLoS One* 7:e30084, 2012 (DOI: 10.1371/journal.pone. 0030084)
9. Shiheido H, Terada F, Tabata N, Hayakawa I, Matsumura N, Takashima H, Ogawa Y, Du W, Yamada T, Shoji M, Sugai T, Doi N, Iijima S, Hattori Y and Yanagawa H: A Phthalimide Derivative that Inhibits Centrosomal Clustering is Effective on Multiple Myeloma. *PLoS One* (in press)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 4 件)