

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

- ・人工癌幹細胞 (iCSC) を用いた癌幹細胞機能抑制剤の開発
- ・ヒト細胞を用いた iCSC の作製
- ・CD44v による癌幹細胞維持機構の解析と iPS 細胞癌化メカニズムの解析

(2) 「土居」グループ

① 主たる共同研究者: 土居 信英 (慶應義塾大学、准教授)

② 研究項目

- ・放線菌由来の癌幹細胞機能抑制剤の開発
- ・ケミカルライブラリー由来の癌幹細胞機能抑制剤の開発
- ・癌幹細胞に対する抗ニッチ抗体医薬の開発
- ・CD44v と xCT の相互作用を阻害する抗 CD44v 一本鎖抗体の試験管内選択

§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 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 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 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が本グループの研究のねらいである。

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

iCSC を用いて白血病の起源細胞と分化プログラムに関する研究¹⁾、トリプルネガティブ乳がんのマウスモデルの構築²⁾、ヒト絨毛上皮がん iCSC の遺伝子発現パターンの解析とヒト腫瘍細胞との比較³⁾、骨肉腫 iCSC の腫瘍形成能を決定づける分子の同定^{4,5)}、脳腫瘍幹細胞の放射線耐性誘導時に励起されるシグナルの同定⁶⁾、を行い報告した。その内、骨肉腫 iCSC と脳腫瘍 iCSC を用いた成果について述べる。

骨肉腫 iCSC である AX 細胞由来の腫瘍組織から単離した細胞 (AXT 細胞) は腫瘍形成能が AX 細胞より遥かに高く、その能力を規定している分子として IGF2BP3/Imp3 (以下 Imp3 と呼ぶ) が同定できた。Imp3 は AX 細胞が生体において腫瘍を形成する過程においてその発現が上昇し、発現を抑制することによって完全に AX 細胞からの腫瘍化を防ぐことができることが分かった⁴⁾。つまり、AX 細胞が生体において成育するためには Imp3 が必要であることが分かった。しかし、Imp3 が結合することが分かっている IGF2 mRNA は、この腫瘍形成能の全てを説明できる下流分子ではないことが分かった。また骨肉腫 iCSC で最も分化度が低く細胞周期回転が遅く腫瘍形成能を持たない、間葉系幹細胞に似た性質を持つ AO 細胞は、AX 細胞に変化するときに Twist2 の発現が低下することを見出し、Twist2 が分化転換 (trans-differentiation) を制御して腫瘍化を抑制している分子であることを見出した⁵⁾。

既にこれまでの研究で樹立したマウス脳腫瘍 iCSC に対して、放射線を繰り返し照射することで iCSC にも放射線耐性が生じることを確認した⁶⁾。この時に、IGF1 の発現上昇とそれによって誘導される IGF1 受容体 (IGF1R) 発現上昇が観察され、初期にはその下流にある AKT が活性化することを見出した。しかし、最終的には negative feedback 効果により AKT は逆に活性が抑制され、それが FOXO3a の核内移行を誘導することで細胞回転の低下、自己複製能の上昇を来たすことが分かった。またこの状況の耐性 iCSC に再度放射線を照射すると、急速に AKT の活性化が誘導され、また同時に抗アポトーシス分子である Bcl-2 の発現が上昇することで、放射線抵抗性を発揮することが分かった。そこで IGF1/IGF1R シグナルを阻害する抗体あるいは低分子化合物を加えて放射線照射を行ったところ、in vitro、in vivo の両方で放射線耐性を克服することが可能であることが分かった。

2) ヒト細胞を用いた iCSC の作製

ヒトの癌幹細胞では *p16* 遺伝子および *Arf* 遺伝子の機能抑制が極めて重要な因子として働いていることを明らかにした⁷⁾。また、メダカの幼若な色素細胞に活性型 HRAS を単独で誘導発現することによって、色素細胞の腫瘍性増殖をきたすトランスジェニックメダカを作製することに成功した⁸⁾。これらの基礎的な検討を背景にして、ヒト神経幹細胞に特定の遺伝子操作を加えることによって作製した細胞を、免疫不全マウスに移植することによって、ヒトグリオブラストーマに酷似した腫瘍を形成することに成功した。この細胞の中から neurosphere を作る細胞を精製し(ヒト脳腫瘍 iCSC)、それを極少数マウス脳内に移植したところ、同じくグリオブラストーマ様の腫瘍を形成した。また腫瘍化を引き起こす遺伝子の誘導発現系を作製し、その細胞をマウス脳内に移植したところ、遺伝子発現誘導依存的に腫瘍化を作ることに成功した。

3) CD44v による癌幹細胞維持機構の解析と iPS 細胞癌化メカニズムの解析

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ーションフォーム(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。

これまでの研究で、CD44v が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明らかにしたが、本年度は CD44v を発現するがん幹細胞が、その抗酸化能に基づいて肺転移⁹⁾及び、治療抵抗性⁷⁾に関与することを報告した。またその癌幹細胞としての能力は、xCT の阻害剤であるスルファサラジンによって有意に抑制できることが明らかになった。この成果に基づいて、スルファサラジンを用いた癌幹細胞を標的とした治療を臨床研究として実施する運びとなった。その際、スルファサラジン投与前後の CD44v 発現量を測ると同時に、生検組織中の抗酸化分子グルタチオンの量を測定することになっており、そのための装置の開発も共同研究として行った¹¹⁾。

また、共同研究において、CD44v はピロリ菌が胃粘膜細胞に注入する CagA と呼ばれる発癌性分子の細胞内での分解を、酸化ストレスを下げることによって抑制する作用があることを見出した¹²⁾。この結果から、慢性炎症の過程で CD44v を発現する細胞が出現し、その細胞が酸化ストレスを下げることで CagA を細胞内で長期維持することによって、癌幹細胞へと変化するのではないかという仮説を提案した。

そこで、CD44v による酸化ストレス回避作用を阻害し、悪性を抑制する目的で、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 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。

②研究の具体的内容

1)放線菌由来の癌幹細胞機能抑制剤の開発

【目的】清水・佐谷らによりマウス骨髄ストローマ細胞から *c-Myc* 過剰発現、*Ink4a/Arf^{-/-}* の条件により樹立された骨肉腫 iCSC の性質を詳細に解析し、その腫瘍形成能を抑制したり、脂肪細胞へ誘導できる薬剤の探索を行うことを目的とする。

【方法、結果】前年度までにスクリーニングされた、AXT 細胞に対する選択的毒性を示す放線菌 2011-K15 株から、C18 逆相 HPLC により単離精製されたイソフラボン類のうち、活性成分 P4 の UV スペクトルはイソフラボン類であるプラテンセインと同様であったが C18 逆相 HPLC では異なる溶出時間に溶出していた。また、P4 は AXT 細胞に対する増殖抑制効果に特異性があるのに対し、プラテンセインは WT 細胞についても増殖抑制効果を示した。UV スペクトルから P4 はプラテンセインの配糖体であることが予想されたので β グルコシダーゼと P4 を 37°C でインキュベーション後生成物を C18 逆相 HPLC で分析したところ、原料の P4 のピークが減少し、プラテンセインと同一の溶出時間に生成物のピークが増加したことからプラテンセインの配糖体であると同定した。グルコシル化の位置は決定していないが天然物の報告例から *Pratensein 7-O-glucoside* であると推定された。イソフラボン類は培地成分の大豆の中に多く含まれていることから、新たに大豆を含まない培地で培養した放線菌培養抽出物のスクリーニングを行った結果、2011-K37 株がオイレルレッド O 染色陽性ならびに選択的増殖抑制効果を示した。今後は、精製候補株のさらなる単離精製を進め、新規化合物であるかを明らかにし、それらの作用機序の解明を進める。

2)ケミカルライブラリー由来の癌幹細胞機能抑制剤の開発

【目的】骨肉腫 iCSC の腫瘍形成能のうち遊走・浸潤活性に着目し、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】前年度までに 45 種類のアニリノキナゾリン誘導体から AXT 細胞の遊走活性を顕著に阻害し、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する新規アニリノキナゾリン誘導体 Q50 を抗癌幹細胞薬の候補化合物として選出し、動物実験用のサンプルを大量調製した。マウスを用いた増殖や転移などの抗腫瘍活性の評価において、従来の投与方法では沈殿を生じてしまい、化合物が肝臓等に析出するなどの問題が生じたが、Q50 をポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートで溶解したところ、沈殿が生じなくなった。そこで、Q50 に加え、フタルイミド誘導体 TC11¹³⁾ およびアニリノキナゾリン誘導体 Q15¹⁴⁾ についても再度 AXT 細胞、WT 細胞、ヒト多発性骨髄腫細胞株 (KMS-34) に対して WST-1 アッセイによる *in vitro* での細胞増殖阻害活性を確認した上で、マウスを用いた増殖や転移などの *in vivo* 抗腫瘍活性の評

価を実施した。その結果、アニリノキナゾリン誘導体 Q15 と Q50 は腫瘍重量がコントロールと比べ減少していたが、TC11 はコントロールに比べ有意差が見られなかった。特に、Q50 はコントロールに比べて半分程度まで癌の増殖を抑制した。Q50 のマウス血中動態を調べた結果、薬物動態パラメータは、30 mg/kg の投与時に $C_{max} = 5.9 \mu\text{M}$ (2.69 $\mu\text{g/ml}$), $T_{max} = 2\text{h}$, $T_{1/2} = 3.6\text{h}$ 、10 mg/kg 投与時に $C_{max} = 1.0 \mu\text{M}$ (0.46 $\mu\text{g/ml}$), $T_{max} = 1\text{h}$, $T_{1/2} = 1.8\text{h}$ となった。

また、Q15 の作用機序を解明する目的で、標的タンパク質の探索を IVV 法により行ったところ、新たに MIP-2A(MBP-1 interacting protein-2A) が同定された。Q15 は MIP-2A と MBP-1(c-Myc promoter-binding protein-1)との結合を阻害し、MBP-1 の核移行を阻害し、その結果 c-Myc の mRNA の発現を減少させ、アポトーシスを誘導することがわかった。今後は、アニリノキナゾリン誘導体 Q50 についてマウスを用いた増殖や転移などの *in vivo* 抗腫瘍活性の評価を継続する。昨年度は 10 mg/kg 投与で抗腫瘍活性の評価を行なったが、今後は、より高い血中濃度が持続される 30 mg/kg の投与で再実験を実施する。また、Q50 のビオチン化誘導体の合成が完了したので、AXT 細胞より調製した mRNA ライブラリーから IVV 法を用いて Q50 の標的タンパク質の探索を行なっている。

3)癌幹細胞に対する抗ニッチ抗体医薬の開発

【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¹⁵⁾を用いて解明する。

【方法、結果】前年度までに IVV 法により取得した、AXT 細胞が細胞プレートへ接着するのを阻害する一本鎖抗体 AXT7-30 は、濃度依存的に AXT 細胞の増殖を抑制し、強い殺細胞活性 ($IC_{50} = 3 \text{ nM}$)を有しており、CD44 に対して高い親和性 ($K_D = 2.3 \times 10^{-9}\text{M}$)を有することを示してきた。抗 CD44 抗体が殺細胞活性を如何に惹起させるのか興味もたれるが、本年度は、CD44 の発現量と増殖阻害の相関を調べる目的で各種細胞株に対して AXT7-30 の効果を調べた。CD44 高発現細胞であるヒト大腸癌細胞 (HCT116)、胃癌上皮細胞 (KATOIII)、ヒト結腸がん細胞 (HT29) の3種、CD44 低発現である胃癌上皮細胞 (AGS) また CD44 発現ネガティブである胃癌細胞 (MKN28) を使って WST-1 アッセイによる増殖阻害実験を行ったところ、いずれの細胞株に対しても増殖阻害を示さなかった。このことは、抗 CD44 抗体 AXT7-30 が選択実験に用いた骨肉腫 iCSC である AXT 細胞に対し高い特異性を有することを示唆している。現在マウスを用いた増殖や転移などの抗腫瘍活性のアッセイを実施中である。今後は、抗 CD44 抗体 AXT7-30 による殺細胞活性のメカニズムを明らかにするために、遺伝子発現に対する影響を DNA マイクロアレイなどにより調べる。

4)CD44v と xCT の相互作用を阻害する抗 CD44v 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】AXT細胞に対する選択実験で得られた前記抗CD44抗体AXT7-30を使って細胞内GSHレベルをGSH-Glo Glutathione Assayで評価した。口腔扁平上皮癌細胞株OSC-19の細胞内GSHレベルに対してAXT7-30は影響を与えなかったが、AXT細胞の細胞内GSHレベルを濃度依存的に低下させた。抗CD44抗体AXT7-30の殺細胞活性を惹起させる一因であることが示唆される。今後は、上述したように抗CD44抗体AXT7-30が腫瘍を退縮させるかどうかマウスで検証する。また、抗CD44抗体処理後にROSによる酸化ストレスシグナルの指標となるリン酸化p38レベルが上昇するかどうか検証する。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

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* **231**: 2849-2861, 2012 (DOI:10.1038/onc.2011.462)
- 2.. Kai K, Iwamoto T, Kobayashi T, Arima Y, Takamoto Y, Ohnishi N, Bartholomeusz C, Horii R, Akiyama F, Hortobagyi GN, Pusztai L, Saya H* and Ueno NT*: *Ink4a/Arf*^{-/-} and *HRAS(G12V)* transform mouse mammary cells into triple-negative breast cancer containing tumorigenic CD49f⁻ quiescent cells. *Oncogene* (in press) 2013 (DOI:10.1038/onc.2012.609) (*co-corresponding authors)
3. Kobayashi Y, Banno K, Shimizu T, Ueki A, Tsuji K, Masuda K, Kisu I, Nomura H, Tominaga E, Nagano O, Saya H and Aoki D: Gene expression profile of a newly established choriocarcinoma cell line, iC(3)-1, compared to existing choriocarcinoma cell lines and normal placenta. *Placenta* **34**: 110-118, 2013 (DOI:10.1016/j.placenta.2012.11.003)
4. Ueki A, Shimizu T, Masuda K, Yamaguchi SI, Ishikawa T, Sugihara E, Onishi N, Kuninaka S, Miyoshi K, Muto A, Toyama Y, Banno K, Aoki D and Saya H: Up-regulation of Imp3 confers in vivo tumorigenicity on murine osteosarcoma cells. *PLoS One* **7**: e50621, 2012 (DOI:10.1371/journal.pone.0050621)

5. Ishikawa T, Shimizu T, Ueki A, Yamaguchi S, Onishi N, Sugihara E, Kuninaka S, Miyamoto T, Morioka H, Nakayama R, Kobayashi E, Toyama Y, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Yamaguchi R, Miyano S and Saya H: Twist2 functions as a tumor suppressor in murine osteosarcoma cells. *Cancer Sci* 2013 (in press)
6. Osuka S, Sampetean O, Shimizu T, Saga I, Onishi N, Sugihara E, Okubo J, Fujita S, Takano S, Matsumura A and Saya H: IGF1 receptor signaling regulates adaptive radioprotection in glioma stem cells. *Stem Cells* **31**: 627-640, 2013
(DOI:10.1002/stem.1328)
7. Arima Y, Hayashi N, Hayashi H, Sasaki M, Kai K, Sugihara E, Abe E, Yoshida A, Mikami S, Nakamura S and Saya H: Loss of p16 expression is associated with the stem cell characteristics of surface markers and therapeutic resistance in estrogen receptor-negative breast cancer. *Int J Cancer* **130**: 2568–2579, 2012
(DOI:10.1002/ijc.26271)
8. Matsuzaki Y, Hosokai H, Mizuguchi Y, Fukamachi S, Shimizu A and Saya H: Establishment of *HRAS^{G12V}* transgenic medaka as a stable tumor model for *in vivo* screening of anticancer drugs. *PLoS One* **8**: e54424, 2013
(DOI:10.1371/journal.pone.0054424)
9. Yae T, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Motohara T, Yoshikawa M, Yoshida GJ, Wada T, Masuko T, Mogushi K, Tanaka H, Osawa T, Kanki Y, Minami T, Aburatani H, Ohmura M, Kubo A, Suematsu M, Takahashi K, Saya H* and Nagano O*: Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. *Nat Commun* **3**: 883, 2012 (DOI:10.1038/ncomms1892)
(*co-corresponding authors)
10. Yoshikawa M, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Yae T, Motohara T, Sugihara E, Onishi N, Masuko T, Yoshizawa K, Kawashiri S, Mukai M, Asoda S, Kawana H, Nakagawa T, Saya H* and Nagano O*: xCT inhibition depletes CD44v-expressing tumor cells that are resistant to EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **73**: 1855-1866, 2013
(DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-3609-T)(*co-corresponding authors)
11. Fierro S, Yoshikawa M, Nagano O, Yoshimi K, Saya H and Einaga Y: *In vivo* assessment of cancerous tumors using boron doped diamond microelectrode. *Scientific Reports* **2**, Article number:901, 2012 (DOI:10.1038/srep00901)
12. Tsugawa H, Suzuki H, Saya H, Hatakeyama M, Hirayama T, Hirata K, Nagano O, Matsuzaki J and Hibi T: Reactive oxygen species-induced autophagic degradation of Helicobacter pylori CagA is specifically suppressed in cancer stem-like cells. *Cell Host & Microbe* **12**: 764-777, 2012 (DOI:10.1016/j.chom.2012.10.014)

13. 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., Yanagawa, H.: A phthalimide derivative that inhibits centrosomal clustering is effective on multiple myeloma. *PLoS ONE*, **7**, e38878, 2012
(DOI:10.1371/journal.pone.0038878)
14. Shiheido, H., Naito, Y., Kimura, H., Genma, H., Takashima, H., Tokunaga, M., Ono, T., Hirano, T., Du, W., Yamada, T., Doi, N., Iijima, S., Hattori, Y., Yanagawa, H.: An anilinoquinazoline derivative inhibits tumor growth through interaction with hCAP-G2, a subunit of condensin II. *PLoS ONE*, **7**, e44889, 2012
(DOI:10.1371/journal.pone.0044889)
15. Sumida, T., Yanagawa, H., Doi, N.: *In vitro* selection of Fab fragments by mRNA display and gene-linking emulsion PCR. *J. Nucleic Acids*, **2012**, 371379, 2012
(DOI:10.1155/2012/371379)

(3-2) 知財出願

- ① CREST 研究期間累積件数(国内 4 件)