

研究の分類・属性

基礎系

研究の概要

がん幹細胞は、しばしば治療抵抗性を示して治療後に残存し、再発の原因となると考えられる。がん組織の維持や再生には、がん幹細胞は自己複製能を維持すると共に、これらの周囲を取り囲む間質細胞が形成する幹細胞ニッチが必要である。本研究では、がん幹細胞の自己複製や治療抵抗性の分子メカニズムを解明することにより、がん幹細胞根絶の標的分子やその他の鍵分子を同定し、新たな根治療法の開発に向けた探索的基盤研究を行う。また、がん幹細胞の維持に重要な周囲間質細胞を同定し、それらの構成細胞の生物像を解明し、がん治療法の開発基盤とすることを旨とする。申請者らは、ヒトおよびマウスの種々の正常細胞に、ヒトがんで変異や高い発現が見られる遺伝子セットを導入することにより、様々な人工がん幹細胞システムを確立することに成功し、これらを試験内で維持する技術およびヒトがんを模倣する動物モデルを確立し、発現プロファイル解析や機能的スクリーニングによりがん幹細胞特異的に発現作用する因子を同定している。これらのシステムや知見を基盤として、がん幹細胞の成立・維持機構を解析することにより、がん幹細胞の自己複製や治療抵抗性の分子機構を明らかにし、これらを制御する鍵因子を同定する。これらの因子の条件的遺伝子欠損マウス等を用いてがんが治癒するかどうかを検証することにより、がん幹細胞の自己複製に必要な不可欠な因子を同定する。新たな治療薬開発のため、これまでに樹立した人工がん幹細胞とこれらを試験内で維持培養する技術を応用した新たな治療薬のスクリーニングシステムを既に樹立していて、これらのシステムを用いてがん幹細胞に特異的に効果を示す低分子化合物の同定や抗体医薬の開発を行ない、マウスモデル及びヒト癌幹細胞移植モデルを用いて治療薬の効果を検証する。

研究経費

28,800 千円

研究班の組織

| | | |
|--------|-----------------------------------|--------------------------|
| 北林 一生 | 国立がん研究センター研究所・造血器腫瘍研究分野長 | 白血病におけるがん幹細胞を標的とした治療法の開発 |
| 清野 透 | 国立がん研究センター研究所・ウイルス発がん研究分野長 | ヒト人工がん幹細胞株の樹立と特性の研究 |
| 岡本 康司 | 国立がん研究センター研究所・がん分化制御解析分野長 | 固形がん幹細胞制御因子の同定及び解析 |
| 石井 源一郎 | 国立がん研究センター臨床開発センター・臨床腫瘍病理部病理形態室 長 | がん幹細胞の生物像に影響を及ぼす間質細胞の同定 |

研究の目的と到達目標及び実績要点

全期間

(目的と到達目標) :

がん幹細胞は、しばしば治療抵抗性を示して治療後に残存し、再びがん組織を再生して再発の原因となると考えられている。申請者らは、ヒト急性骨髄性白血病で見られる融合遺伝子を導入した白血病マウスモデルにおいて、遺伝子工学的手法を用いてがん幹細胞特異的にアポトーシスを誘導することにより白血病が治癒することを証明した。この結果は、がん幹細胞を根絶することにより、がんが根治できることを示唆している。本研究では、第一にがん幹細胞の自己複製や治療抵抗性を示す分子メカニズムを解明することにより、がん幹細胞根絶の標的分子やその他の鍵分子を探索・同定し、新たな根治療法の開発に向けた探索的基盤研究を行う。解析の進展している急性骨髄性白血病については治療薬の開発を積極的に進める一方で、解析途上のがんについては萌芽的な基盤的研究も推進する。

また、がん幹細胞の自己複製能の維持には周囲を取り囲む間質細胞が必要である。申請者らは、がんの進展、転移巣形成過程には、周囲を取り囲む間質細胞の生物像が深く関わっていることを報告してきた。このことは、遺伝子変異により規定されていると考えられていたがん細胞自身の形質は固定されたものではなく、周囲間質細胞との相互作用により生じる分子レベルの変化が、がん幹細胞とその他のがん細胞の階層性に影響を与える可能性を示している。本研究では、第2にがん幹細胞の維持に必要な間質細胞集団を同定し、それら構成細胞の生物像を解明し、がん治療法の開発基盤とすることを旨とする。

がん幹細胞をヒトがん組織から大量に得ることは困難であるが、申請者らは種々の臓器由来のヒト正常細胞にいくつかのがん関連遺伝子を導入することにより、がん幹細胞を誘導することに成功している。そこで、これまでに樹立したヒト人工がん幹細胞について、多種のがんに於いて共通に、あるいは、細胞種特異的にがん幹細胞性に関わる主要な因子の同定を試みる。さらに、種々の人工がん幹細胞に共通かつ特異的に効果を示す分子標的の同定と新たな治療薬開発のためのスクリーニングシステムを樹立する。また、申請者が確立した機能的スクリーニングや各種発現プロファイリング等を行うことによりがん幹細胞を制御する分子メカニズムを解明する。

第1年次

(到達目標)

- 1 白血病におけるがん幹細胞を標的とした治療法の開発
急性骨髄性白血病のがん幹細胞に強く発現する M-CSF 受容体に対する阻害剤および M-CSF 受容体に対する抗体の治療効果を、マウスモデルを用いて検証する。
- 2 固形がん幹細胞制御因子の同定及び解析
既に確立した大腸がん由来スフェロイド細胞の継代培養系において、がん幹細胞としての検証をすすめ、その生物学的特質の理解を深めると共に、p53, Oct-3/4, Nanog 等のがん抑制因子、幹細胞制御因子の発現解析や機能解析を行い、効率のよい、機能スクリーニングの系の確立に努める。
- 3 がん幹細胞の生物像に影響を及ぼす間質細胞の同定
外科切除標本(肺扁平上皮癌)を用いて、がん始原細胞を免疫組織学的あるいは形態学的に同定し、それら細胞の周囲に存在する間質細胞集団の遺伝子/蛋白プロファイルを作製し、転移・再発に影響を与える間質細胞集団の同定を試みる。
- 4 ヒト人工がん幹細胞株の樹立と特性の研究
ヒト正常膀胱上皮細胞に CDK4, Cyclin D1, TERT を導入することで得られた正常不死化細胞にヒト膀胱がんを高頻度に見つかる活性型 KRAS などのがん遺伝子を導入することで造腫瘍性細胞株を樹立する。

(年次評価時点の実績要点)

- 1 白血病におけるがん幹細胞を標的とした治療法の開発
M-CSF 受容体に対する阻害剤 Ki20228 および M-CSF 受容体に対する ADCC 活性抗体が急性骨髄性白血病モデルマウスの発症を抑制した。
- 2 固形がん幹細胞制御因子の同定及び解析
大腸がん幹細胞の培養系を確立するとともに、網羅的な RNAi による遺伝子抑制によるスクリーニングの系を確立した。又、大腸がん細胞株において幹細胞制御因子である Nanog の重要性を明らかにした。
- 3 がん幹細胞の生物像に影響を及ぼす間質細胞の同定
肺扁平上皮癌組織切片を用いて、がん始原細胞(腫瘍胞巣辺縁に存在する Laminin-5 陽性細胞)周囲に動員されるがん関連線維芽細胞(CAFs)には、podoplanin 分子が高発現していることを見出した。また、podoplanin 発現 CAFs 陽性症例は、陰性症例と比較して有意に予後不良 ($p < 0.001$) であった。

4 ヒト人工がん幹細胞株の樹立と特性の研究

膵管細胞の不死化に成功し、変異 p53 と活性型 KRAS を導入することで弱いながら造腫瘍性を示す細胞株を樹立し、さらに MYC を導入することで安定して1ヶ月以内に造腫瘍性を示す細胞株の樹立に成功した。

研究成果と考察

第1年次評価時点

1 白血病におけるがん幹細胞を標的とした治療法の開発

M-CSF 受容体に対する阻害剤 Ki20228 および M-CSF 受容体に対する ADCC 活性抗体と中和抗体を急性骨髄性白血病モデルマウスに投与したところ、Ki20228 および ADCC 活性抗体の投与により、コントロール群に比較して発症が顕著に遅れることが示された。中和抗体による優位な効果は見られなかった。これらの結果から、中和抗体より、ADCC 活性抗体により強い白血病抑制効果があることが示唆された。

2 固形がん幹細胞制御因子の同定及び解析

同定した大腸がん由来のスフェロイド培養細胞が、種々の解析により、がん幹細胞としての特質を有することを確認した。このようにして確立された細胞は、がん幹細胞を標的とした制御因子や、小分子化合物の大規模スクリーニング等に用いられる予定である。がん幹細胞及び、大腸がん細胞株における発現解析により、これらの細胞のおおくが Nanog 遺伝子を発現している事、さらにがん細胞株を用いた実験により、Nanog 遺伝子の発現が、大腸がん細胞の増殖能を促進する事を明らかにした。各種発現ライブラリーを用いた効率のよい機能的スクリーニングの系の確立をめざした基礎的な研究を進めたが、これらのスクリーニング技術は、がん幹細胞を標的とした制御因子の同定への応用が期待される。

3 がん幹細胞の生物像に影響を及ぼす間質細胞の同定

Podoplanin, Laminin-5, CD44 は、がん始原細胞の局在(腫瘍胞巣辺縁)に一致した陽性所見を示した。がん細胞の E-cadherin 陰性群 (n=24: 17%) は、陽性群 (n=118: 83%) に比して有意に予後不良 (p=0.025) であった。がん細胞の Laminin-5 陽性群 (n=34: 24%) は、陰性群 (n=108: 76%) に比して予後不良傾向 (p=0.08) であった。CAFs の podoplanin 陽性群 (n=44: 31%) は、陰性群 (n=98: 69%) に比較して有意に予後不良 (p<0.001) であった。がん細胞の Laminin-5 陽性群と CAFs の podoplanin 陽性群に有意な正の相関関係を認めた (p<0.001)。がん細胞の CD44 陽性群と CAFs の CAIX 陽性群に有意な正の相関関係を認めた (p=0.03)。がん細胞が E-cadherin 陰性で、CAFs が podoplanin 陽性の症例群 (n=10) は5年生存率10%、生存期間中央値1235日であり、他群と比較して有意に予後不良であった (p<0.01, p<0.001)。これらの結果から、原発性肺扁平上皮癌において、がん細胞が E-cadherin 陰性で、かつ CAFs が podoplanin 陽性であるがん組織は、悪性度が高い微小環境を有していることが示唆された。また、Laminin-5 発現がん始原細胞と、周囲に動員されている Podoplanin 発現 CAFs が形成するがん組織微小環境は、本研究の標的になりうるものと考えた。

4 ヒト人工がん幹細胞株の樹立と特性の研究

これまでの、ヒト子宮頸がん、卵巣がん、舌がんに加え、膵がんの *in vitro* 多段階発がんモデルの作成により人工がん幹細胞の作出を試みた。これまでに、11症例の患者検体より膵管細胞の培養を試み、7例で培養と長期延命(不死化)に成功した。これらを用い、変異 p53(または p53 特異的 siRNA)と活性型 KRAS を導入することで弱いながら造腫瘍性を示す(ヌードマウス皮下の移植後約3ヶ月後に腫瘍を形成する)細胞株の樹立に成功している。さらに MYC を導入することで安定して1ヶ月以内に造腫瘍性を示す細胞株の樹立に成功している。MYC の発現量に応じて細胞の増殖・浸潤、分化抵抗性が変化し、腫瘍の組織像も変化する印象を得ており現在検証を進めている。さらに、胆道がんについても同様な解析ができるよう準備を進めている。

倫理面への配慮

ヒト遺伝子及びヒト腫瘍サンプルを用いた実験、解析を実施する際には、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、各研究施設や大学の遺伝子解析研究倫理審査委員会において研究計画の審査を受け、委員会の承認が得られた上で研究を実施する。手術材料より得た細胞を使用するにあたっては患者に不利益の生じないよう、連結可能匿名化し、またインフォームドコンセントを得るなどの配慮をし、国立がん研究センター倫理審査委員会の承認を得ている(承認番号 16-69)。細胞への遺伝子導入にあたっては、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律に基づき申請し、国立がん研究センター遺伝子組換え実験安全委員会の審査を経て、理事長の承認を受ける。本研究に必要となる動物実験については「国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」に従い動物実験倫理委員会に申請を行う。遺伝子組み換え実験に関しては、「遺伝子組み換え実験に関する指針」に従い、カルタヘナ法の遵守を徹底する。

本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

(雑誌論文)

平成23年度

1. Ozeki C, Sawai Y, Shibata T, Kohno T, Okamoto K, Yokota J, Tashiro F, Tanuma SI, Sakai R, Kawase T, Kitabayashi I, Taya Y, Ohki R. Cancer susceptibility polymorphism of p53 at codon 72 affects phosphorylation and degradation of p53 protein. *J Biol Chem.*, 286:18251-18260, 2011.
2. Yokoyama A, Ficara F, Murphy MJ, Meisel C, Naresh A, Kitabayashi I, Cleary ML. Proteolytically cleaved MLL subunits are susceptible to distinct degradation pathways. *J Cell Sci.*, 124:2208-2219, 2011.
3. Shima Y, Kitabayashi I. Deregulated transcription factors in leukemia. *Int J Hematol.* 94:134-41, 2011.
4. Mishima Y, Miyagi S, Saraya A, Negishi M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Shinga J, Katsumoto T, Chiba T, Yamaguchi N, Kitabayashi I, Koseki H, Iwama A. The Hbo1-Brd1/Brpf2 complex is responsible for global acetylation of H3K14 and required for fetal liver erythropoiesis. *Blood.* 118:2443-53, 2011.
5. Fujiwara S, Nawa A, Luo C, Kamakura M, Goshima F, Kondo C, Kiyono T, Kikkawa F, Nishiyama Y. Carrier cell-based delivery of replication-competent HSV-1 mutants enhances antitumor effect for ovarian cancer. *Cancer Gene Ther* 18: 77-86, 2011.
6. Kyo, S., J. Sakaguchi, T. Kiyono, Y. Shimizu, Y. Maida, Y. Mizumoto, N. Mori, M. Nakamura, M. Takakura, K. Miyake, M. Sakamoto, and M. Inoue. Forkhead transcription factor FOXO1 is a direct target of progesterin to inhibit endometrial epithelial cell growth. *Clin Cancer Res* 17:525-537, 2011.
7. Mizumoto, Y., S. Kyo, T. Kiyono, M. Takakura, M. Nakamura, Y. Maida, N. Mori, Y. Bono, H. Sakurai, and M. Inoue. Activation of NF- κ B Is a Novel Target of KRAS-Induced Endometrial Carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 17:1341-1350, 2011.
8. Shaker, M., Y. Yokoyama, S. Mori, M. Tsujimoto, N. Kawaguchi, T. Kiyono, T. Nakano, and N. Matsuura. Aberrant expression of disintegrin-metalloprotease proteins in the formation and progression of uterine cervical cancer. *Pathobiology* 78:149-161, 2011.
9. Shiomi, K., T. Kiyono, K. Okamura, M. Uezumi, Y. Goto, S. Yasumoto, S. Shimizu, and N. Hashimoto. CDK4 and cyclin D1 allow human myogenic cells to recapture growth property without compromising differentiation potential. *Gene Ther*, 2011.
10. Yamato, K., N. Egawa, S. Endo, K. Ui-Tei, T. Yamada, K. Saigo, I. Hyodo, T. Kiyono, and I. Nakagawa. Enhanced specificity of HPV16 E6E7 siRNA by RNA-DNA chimera modification. *Cancer Gene Ther* 18:587-597, 2011.
11. Zushi, Y., M. Narisawa-Saito, K. Noguchi, Y. Yoshimatsu, T. Yugawa, N. Egawa, M. Fujita, M. Urade, and T. Kiyono. An in vitro multistep carcinogenesis model for both HPV-positive and -negative human oral squamous cell carcinomas. *Am J Cancer Res* 1:869-881, 2011.
12. K. Okamoto, T. Ishiguro, Y. Midorikawa, H. Ohata, M. Izumiya, N. Tsuchiya, A. Sato, H. Sakai, H. Nakagama. miR-493 induction during carcinogenesis blocks metastatic settlement of colon cancer cells in liver. *EMBO J.* 31, 1752-1763, 2012
13. T. Ishiguro, A. Sato, H. Ohata, H. Sakai, H. Nakagama, K. Okamoto: Differential expression of nanog1 and nanogp8 in colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 418, 199-204, 2012.
14. M. Izumiya, N. Tsuchiya, K. Okamoto, H. Nakagama: Systematic exploration of cancer-associated microRNA through functional screening assays. *Cancer Sci.* 102, 1615-21, 2011,
15. N. Tsuchiya, M. Izumiya, H. Ogata-Kawata, K. Okamoto, Y. Fujiwara, M. Nakai, A. Okabe, A.J. Schetter, E.D. Bowman, Y. Midorikawa, Y. Sugiyama, H. Aburatani, C.C. Harris, H. Nakagama: Tumor-suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21. *Cancer Res.* 71, 4628-4639, 2011.
16. Aokage, K, Ishii G*, Ohtaki Y, Yamaguchi Y, Hishida T, Yoshida J, Nishimura M, Nagai K, Ochiai A. Dynamic molecular changes associated with epithelial-mesenchymal transition and subsequent mesenchymal-epithelial transition in the early phase of metastatic tumor formation *Int. J. Cancer* 128:1585-95, 2011.
17. Hoshino A, Ishii G*, Ito T, Aoyagi K, Ohtaki Y, Nagai K, Sasaki H and Ochiai A. Podoplanin-positive fibroblasts enhance lung adenocarcinoma tumor formation *Cancer Res.* 71(14):4769-79, 2011.
18. Takahashi Y, Ishii G*, Taira T, Fujii S, Yanagi S, Yoshida J, Nishimura M, Nomori H, Nagai K, Ochiai A. Fibrous stroma is associated with poorer prognosis in lung squamous cell carcinoma patients *J Thorac Oncol.*

6(9):1460-7, 2011.

19. Maeda R, Ishii G*, Ito M, Yoshida J, Hishida T, Nishimura M, Haga H, Nagai K, Ochiai A. Number of circulating endothelial progenitor cells and intratumoral microvessel density in non-small cell lung cancer patients: differences in angiogenic status between adenocarcinoma histological subtypes J Thorac Oncol. 7(3):503-11,2012.
20. Taira, T , Ishii G*, Nagai K, Yoh K, Takahashi Y, Matsumura Y, Kojima M, Ohmatsu H, Goto K, Niho S, Takeshima H, Inoue H, Ohe Y, Ochiai A. Characterization of the immunophenotype of the tumor budding and its prognostic implications in squamous cell carcinoma of the lung. Lung Cancer Epub ahead of print.2011.