

(平成 25 年度研究報告書)

23-A-12 がん幹細胞に対する新規分子標的治療薬の
開発を目指した基盤研究

北林 一生
独立行政法人国立がん研究センター
研究所 造血器腫瘍研究分野 分野長

研究の分類・属性

発がん・がん生物学

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目指す。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。

平成 25 年度研究経費

23,511 千円

研究班の組織

北林 一生	研究所 造血器腫瘍研究分野 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	研究所 ウイルス発がん研究分野 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	研究所 がん分化制御解析分野 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	東病院 臨床開発センター 臨床腫瘍病理部病理 ユニット長	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3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

急性骨髄性白血病の幹細胞ではM-CSFR の発現が高いことを見出し、チロシンキナーゼ活性阻害剤が急性骨髄性白血病モデルマウスの発症を顕著に遅らせることを示し、M-CSF 受容体特異的 ADCC 活性抗体がモデルマウスで強い抗白血病効果を示したので、M-CSF 受容体に対する ADCC 活性抗体の開発を理化学研究所と共同で開始した。IDH 遺伝子変異を有する急性骨髄性白血病モデルを確立し、Cre-loxP システムを用いて IDH 変異体の発現が AML 幹細胞の維持に必須であり IDH 変異体が有望な治療標的であることを示した。

2 固形がん幹細胞制御因子の同定及び角嚢斥

ヒト大腸がん及び卵巣がん（漿液性がん）由来スフェロイド細胞の継代培養系を確立し、造腫瘍能、分化能、幹細胞マーカーの発現等の検討により、これらの細胞は、がん幹細胞としての特性を有する事を示した。大腸がんスフェロイドにおいては、CD44 陽性細胞が、がん幹細胞としての特性を強く有していたが、CD44 の発現には、Akt-mTOR 経路の活性化が重要な役割を果たしていた。これらの知見は、今後のがん幹細胞を標的とした治療戦略を構築する際に重要な知見と考えられた。

3 がん幹細胞の生物像に影響を及ぼす間質細胞の同定

肺腺癌症例を用いた検討では、リンパ管内の腫瘍細胞が ALDH1(-) 症例は、リンパ節転移巣を有意に認めた。さらに、リンパ管内腫瘍組織内に CD204(+) マクロファージが多く浸潤する症例では、有意にリンパ節転移巣を認めた。In vitro の系では、ALDH1 活性 (-) 細胞が形成する浮遊コロニーは、より大型のコロニーを形成した。以上より、脈管内の ALDH1 (-) の腫瘍細胞は、転移形成能が高い可能性が示された。今後は、CD204(+) マクロファージが、がん始原細胞 (ALDH1 活性陰性の腫瘍細胞) の生物像に影響を及ぼす分子機構を検討する。

4 ヒト人工がん幹細胞株の樹立と特性の研究

膵管上皮細胞に加え、胆管上皮細胞、胆のう細胞、末梢肺上皮細胞の分離および長期培養に成功した。これらの初代正常上皮細胞に p53 および pRB 経路の不活化とテロメラ」ゼの活性化、活性型 KRAS, c-MYC の発現を tetOff シス

テムを用いて同時に誘導することで、正常細胞からがん幹細胞の性質を持つ細胞への変換が可能である。マウス Xenograft では遺伝子発現誘導に依存して腺がんを形成した後、遺伝子発現を止めると正常腺管様構造を取ること、遺伝子発現を再誘導すると再び腺がんを形成することから、この細胞の生物学的な可逆性も示された。この系を用いれば、同じ細胞を用いて in vitro ならびに in vivo においても人工がん幹細胞に特異的に毒性を示すような薬剤をスクリーニングすることができる。

第3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
得られたヒト M-CSF 受容体抗体の基質特異性・解離定数・ADCC 活性を調べ、基質特異性・解離定数・ADCC 活性の高いクローンについてマウス AML モデルに投与し、治療効果を検討する。
- 2 固形がん幹細胞制御因子の同定及び解析
ヒト大腸がん及び卵巣がん由来のがん幹細胞の解析を行い、その増殖及び分化可塑性の制御機構を明らかにする。又、転移抑制に働く miR-493 のターゲット分子の解析を通じて、大腸がん肝転移の制御メカニズムを解明する。
- 3 転移形成に関わる脈管内微小環境の解析
2年次に確立した in vitro のアッセイ系を用い、幹細胞マーカー陽性がん細胞と間質細胞とが形成する浮遊コロニーの性状を検討する。
- 4 ヒト人工がん幹細胞株の樹立と特性の研究
不死化正常上皮幹細胞とそこから作出した人工がん幹細胞(iCSC)をセットとして、分子標的候補遺伝子の発現抑制や機能抑制により iCSC に apoptosis、増殖停止、分化誘導、細胞老化などを誘導できるかを試すと共に、iCSC の増殖を特異的に阻害する低分子化合物や shRNA を探索可能なスクリーニング系を開発する。

(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
4つの変異遺伝子を導入することにより IDH 遺伝子変異を有する急性骨髄性白血病モデルを確立し、Cre-loxP システムを用いて、IDH 変異体の発現が AML 幹細胞の維持に必須であり、IDH 変異体が有望な治療標的であることを示した。IDH 遺伝子変異体に対する特異的阻害剤を開発し、マウスモデルにおいて白血病細胞を減少させる効果があることを確認した。
- 2 固形がん幹細胞制御因子の同定及び解析
大腸がん幹細胞の生化学的解析をさらなる進展により、その in vitro における増殖に Akt-mTOR 経路の活性化が必要である事を明らかにした。又、卵巣がん幹細胞の解析により、その増殖に ALDH1、Sox2 の幹細胞特異的因子の発現が必要である事、及び分化可塑性を有している事を見いだした。
- 3 がん幹細胞の生物像に影響を及ぼす間質細胞の同定
リンパ管内腫瘍の性状とリンパ節転移との相関を検討した。リンパ管内腫瘍細胞 ALDH-1 陰性症例は、有意にリンパ節転移巣を有することを明らかにした。さらに、リンパ管内腫瘍に CD204(+) マクロファージが多く浸潤する症例では、有意にリンパ節転移巣を認めた。肺腺癌細胞株を用いた Single cell derived colony assay 法では、ALDH1 活性陰性細胞が形成する浮遊コロニーは、陽性細胞が形成する浮遊コロニーと比較して大型のコロニーを形成する傾向を示した。
- 4 ヒト人工がん幹細胞株の樹立と特性の研究
正常膵管上皮細胞に加え正常胆管上皮細胞、正常胆のう上皮細胞、末梢肺上皮細胞をこ p53 および pRB 経路の不活性化とテロメラーゼの活性化、活性型斑 KRAS , c-MYC の発現を tetOff システムを用いて同時にこ誘導できる細胞を樹立し、これらの遺伝子発現に依存し正常上皮細胞とがん幹細胞の性質を可逆的に獲得する細胞を樹立した。

研究成果と考察

全期間 (第3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
MOZ 融合遺伝子や MLL 融合遺伝子を発現する急性骨髄性白血病の幹細胞では M-CSFR の発現が高いことを見出し、マウスモデルを用いて M-CSFR の発現が高い幹細胞を除去することにより、白血病が治癒することを証明した。M-CSFR を標的とした治療法を開発するため、M-CSF 受容体のチロシンキナーゼ活性阻害剤 Ki20228 (キリンファーマ) 及び PLX3392 (プレキシコン社)、マウス M-CSF 受容体に対する ADCC 活性抗体 (理化学研究所との共同開

発)と中和抗体 (AMGEN 社)を急性骨髄性白血病モデルマウスに投与した。チロシンキナーゼ活性阻害剤の投与により、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。これらの結果を受けてプレキシコン社は第1・2相臨床試験を米国で開始した。また、ADCC 活性抗体には強い抗白血病効果が認められたが、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ので、ヒト M-CSF 受容体に対する ADCC 活性抗体の開発を開始した。

一方、4つの変異遺伝子 (*NPMc*, *IDH2/R140Q*, *DNMT3A/R882H* and *FLT3/ITD*)を導入することにより IDH 遺伝子変異を有する急性骨髄性白血病モデルを確立した。Cre-loxP システムを用いて *IDH2/R140Q* を欠損させると M-CSFR を発現する AML 幹細胞が顕著に減少し、AML の発症が抑制されたことから、IDH 変異体の発現が AML 幹細胞の維持に必須であり、IDH 変異体が有望な治療標的であることが強く示唆された。第一三共との共同研究により IDH 遺伝子変異体に対する特異的阻害剤を開発し、マウスモデルにおいて白血病細胞を減少させる効果があることを確認した。

2 固形がん幹細胞制御因子の同定及び解析

全期間を通して、ヒト大腸がんの、及び2年次より卵巣がん由来のがん幹細胞の *in vitro* 培養及び生化学的解析を行った。

大腸がん幹細胞に関しては、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、造腫瘍能、分化能、幹細胞マーカーの発現、解糖系の亢進等、がん幹細胞としての特質を有することを確認した。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、これらの細胞の多くが *Nanog* 遺伝子を発現している事、さらに大腸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。さらに、大腸がん幹細胞における Akt-mTOR 経路の重要性を明らかにしたが、この事は近年開発が進んでいる mTOR の阻害剤が、大腸がんの治療応用に使用しうる可能性を示している。

一方、卵巣がん由来のがん幹細胞のスフェロイド培養系の樹立も行った。分化能の解析の結果、大腸、卵巣由来の両がん幹細胞で、分化可塑性がある事を示した。すなわち、大腸がん幹細胞の場合は CD44 陽性及び陰性細胞間で、卵巣がん幹細胞の場合はスフェロイド細胞と血清培地での分化細胞間で、両方向性の移行が認められた。これらの知見は、がん幹細胞のみを治療標的とした場合、脱分化により分化細胞よりがん幹細胞が再生されてしまい、治療として成り立たなくなる可能性を示している。従って、これらはがん幹細胞を標的とした治療戦略を考える上で重要な知見と考えられる。

又、レンチウイルス発現ライブラリーを用いた機能的スクリーニング系の確立を行い、大腸がん肝転移を抑制するマイクロ RNA を同定したが、さらに同様の方法論で shRNA の機能的同定法を開発中である。これらのスクリーニング技術を、がん幹細胞を標的とした制御因子の同定へ応用し、新規のがん幹細胞制御因子の同定を行う事により、臨床研究への橋渡しをめざすべく、幾つかの技術的問題の解決にむけた研究を続行中である。

3 がん幹細胞の生物像に影響を及ぼす間質細胞の同定

第1年次では、ヒト肺扁平上皮癌原発巣を用いて、がん始原細胞とその周囲を取り巻く間質細胞の性状との相関を検討した。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。さらには、がん細胞の Laminin-5 陽性症例と間質細胞 (cancer associated fibroblasts) の podoplanin 陽性症例に有意な正の相関関係を認めた。以上から 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。しかしながら、「原発巣の生物像を基にして悪性像の評価をどのように解析していくか」、に関しては焦点がなかなか定まらず、今後の解析を考える上で適切ではないと考えた。そこで、より直接的な因果関係が期待される「転移直前のがん細胞の性状、すなわち脈管内がん細胞の性状」と「転移形成の有無」に焦点を当て、metastatic capacity が高い脈管内腫瘍細胞を、がん始原細胞と考えた。

第2年次では、がん細胞 1 個/well となるよう浮遊培養し、脈管内がん細胞の増殖を模倣するモデルを作製した。3.8%の well では大型浮遊コロニーが形成され、HGF 添加により大型コロニーの頻度は上昇した。大型浮遊コロニーは、形態学的に Type A; spheroid, Type B; dispersed (EMT-like phenotype を示す) に分類された。これらコロニーを SCID マウス皮下に移植した結果、大型コロニーおよび Type B コロニー移植群にて、腫瘍生着能が亢進していた。さらにはヒト肺がん組織脈管内の腫瘍細胞の形態を検討し、1) *in vitro* の結果と同様に Type A, B に分類されること、2) Type B の腫瘍塞栓を呈する症例は肺内転移を多く認めること、を確認した。以上から、脈管内腫瘍細胞の性状は、転移形成能と密接に関連することが明らかとなった。

第3年次の研究は、転移形成に関わる脈管内腫瘍の分子機構解析を目的とした。肺腺癌症例を用いて、リンパ管内腫瘍細胞が ALDH-1 陰性症例では、有意にリンパ節転移巣を有することを見出した。さらに、リンパ管内腫瘍組織内に CD204 (+) マクロファージが多く浸潤する症例では、有意にリンパ節転移巣を認めた。前年度に確立し

た single cell derived colony assay 法を用い、ALDH1 活性陰性細胞が形成する浮遊コロニーは、より大型のコロニーを形成する傾向を示すことを確認した。以上より、脈管内を浮遊している ALDH1 活性陰性の腫瘍細胞は、metastatic capacity が高い可能性が示された。今後は、CD204(+) マクロファージが、がん始原細胞 (ALDH1 活性陰性の腫瘍細胞) の生物像に影響を及ぼす間質細胞であると仮定し、浮遊コロニーの大きさあるいは腫瘍着生に影響を与える分子機構を検討する。以上の結果を踏まえ、がん細胞のみならず、周囲の間質細胞の生物像をも考慮したがん治療戦略の基盤作製を試みる。

4 ヒト人工がん幹細胞株の樹立と特性の研究

先行していた膀胱上皮細胞に加え、胆管上皮細胞、胆のう細胞、末梢肺上皮細胞の分離および長期培養に成功した。これらの初代正常上皮細胞に p53 および pRB 経路の不活化とテロメラーゼの活性化、活性型 KRAS, c-MYC の発現を tetOff システムを用いて同時に誘導することで、正常細胞からがん幹細胞の性質を持つ細胞への変換が可能である。p53 および pRB 経路の不活化とテロメラーゼの活性化には遺伝子サイズの小さな HPV16 E6/E7 遺伝子を用いた。HPV16 E6/E7 遺伝子は染色体不安定性を誘導し複数の細胞で 4 倍体化などの染色体異常を短期間に誘導することが知られている。しかし、少なくとも正常膀胱細胞では遺伝子発現誘導後もほぼ 2 倍体を維持しており、G-banding では全く異常の見つからない正常 2 倍体を維持する細胞が多く残っていることが明らかになった。今後、エピジェネティックな変化を含め可逆性を検討する必要があるが、少なくとも、これらの遺伝子発現により人工がん幹細胞化した後、遺伝子発現を止めることで正常上皮細胞へ可逆的に戻る可能性を示唆している。実際、マウス Xenograft では遺伝子発現誘導に依存して腺がんを形成した後、遺伝子発現を止めると正常腺管様構造を取ることで、遺伝子発現を再誘導すると再び腺がんを形成することから、この細胞の生物学的な可逆性も示されている。この系を用いれば、同じ細胞を用いて in vitro ならびに in vivo においても人工がん幹細胞に特異的に毒性を示すような薬剤をスクリーニングすることができる。この手法はこれまで試した全ての正常上皮細胞種で成功しており、ほとんどの上皮性腫瘍の人工幹細胞の作出や薬剤スクリーニングが可能であると考えられる。また、活性型 KRAS の代わりに EGFR, ERBB の他、ALK, RET, ROS などのキナーゼ融合遺伝子を用いることで、作出されるがん細胞の性状の解析や、各ドライバー変異に特異的な薬剤感受性の検討も可能である。また、この手法は正常細胞だけでなく株化の困難ながん細胞にも適用可能であり、一旦外来遺伝子群の発現誘導によりがん細胞を不死化・増幅すれば、培養環境の選択圧なくがん細胞を増幅することができ、これまで困難であった様々な研究に応用が可能である。例えば、この手法は非上皮性の希少がんにも有効であると考えられ、希少がんの細胞株を樹立した後に、本来の性状解析や培養条件の最適化などを行うことが可能である。

全期間 (研究終了時)

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

MOZ 融合遺伝子や MLL 融合遺伝子を発現する急性骨髄性白血病の幹細胞では M-CSFR の発現が高いことを見出し、マウスモデルを用いて M-CSFR の発現が高い幹細胞を除去することにより、白血病が治癒することを証明した。M-CSFR を標的とした治療法を開発するため、M-CSF 受容体のチロシンキナーゼ活性阻害剤、マウス 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。チロシンキナーゼ活性阻害剤の投与により、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。ADCC 活性抗体には強い抗白血病効果が認められたが、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ので、ヒト M-CSF 受容体に対する ADCC 活性抗体の開発を開始した。一方、4 つの変異遺伝子 (*NPMc*, *IDH2/R140Q*, *DNMT3A/R882H* and *FLT3/ITD*) を導入することにより IDH 遺伝子変異を有する急性骨髄性白血病モデルを確立した。Cre-loxP システムを用いて *IDH2/R140Q* を欠損させると M-CSFR を発現する AML 幹細胞が顕著に減少し、AML の発症が抑制されたことから、IDH 変異体の発現が AML 幹細胞の維持に必須であり、IDH 変異体が有望な治療標的であることが強く示唆された。IDH 遺伝子変異体に対する特異的阻害剤を開発し、マウスモデルにおいて白血病細胞を減少させる効果があることを確認した。

2 固形がん幹細胞制御因子の同定及び解析

ヒト大腸がん及び漿液性卵巣がん由来のがん幹細胞の in vitro 培養系の構築を行い、その生化学的解析により特性を明らかにする事を行なった。まず、大腸がん幹細胞の解析を先行して行ない、造腫瘍能、分化能、CD44 がん幹細胞マーカーの発現、解糖系の亢進等を認め、とりわけ CD44 陽性細胞ががん幹細胞としての特質を有する事を明らかにした。その後の解析で、CD44 の発現は Akt-mTOR 経路の活性化により引き起こされる事、さらに大腸がん幹細胞の特性維持に Akt-mTOR 経路が必須である事を見いだした。これらの知見は近年開発が進んでいる mTOR の阻害剤が、大腸がんの治療応用に使用しうる可能性を示している。一方、卵巣がん由来のがん幹細胞のスフェロイド培養系の樹立も行ない、各種解析によりがん幹細胞としての特質を有する事を明らかにした。又、分

化能の解析の結果、大腸、卵巣由来の両がん幹細胞で、分化可塑性がある事を示したが、これらはがん幹細胞を標的とした治療戦略を考える上で重要な知見と考えられた。

3 がん幹細胞の生物像に影響を及ぼす間質細胞の同定

第1年次では、ヒト肺扁平上皮癌原発巣を用いて、がん始原細胞とその周囲を取り巻く間質細胞に焦点を当てた。そして、両者の分子発現パターンを臨床病理学的に検討することにより、がん幹細胞の生物像に影響を及ぼす間質細胞の同定を試みた。しかしながら結果は芳しくなく、より直接的な因果関係が期待される「転移直前のがん細胞の性状、すなわち脈管内がん細胞の性状」と「転移形成の有無」に焦点を当て直した。上記を踏まえ、第2年次では、脈管内がん細胞の増殖を模倣するモデルを作製した。その結果、脈管内腫瘍細胞の性状（大きさ、形状）は、転移形成能と密接に相関することが明らかとなった。より具体的な成果を得るために、第3年次は肺腺癌症例を用いて、リンパ管内腫瘍細胞の性状と転移形成との関連を検討した。その結果、1) リンパ管内腫瘍細胞が ALDH-1 陰性症例では、有意にリンパ節転移巣を有すること、2) リンパ管内腫瘍組織内に CD204(+) マクロファージが多く浸潤する症例では、有意にリンパ節転移巣を形成したこと、を見出した。さらに、前年度に確立した colony assay 法を用い、ALDH1 活性陰性細胞が形成する浮遊コロニーは、より大型のコロニーを形成する傾向を示すことを確認した。以上より、ALDH1 活性陰性の脈管内腫瘍細胞は、転移形成能が高い“がん始原細胞”である可能性が示された。今後は、CD204(+) マクロファージが、がん始原細胞(ALDH1 活性陰性の脈管内腫瘍細胞)の生物像に影響を及ぼす間質細胞であると仮定し、腫瘍生着に影響を与える分子機構を検討する。

4 ヒト人工がん幹細胞株の樹立と特性の研究

膵管上皮細胞に加え、胆管上皮細胞、胆のう細胞、子宮内膜上皮細胞などの分離および長期培養に成功した。これらの初代正常上皮細胞に p53 および pRB 経路の不活化とテロメラーゼの活性化、活性型 KRAS, c-MYC の発現を tetOff システムを用いて同時に誘導することで、正常細胞からがん幹細胞の性質を持つ細胞への可逆的変換を可能にするシステムを構築した。マウス Xenograft では、がん遺伝子セットの発現誘導に依存して腺がんを形成した後、遺伝子発現を止めると正常腺管様構造を取ること、遺伝子発現を再誘導すると再び腺がんを形成することから、この細胞の生物学的な可逆性が確認できた。この系は in vitro ならびに in vivo においても人工がん幹細胞に特異的に毒性を示すような薬剤のスクリーニング系として有望である。また、活性型 KRAS の代わりに EGFR, ERBB の他、ALK, RET, ROS などのキナーゼ融合遺伝子などのドライバー変異を導入することで、各ドライバー変異に特異的ながんの特性の解析や薬剤感受性の検討も可能である。さらに、この手法は正常細胞だけでなくこれまで株化の困難であった希少がんなどにも応用可能である。

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。本研究に必要な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)

なし