

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22130004

研究課題名（和文）ニッチによるがん幹細胞制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of Niche Regulation for Cancer Stem Cells

研究代表者

須田 年生 (Toshio, Suda)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：60118453

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 131,900,000円

研究成果の概要（和文）：造血幹細胞は細胞周期をゆっくりと回っている。この静止期性により、幹細胞は外界からのストレスを受けにくくなっていて、長期にわたる造血にもかかわらずその消耗を免れていると考えられる。幹細胞の静止期性は、内的小および外的因子によって制御されている。我々は造血幹細胞の代謝を検討し、それらは低酸素性ニッチでHIF-1を発現し、嫌氣的代謝を営んでいることを見出した。HIF-1欠損マウスの造血幹細胞は好氣的代謝により、その静止期性を失い、消耗老化が進むことを見出した。

研究成果の概要（英文）：Stem cell maintenance in a halted cell-cycle state (i.e., quiescence) has been proposed as a fundamental property of HSCs. Maintenance of quiescence protects HSCs from functional exhaustion and naturally producing extrinsic cellular insults to enable lifelong hematopoietic cell production. HSC quiescence is regulated through a complex network of cell intrinsic regulations along with extrinsic influences from the microenvironment. Normal HSCs maintain intracellular hypoxia, stabilize the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) protein and generate ATP by anaerobic metabolism. In HIF-1 deficiency, HSCs became metabolically aerobic, lost cell cycle quiescence, and finally exhausted.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：癌幹細胞 ニッチ 活性酸素 血液腫瘍疾患 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は、予め幹細胞として運命づけられているというより、周辺の細胞や環境分子(ニッチ)によって、その動態が影響されると考えられる。本来、ニッチは、生態学的適所を意味する概念的な語であったが、近年の造血幹細胞のニッチ研究は、この数年間で飛躍的に進展し、その実体を明らかにしてきた。一方、癌幹細胞も造血幹細胞同様、骨梁の内側付近に局在する。癌幹細胞と呼ぶべき細胞がニッチ細胞との間に相互作用をもち、その増殖・生存を凶っている可能性がある。本新学術領域研究では、我々は、正常造血幹細胞およびそのニッチと対比させながら、骨髄腫、慢性骨髄性白血病(CML)などの造血器腫瘍において癌幹細胞がどのようなニッチ依存性を示すかを明らかにする。これらの解析を通して癌幹細胞ニッチの同定、ニッチ分子による癌幹細胞の細胞周期制御を解析し、新たな癌治療法を開発する。

2. 研究の目的

(1) 幹細胞の細胞周期ならびに腫瘍幹細胞ニッチ分子の同定とそのシグナル解析

癌幹細胞が、抗がん剤治療に対して抵抗性を示す一つの理由として、それらが細胞周期に入っていない、いわゆる静止期にあることによることが考えられる。この細胞周期制御の機構を、正常造血幹細胞で解析する。正常造血幹細胞ならびに癌幹細胞ニッチ細胞から産生される分子、接着分子を同定し、それらが幹細胞の静止期の維持・分裂にどのような作用を及ぼすかを解析する。我々は、幹細胞は、ニッチに接着して静止期を維持し、ニッチから離れて活性型幹細胞になると考えているが、この仮説をより詳細に検証する。FACSを用いて多様なニッチ細胞を分離し、遺伝子発現を検索し、その機能を、試験管内における幹細胞とニッチの再構成実験、遺伝子破壊マウスの移植実験などにより解析する。

(2) 幹細胞ならびに癌幹細胞の代謝学的解析

我々は世界に先駆けて、造血幹細胞機能における活性酸素種の関与を提唱してきた。幹細胞老化は、早老を示す ATM や FOXO3a 変異マウスなどにおいて確認され、ヒトの骨髄機能不全を説明する機構として注目されている(Nature, 2004, Cell Stem Cell, 2007)。低酸素性ニッチにあってミトコンドリアの少ない幹細胞の代謝学的特徴をメタボローム解析により明らかにする。また、DNA 損傷を蓄積する幹細胞の特性を

DNA 損傷反応の面から検討し、白血病・MDS(骨髄異形成症候群)の発症機構の解明につなげる

3. 研究の方法

(1) 幹細胞ニッチに関する研究

造血幹細胞、骨芽細胞性ニッチ細胞およびニッチ分子の機能を Single Cell Level で解析し、ニッチ複合体による造血幹細胞の自己複製・静止期維持の分子基盤を解明する。また、骨芽細胞性ニッチ分子の機能を活性化・抑制することにより、*in vivo*において造血幹細胞とニッチ相互作用を制御する系を確立する。すでに我々は、骨髄に存在する非血液細胞、非血管内皮細胞分画を分類することに成功している。興味深いことに、成熟骨芽細胞は主として N-cadherin, Osteopontin のような接着分子を、間葉系前駆細胞は Ang1, TPO のようなサイトカインを分泌していることが明らかとなりつつある。これをさらに詳細に解析し、重要ニッチ分子を絞り込む。

(2) 癌幹細胞ニッチに関する研究

ヒト骨髄腫細胞を GFP で標識し、免疫不全マウスに移植しその動態を解析する。これらの癌細胞は骨に強い親和性を示すことから、腫瘍細胞と骨芽細胞、破骨細胞、さらには間葉系細胞などのニッチ細胞を特定し、そのニッチ分子を Single Cell Level で解析する。CML に関しては、腫瘍細胞から産生されるサイトカインをニッチ因子と考えて、白血病進展に及ぼす作用を検討する。

(3) 低酸素ニッチに関する解析

癌幹細胞ニッチが低酸素性であるか否かを、明らかにし、その代謝特性を解析する。新学術領域内の共同研究を重視し、九州大・中山らと癌幹細胞周期制御について研究を深化させ、慶應大佐谷らとは、癌細胞の代謝について共同する。さらに、これらの基礎的研究成果は、領域研究代表者九州大・赤司のリードするヒト癌幹細胞の臨床研究において応用展開する。

4. 研究成果

(1) 幹細胞の細胞周期に関する研究

造血幹細胞の多くは、細胞回転をせずに静止期にとどまっている。静止期の維持を担う主要な分子として、CDK 阻害タンパク質 p21、p27、p57 が知られている。正常の条件では p21

と p27 のどちらも造血幹細胞の静止期の維持および幹細胞性の維持には寄与していないことが知られていた。また、造血幹細胞における p57 の役割は未解明のままであった。本研究において、我々は、造血幹細胞において p57 と p27 を欠損したマウスを作製し解析したところ、対照となるマウスと比較して両方の遺伝子を欠損したマウスでは、造血幹細胞数の減少、静止期の割合の減少、造血幹細胞の幹細胞としての機能の低下、などが確認された。これらの結果より、CDK 阻害分子が造血幹細胞の静止期の維持および幹細胞性の維持に重要なタンパク質であることが明らかになった。また、新規 p57 結合タンパク Hsc70 が cyclin D タンパクの局在を制御することによって、造血幹細胞の細胞周期制御に重要な役割を果たしていることが示された。p57 と p27 は単独に一つでも存在すると静止期維持が機能できるが、両者の発現がともに抑制される場合、Hsc70/cyclin D 複合体が核内に排出され、幹細胞静止状態の維持ができなくなることが証明された。この研究により、造血幹細胞の静止期維持機構の一端が明らかになった。

(2) 低酸素性ニッチにある幹細胞の代謝学的研究

骨髄の血管は類洞構造をもち、血流は受動的であり、酸素飽和度は静脈血より低いと言われている。そこで我々は、低酸素性ニッチにある幹細胞の代謝学的特徴を解析した。

造血幹細胞の代謝

HIF-1 α conditional KO マウス、および HIF-1 α を分解する VHL 遺伝子の conditional KO マウスの造血幹細胞の解析により、解糖系代謝が亢進していることが明らかになった。さらにピルビン酸から TCA 回路に入る経路を触媒する pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) を制御することにより、幹細胞を *in vitro* で維持することが可能となった (*Cell Stem Cell*, 2013)。

ニッチ制御における活性酸素種 (ROS) の役割

造血幹細胞のニッチへの離脱に、酸化ストレスが関与することを明らかにした。抗がん剤投与などにより、ROS が上昇し、p38 MAPK が活性化し、N-cadherin が低下し、幹細胞はニッチから離れる過程を検証した。また、ATM, TERT 両遺伝子欠損マウスでは、テロメラーゼ活性とは別のメカニズムで、ROS 抑制作用が減少して幹細胞機能が酸化ストレスにより低下することを見出した (*Blood*, 2012)。癌幹細胞においても解糖系代謝が亢進し、さらに Redox 機能が高く、細胞内 ROS レベル

が低いことが明らかになりつつある。ROS の制御は、癌幹細胞の細胞周期を促し、腫瘍克服につながる可能性が示唆された。

(3) 造血器腫瘍に関する研究

多発性骨髄腫は、B 細胞由来腫瘍細胞が主として骨髄内で増殖する悪性腫瘍である。GFP で標識したヒト骨髄腫細胞を免疫不全マウスに静脈から投与し、その進展を解析した。移植後初期には、骨髄腫細胞は、肝臓、脾臓ではなく、骨のしかも metaphyseal region の骨芽細胞あるいは破骨細胞に近接して見られた。抗癌剤投与により、腫瘍細胞は劇的に減少したが、一部の VE-カドヘリン陽性腫瘍細胞が残存した。以上より、骨髄腫細胞も均質ではなく、VE-カドヘリン陽性細胞のような治療抵抗性をもつ亜集団が存在することが明らかになった。今後、癌幹細胞としての生存の優位性、骨細胞ニッチとの関係などを明らかにする必要がある。

慢性骨髄性白血病 (CML) は、造血幹細胞異常による骨髄増殖性疾患である。我々は、マウス造血幹細胞に bcr/abl を導入し、それらをマウスに移植して CML モデルを作成し、下記のように、腫瘍由来細胞がニッチとして作用していることを示した。

- i) CML 幹細胞は KSL 分画に存在し、その中でも CD25(IL-2R)陽性細胞が、Leukemia-initiating cell である。
 - ii) CD25 (IL-2R) KSL 陽性細胞はヒト CML 患者にも認められる。
 - iii) CD25(IL-2Ra)KSL 陽性細胞は、IL-6、IL-4 など TH2 サイトカインを多く発現しており、それらのサイトカインが血中で上昇している。
 - iv) CD25 (IL-2Ra) KSL 陽性細胞を抑制する抗体をマウスに投与したところ、CML の進展を抑制する。同様に CD25 欠失マウスにおいても、CML 進展の抑制をみた。
- 以上の結果より、CML は自律的増殖の他に、自らの産生するサイトカインにより、増殖が刺激されていることが明らかとなった。最近、IL-6 が正常幹細胞を細胞回転に入れ、幹細胞性を減弱させているという報告 (*Cancer Cell*, 2015) があり、これらサイトカインのシグナル軸は、治療標的になりうることを示された。

造血幹細胞における DNA 損傷の蓄積と白血病発症の関係

p53 結合タンパクである Aspl1 の機能を欠失した造血幹細胞は、apoptosis が抑制され、静止期幹細胞が増加し、その機能 (骨髄再建能) の上昇がみられた。幹細胞関連遺伝子である

Evi-1, Gata2 などの発現上昇を認めた。しかしながら、放射線照射後の幹細胞における DNA 損傷 Foci の数は、対照マウスに比し、有意に多く残存する傾向がみられた。Asp1 遺伝子単独欠失マウスにおいては、白血病の発症は見られなかったが、p53 欠失マウスと掛け合わせるにより、T 細胞型腫瘍の有意の増加を認め、これを Cell Stem Cell 誌に発表することができた (Cell Stem Cell, 2015)。今後、Apoptosis 抑制によって造血幹細胞における質的变化、DNA 損傷の蓄積と白血病発症の関係を解析する優れた実験モデルが構築できたと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計32件)

- 1) Yamashita M (他2名, 3番目 Suda T): Asp1 coordinates with p53 to maintain integrity of hematopoietic stem cell pool and prevent malignant transformation. *Cell Stem Cell*, in press
- 2) Sakamoto H (他7名, 5番目 Suda T): Determining c-Myb protein levels can isolate functional hematopoietic stem cell subtypes. *Stem Cells* 33: 479-490, 2015 (doi: 10.1002/stem.1855.)[査読有](#)
- 3) Nakamura-Ishizu A (他3名, 4番目 Suda T): Megakaryocytes are essential for HSC quiescence through the production of thrombopoietin. *Biochem Biophys Res Commun* 454: 353-357, 2014 (doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.095)[査読有](#)
- 4) Okabe K (他10名, 9番目 Suda T): Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina. *Cell* 159: 584-596, 2014 (doi: 10.1016/j.cell.2014.09.025.)[査読有](#)
- 5) Kobayashi I (他6名, 6番目 Suda T): Jam1a-Jam2a interactions regulate haematopoietic stem cell fate through Notch signalling. *Nature* 512: 319-323, 2014 (doi: 10.1038/nature13623.)[査読有](#)
- 6) Kobayashi CI (他10名, 11番目 Suda T): The IL-2/CD25 axis maintains distinct subsets of chronic myeloid leukemia-initiating cells. *Blood* 123: 2540-2549, 2014 (doi: 10.1182/blood-2013-07-517847.)[査読有](#)
- 7) Tai-Nagara I (他3名, 4番目 Suda T): Mortalin and DJ-1 coordinately regulate hematopoietic stem cell function through the control of oxidative stress. *Blood* 123: 41-50, 2014 (doi: 10.1182/blood-2013-06-508333.)[査読有](#)
- 8) Ema H (他2名, 3番目 Suda T): Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 42: 74-82, 2014 (doi: 10.1016/j.exphem.2013.11.004.)[査読有](#)
- 9) Yamashita M (他6名, 3番目 Nagamatsu G 7番目 Suda T): Nucleostemin is indispensable for the maintenance and genetic stability of hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 441:196-201, 2013 (doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.032.)[査読有](#)
- 10) Ikushima YM (他7名, 8番目 Suda T): Enhanced Angpt1/Tie2 signaling affects the differentiation and long-term repopulation ability of hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 430: 20-25, 2013 (doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.002.)[査読有](#)
- 11) Takubo K (他12名, 2番目 Nagamatsu G, 13番目 Suda T): Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 12: 49-61, 2013 (doi: 10.1016/j.stem.2012.10.011.)[査読有](#)
- 12) Ikushima YM (他7名, 5番目 Takubo K, 8番目 Suda T): Prostaglandin E(2) regulates murine hematopoietic stem/progenitor cells directly via ER4 receptor and indirectly through mesenchymal progenitor cells. *Blood* 121: 1995-2007, 2013 (doi: 10.1182/blood-2012-06-437889.)[査読有](#)
- 13) Toyama H (他4名, 5番目 Suda T): N-cadherin+HSCs in fetal liver exhibit higher long-term bone marrow reconstitution activity than N-cadherin-HSCs. *Biochem Biophys Res Commun* 428: 354-359, 2012 (doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.058.)[査読有](#)
- 14) Ito K (他10名, 9番目 Suda T): A PML-PPAR- δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Med* 18: 1350-1358, 2012 (doi:10.1038/nm.2882)[査読有](#)
- 15) Sugimura R (他10名, 10番目 Suda T): Non-canonical Wnt Signaling Maintains Hematopoietic Stem Cell through Flamingo and Frizzled8 in the Niche. *Cell* 150: 351-365, 2012 (doi: 10.1016/j.cell.2012.05.041.)[査読有](#)
- 16) Nakamura-Ishizu A (他8名, 8番目 Suda T): Extracellular matrix protein Tenascin-C is required in the bone marrow microenvironment primed for hematopoietic regeneration. *Blood* 119: 5429-5437, 2012 (doi: 10.1182/blood-2011-11-393645.)[査読有](#)
- 17) Iriuchishima H (他11名, 2番目 Takubo K, 12番目 Suda T): Neovascular niche for human myeloma cells in immunodeficient mouse bone. *PLoS One* 7: e30557, 2012 (doi: 10.1371/journal.pone.0030557.)[査読有](#)
- 18) Miyamoto K (他19名, 19番目 Suda T): Osteoclasts are dispensable for haematopoietic stem cell maintenance and mobilization. *J Exp*

Med 208: 2175-2181, 2011
(doi: 10.1084/jem.20101890.)査読有

19) Zou P (他 9 名、10 番目 Suda T) : p57^{Kip2} and p27^{Kip1} cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interaction with Hsc70. *Cell Stem Cell* 9: 247-261, 2011
(doi: 10.1016/j.stem.2011.07.003.)査読有

20) Okuno Y (他 4 名、4 番目 Suda T) : Bone marrow-derived cells serve as pro-angiogenic macrophages but not endothelial cells in wound healing. *Blood* 117: 5264-5272, 2011
(doi: 10.1182/blood-2011-01-330720.)査読有

21) Kubota Y (他 15 名、2 番目 Takubo K、16 番目 Suda T) : Isolation and function of mouse tissue resident vascular precursors marked by myelin protein zero. *J Exp Med* 208: 949-960, 2011 (doi: 10.1084/jem.20102187.)査読有

22) Nitta E (他 7 名、5 番目 Takubo K、8 番目 Suda T) : Telomerase reverse transcriptase protects ATM-deficient hematopoietic stem cells from ROS-induced apoptosis through a telomere independent mechanism. *Blood* 117: 4169-4180, 2011
(doi: 10.1182/blood-2010-08-297390.)査読有

23) Iriuchishima H (他 6 名、2 番目 Takubo K、7 番目 Suda T) : Ex vivo maintenance of hematopoietic stem cells by quiescence induction through Fbxw7 α overexpression. *Blood* 117: 2373-2377, 2011
(doi: 10.1182/blood-2010-07-294801.)査読有

24) Takubo K (他 10 名、11 番目 Suda T) : Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 7: 391-402, 2010
(doi: 10.1016/j.stem.2010.06.020.)査読有

25) Nakamura Y (他 8 名、9 番目 Suda T) : Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. *Blood* 116: 1422-1432, 2010
(doi: 10.1182/blood-2009-08-239194.)査読有

[学会発表] (計 4 4 件)

1) Suda T: Pathways regulating stem cell homeostasis. Gordon Research Conferences- Stem Cells & Cancer, February 15-20, 2015, Ventura (USA)

2) Suda T: Hematopoietic stem cell niche: Hypoxia and ROS. Cell Symposia- Stem Cell Energetics, December 9-11, 2014, Berkeley (USA)

3) Suda T: Hematopoiesis under the stress. DiSCUSS- Cancer Stem Cells Symposium, October 15-17, 2014, Hannover (Germany)

4) Suda T: Metabolic control of

hematopoietic stem cell function. EMBO Conference-Stem Cells in Cancer and Regenerative Medicine-, October 9-12, 2014, Heidelberg (Germany)

5) Suda T: Hematopoietic stem cells and niche cells under the stress. ISEH 43rd Annual Scientific Meeting, August 21-24, 2014, Montréal (Canada)

6) Suda T: Niche regulation for hematopoietic stem cells. Plenary Lecture, The 18th International Vascular Biology Meeting, April 14, 2014, Kyoto (Japan)

7) Suda T: Hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. Keystone Symposia conference 2014: Sensing and Signaling of Hypoxia: Interfaces with Biology and Medicine, Jan 7-13, 2014, Breckenridge (USA)

8) Suda T: Stem cells & diseases.V. Else Kröner -Fresenius Symposium on Adult Stem Cells in Aging, Diseases, and Cancer, May 24-26, 2013, Eisenach (Germany)

9) Suda T: A metabolic guide to stem cell homeostasis. Keystone Symposia: Hematopoiesis, Jan 14-19, 2013, Steamboat Springs (USA)

10) Suda T: Metabolic regulation of hematopoietic stem cells during stress. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Dec 8-11, 2012, Atlanta (USA)

11) Suda T: Hematopoietic stem cells in hypoxic niches. The 2012 Einstein Stem Cell Institute Symposium, Sep 14, 2012, NY (USA)

12) Suda T: Glycolytic metabolism in hematopoietic stem cells. ISSCR 10th Annual Meeting, June 13-16, 2012, Yokohama (Japan)

13) Suda T: Hematopoietic stem cell metabolism. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, The life of a Stem Cell: From Birth to Death, Mar 11-16, 2012 Olympic Valley (USA)

14) Suda T: Regulation of quiescent hematopoietic stem cells. ISEH 40th Annual Scientific Meeting, Aug 25-28, 2011, Vancouver (Canada)

15) Suda T: Glycolytic metabolism of hematopoietic stem cells. The 2nd Else

Kroner-Fresenius Symposium on Molecular Mechanisms of Adult Stem Cell Aging, May 20-22, 2011, Gunzburg (Germany)

16) Suda T: Normal haematopoietic stem cells and the stem cell niche. The 11th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes, May 18-21, 2011, Edinburgh (UK)

17) Suda T and Takubo K: Quiescence of stem cells in the hypoxic niche. Gordon Research Conferences on Stem Cells & Cancer, Feb 20-25, 2011, Ventura (USA)

18) Suda T and Naganatsu G: In vitro acquisition of pluripotency in primordial germ cells. The 3rd Waddensymposium, Stem Cell Renewal, June 27-30, 2010, Texel (Netherlands)

19) Suda T and Takubo K: Hematopoietic stem cells in hypoxic niche. The 18th Wilsede Meeting, Modern Trends in Human Leukemia and Cancer, June 19-23, 2010, Luenenburg (Germany)

20) Suda T: Hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. EMBL Conference Stem Cells, Tissue Homeostasis and Cancer, May 12-15, 2010, Heidelberg (Germany)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称：抗がん剤の効果増強剤
発明者：齊藤秀 他5名
権利者：(公開中)
種類：特許
番号：特開 2013-249298
出願年月日：2012年6月4日
国内外の別：国内

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須田 年生 (SUDA TOSHIO)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：60118453

(2) 研究分担者

田久保 圭誉 (TAKUBO KEIYO)
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号：50502788

永松 剛 (NAGAMATSU GO)
九州大学・医学(系)研究科(研究院)・
助教
研究者番号：70453545

生島 芳子 (IKUSHIMA YOSHIKO)
独立行政法人国際医療研究センター・その
他部局等・上級研究員
研究者番号：00571366