

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：22130007

研究課題名（和文）人工癌幹細胞を用いた治療抵抗性克服戦略の開発

研究課題名（英文）Development of strategies to overcome therapeutic resistance by using induced cancer stem cells (iCSCs)

研究代表者

佐谷 秀行 (Saya, Hideyuki)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：80264282

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）：申請者は、人工癌幹細胞（induced cancer stem cells: iCSC）技術を基盤にし、癌幹細胞の体内での挙動の解析、癌幹細胞と非癌幹細胞との相互作用の解析を行い、それらを制御・構成する分子の同定と阻害化合物の探索を行い、最終的に癌幹細胞の治療抵抗性を克服する戦略をデザインすることを目的として研究を行った。その結果、骨肉腫において腫瘍形成能を決定づける因子としてImp3を同定し、治療によって癌幹細胞が抵抗性を発揮する際、IGFシグナルが重要であること、更に癌幹細胞におけるCD44vの発現は、活性酸素の蓄積を抑制し、腫瘍の増大と治療抵抗性を促進することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We previously developed induced cancer stem cells (iCSCs). Based on this technology, we characterized the dynamics of CSCs and analyzed their interaction with non-CSCs. Specific aim of our project was to identify the molecules regulating the functions of CSCs and compounds targeting those molecules, leading to the development of the strategies to overcome therapeutic resistance of CSCs. We have identified: i) Imp3 as a master regulator for tumorigenesis of osteosarcoma CSCs, ii) the IGF signals which promote therapeutic resistance of CSCs and iii) CD44v as a functional molecule to reduce reactive oxygen species and to promote tumor growth and therapeutic resistance.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：発がん がん微小環境 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞画分は、極めて少数の細胞集団であり、特に生体内における周囲環境との相互作用の分子メカニズムやその意義について明らかにすることは非常に困難である。また、階層性に乏しい培養癌細胞株を用いた従来の研究手法では、様々な分化段階の非癌幹細胞との相互作用について解析するには十分ではない。私達は、これらの問題点を考慮に入れ、ヒトに発生する癌に構造的、性質的に類似した腫瘍を形成・維持する起源となる細胞を、マウス正常細胞から作製することを目指した。その結果、正常細胞に必要な最小限の遺伝子操作を加えることで、過形成や遺伝子不安定化という時期をほとんど経ることなく、永続的な自己複製能と分化能を有し、それを免疫系が正常である同系マウスに移植することで、短期間でほぼ同時期に悪性腫瘍を作ることのできる誘導性癌幹細胞 (induced cancer stem cell: iCSC) を様々な細胞種を用いて作製することに成功した。iCSC から発生した腫瘍はヒト癌組織と同様に、階層構造に基づく不均一な細胞によって構成され、癌幹細胞の分化や可塑性のメカニズム、さらには非癌幹細胞との生体内における相互関係について明らかにするための絶好のモデルであると考えた。

2. 研究の目的

iCSC 技術を基盤にして、癌幹細胞の体内での挙動と特性、癌幹細胞と非癌幹細胞との相互作用の解析を行い、腫瘍形成性・治療抵抗性・再発能・転移能を制御・構成する分子の同定と阻害化合物の探索を行い、最終的に癌幹細胞の治療抵抗性を克服する戦略をデザインすることを目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍形成能を決定づける分子の同定

骨肉腫 iCSC を同系マウスに移植することにより悪性の骨肉腫が 100% の確率で成立するが (Shimizu et al., *Oncogene* 2010; Shimizu et al., *Mol Cancer Res* 2012)、その腫瘍組織から単離した細胞 (AXT 細胞と呼ぶ) は腫瘍形成能がオリジナルの iCSC (AX 細胞と呼ぶ) より遥かに高く、その能力は細胞の足場非依存性増殖能と相関することが分かった。そこで *in vivo* における腫瘍形成能、および足場非依存性増殖能を規定している分子の同定を試みた。遺伝子発現解析によって候補分子を絞り込み、それらを導入した AX 細胞とノックダウンした AXT 細胞を用いて評価を行った。

(2) 治療ストレスによる癌幹細胞の変化

骨肉腫 iCSC およびグリオーマ iCSC をそれぞれ抗がん剤処理、放射線処理し、それら治療ストレスに耐性を持つようになった iCSC において活性化している分子あるいはシグナルを探索した。見出した分子あるいはシグナルを処理前の細胞で活性化させた場合、治療耐性が生じるか否かについて確認を行った。

(3) CD44v-xCT 相互作用によるがん幹細胞の酸化ストレス回避機構

Wnt1 とプロスタグランジン E2 を同時に胃上皮粘膜で活性化させることによって胃癌を 100% 形成する遺伝子改変マウスの癌組織から CD44 のバリエーションアイソフォーム (CD44v) が、発現している細胞を単離し解析を行ったところ、酸化ストレスに対する耐性の高い細胞群であることが明らかになった。そのメカニズムについて解析を行った。そして、その所見に基づいて非臨床試験及び臨床試験のデザインを行った。

4. 研究成果

(1) 腫瘍形成能を決定づける分子の同定

AX 細胞に比べて AXT 細胞において有意に高く発現している 20 の遺伝子の中で、腫瘍形成能に機能的に関与している遺伝子を 7 つのクライテリアを設定して選択したところ、2 つの遺伝子はそのクライテリアに合致した。そのひとつである *IGF2BP3/Imp3* (以下 *Imp3* と呼ぶ) は iCSC 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マウスにおける腫瘍化を防ぐことができることが分かった。更に、AX 細胞に *Imp3* を強制発現することで、AXT 細胞と同様の腫瘍形成能をもつ細胞を作成することができた (Ueki et al., *PLoS One* 2012)。また *Imp3* は RNA 結合たんぱく質であり、その標的 mRNA を同定したところ、クロマチン制御分子と細胞骨格制御分子が多く結合していることが分かり、*in vivo* における腫瘍形成能を細胞内の多くの分子とシグナルを一斉にコントロールする分子である可能性がある。

(2) 治療ストレスによる癌幹細胞の変化

脳腫瘍 iCSC をもちいた解析
脳腫瘍腫瘍幹細胞集団 (TS) を単離し、これをモデル細胞として利用した。この TS に X 線照射を合計 60Gy (5Gy × 12) 施行し、残存する細胞集団 (TS-RR) を獲得した。この二つの細胞の特徴を比較検討して、抵抗性に関わる分子メカニズムを解析した。TS-RR は TS に比べ

て、in vitro と in vivo とともに強い放射線抵抗性を示した。また、TS-RR は腫瘍幹細胞の特徴を増強していた。TS では放射線照射が繰り返される間に IGF1 分泌増加に伴う IGF1 シグナル経路の活性化が誘導された。その結果、最終的にシグナルの抑制的变化と FoxO3a 活性化が引き起こされ、幹細胞特性が増強し、放射線障害を軽減していることが判明した。この所見に基づき、放射線照射に IGF1R 阻害剤投与を加えたところ、TS-RR の抵抗性が減弱でき、治療効果を上げることが確認できた。(Osuka et al., *Stem Cells* 2013)

骨肉腫 iCSC を用いた解析

iCSC から骨肉腫を形成したマウスに化学療法を行った結果、腫瘍内で IGF2 の上昇が認められた。そこで、骨肉腫細胞に対する IGF2 の影響を調べたところ、血清の非存在下での IGF2 処理は抗がん剤に対する耐性と休眠状態をもたらすことが分かった。更に、長期的な IGF2 刺激は、受容体下流シグナルの減弱を引き起こし、休止状態を誘導し、オートファジー機構の亢進と細胞外グルタミンの濃度を高め、細胞の生存に有利に働くことがわかった。更にオートファジー機構の阻害とグルタミンの枯渇は、in vivo において化学療法感受性を増加させた。この結果は、IGF またはインスリンを発端とするシグナルが治療後の残存疾患を引き起こす重要なシグナルであることが分かった(Shimizu et al., *Cancer Res* 2014)

(3) CD44^v-xCT 相互作用によるがん幹細胞の酸化ストレス回避機構

CD44^v が細胞膜においてシスチンのトランスポーターである xCT と結合し、グルタチオンの生成を促進することでがん細胞の活性酸素種の蓄積を抑制し酸化ストレスへの抵抗性を高めていることを見出した(Ishimoto et al., *Cancer Cell* 2011; Yoshikawa et al., *Cancer Res* 2013)。更に、転移性マウス乳がんモデルを用いて解析を行ったところ、CD44^v を発現する細胞は原発巣から有意に肺に転移する能力を持ち、それはやはりグルタチオンの合成能に依存することが分かった(Yae et al., *Nat Commun* 2012)。これらの結果から、CD44 や xCT による酸化ストレス制御機構が、癌幹細胞の治療抵抗性や転移機構に重要であることが明らかになった。

本研究成果に基づいて進行性胃癌に対する xCT 阻害剤の第一相臨床試験を行い(この臨床試験の経費は「厚生労働省早期・探索的臨床試験拠点整備事業」によるため、本研究の成果には含めなかった)本研究課題において掲げた「癌幹細胞に対する治療戦略を立案する」という最大の目的を達成できたことにな

る。更にその臨床研究では 11 例中 4 例において POC (proof of concept) を取得できたことから、次相の臨床試験に駒を進めることとなった。実際に、H26 年度より「文部科学省橋渡し研究加速ネットワークプログラムシーズン C」として九州大学拠点において、従来の抗がん剤との併用療法の医師主導治験を実施することとなった。以上のように、本研究で得られた基礎および前臨床研究の成果に基づいて臨床試験が進行している。

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 7 7 件)

1) Seishima R (他 12 名、12 番目 Saya H): Ink4a/Arf-dependent loss of parietal cells induced by oxidative stress promotes CD44-dependent gastric tumorigenesis. *Cancer Prev Res* 2015, in press

2) Shimizu T (他 19 名、20 番目 Saya H): IGF2 preserves osteosarcoma cell survival by creating an autophagic state of dormancy that protects cells against chemotherapeutic stress. *Cancer Res* 74: 6531-6541, 2014 (doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0914)査読有

3) Mikami S (他 5 名、4 番目 Saya H): Expression of TNF- α and CD44 is implicated in poor prognosis, cancer cell invasion, metastasis and resistance to the sunitinib treatment in clear cell renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 136: 1504-1514, 2015 (doi: 10.1002/ijc.29137)査読有

4) Saga I (他 11 名、11 番目 Saya H): Integrated analysis identifies different metabolic signatures for tumor-initiating cells in a murine glioblastoma model. *Neuro-Oncol* 6: 1048-1056, 2014 (doi: 10.1093/neuonc/nou096)査読有

5) Nobusue H (他 9 名、9 番目 Saya H): Regulation of MKL1 via actin cytoskeleton dynamics drives adipocyte differentiation. *Nat Commun* 5: 3368, 2014 (doi: 10.1038/ncomms4368)査読有

6) Mori T (他 16 名、15 番目 Saya H): TNF α promotes osteosarcoma progression by maintaining tumor cells in an undifferentiated state. *Oncogene* 33: 4236-4241, 2014 (doi: 10.1038/onc.2013.545)査読有

7) Oshima H (他 11 名、11 番目 Saya H): TNF- α /TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of Nox1 and Gna14 in tumor cells. *Oncogene* 33: 3820-3829, 2013 (doi: 10.1038/onc.2013.356) 査読有

8) Oikawa T (他 5 名、6 番目 Saya H): Acquired expression of NFATc1 downregulates E-cadherin and promotes cancer cell invasion. *Cancer Res* 73:5100-5109,2013(doi:10.1158/0008-5472.CAN

-13-0274)査読有

- 9) Kai K (他 12 名、12 番目 Saya H) : *Ink4a/Arf*^{-/-} and *HRAS(G12V)* transform mouse mammary cells into triple-negative breast cancer containing tumorigenic CD49f⁻ quiescent cells. *Oncogene* 33: 440-448, 2014 (doi: 10.1038/onc.2012.609)査読有
- 10) Yoshikawa M (他 15 名、15 番目 Saya H) : 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) 査読有
- 11) Osuka S (他 10 名、11 番目 Saya H) : IGF1 receptor signaling regulates adaptive radioprotection in glioma stem cells. *Stem Cells* 31: 627-640, 2013 (doi: 10.1002/stem.1328)査読有
- 12) Nagano O (他 2 名、3 番目 Saya H) : Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44 variant isoforms (Review article). *Oncogene* 32: 5191-5198, 2013 (doi: 10.1038/onc.2012.638)査読有
- 13) Tsugawa H (他 8 名、3 番目 Saya H) : 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.org/10.1016/j.chom.2012.10.014)査読有
- 14) Ueki A (他 13 名、14 番目 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)査読有
- 15) Tamada M (他 2 名、3 番目 Saya H) : Pyruvate kinase M2: multiple faces for conferring benefits on cancer cells (Review article). *Clin Cancer Res* 18: 5554-5561, 2012 (doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0859)査読有
- 16) Yae T (他 19 名、19 番目 Saya H) : Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. *Nat Commun* 3: 883, 2012 (doi:10.1038/ncomms1892)査読有
- 17) Mima K (他 11 名、11 番目 Saya H) : CD44s regulates the TGF- β -mediated mesenchymal phenotype and is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 72: 3414-3423, 2012 (doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0299)査読有
- 18) Chiyoda T (他 13 名、13 番目 Saya H) : LATS1/WARTS phosphorylates MYPT1 to counteract PLK1 and regulate mammalian mitotic progression. *J Cell Biol* 197: 625-641, 2012 (doi: 10.1083/jcb.201110110)査読有
- 19) Oikawa T (他 6 名、6 番目 Saya H) : Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell-cell fusion.

J Cell Biol 197: 553-568, 2012 (doi:10.1083/jcb.201111116)査読有

- 20) Tamada M (他 11 名、12 番目 Saya H) : Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells. *Cancer Res* 72: 1438-1448, 2012 査読有
- 21) Shimizu T (他 16 名、17 番目 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 査読有
- 22) Takahashi A (他 13 名、13 番目 Saya H) : DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C^{Cdh1} in senescent cells. *Mol Cell* 45: 123-131, 2012 (doi: 10.1016/j.molcel.2011.10.018)査読有
- 23) Ishimoto T (他 20 名、21 番目 Saya H) : CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc- and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell* 19: 387-400, 2011 (doi:10.1016/j.ccr.2011.01.038)査読有

[学会発表](計 7 3 件)

- 1) Saya H: Regulation of cell differentiation by actin dynamics and its application in cancer treatment. Aichi Cancer Center 50th Anniversary International Symposium "Cancer Drug Resistance: Mechanisms of Strategies for its Circumvention, 3/14/2015, Aichi Cancer Center, Nagoya(Japan)
- 2) 佐谷秀行: がん幹細胞を標的とした治療戦略の開発。特別企画 4 「全ゲノム解析・エピゲノム解析から胃癌の治療・診断へ」第 87 回日本胃癌学会総会、3/6/2015、リーガロイヤルホテル広島、広島
- 3) 佐谷秀行: 骨肉腫幹細胞の性状解析と分化制御による治療戦略の考案。特別講演 2。第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会、11/29/2014、岡山コンベンションセンター、岡山
- 4) Saya H: Redox regulation in cancer stem cells. JSH-JCA Joint Symposium "Metabolomics and therapeutic strategy in myeloid and other tumors" The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. 11/02/2014, Osaka International Convention Center, Osaka(Japan)
- 5) Saya H: Regulation of Cell Differentiation by Actin Dynamics and its Application in Cancer Treatment. JCA-AACR Joint Symposium "Deeper insights in cancer biology targeting cure", 73rd Annual Meeting of Japanese Cancer

Association, 09/26/2015, Pacific Yokohama, Yokohama(Japan)

6) 佐谷秀行: イメージングを用いたがん幹細胞の性状解析。レクチャー 5。第 11 回日本病理学会カンファレンス。08/02/2014、六甲山ホテル、神戸

7) 佐谷秀行: がん幹細胞を標的とした治療戦略。基調講演 1。第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会。06/25/2014、ホテルメトロポリタン仙台、仙台

8) 佐谷秀行: 脳腫瘍幹細胞の性状解析に基づく治療戦略の考案。特別講演。第 32 回日本脳腫瘍病理学会学術集会。05/24/2014、あわぎんホール、徳島

9) 佐谷秀行: 誘導型がん幹細胞 iCSC を用いたがん幹細胞の特性解析。教育講演 6、第 36 回造血細胞移植学会総会。03/08/2014、沖縄コンベンションセンター、沖縄

10) Saya H: Significance of CD44v expression in gastric cancer stem cells. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference, 12/18/2013, Tokyo Bay Maihama Hotel Club & Resorts, Chiba(Japan)

11) Saya H: CD44v-xCT axis is a therapeutic target for cancer stem cells. 3rd GDRI French Japanese Cancer Meeting, 11/23/2013, Toulouse (France)

12) Saya H: Cancer stem cell: characteristics and therapeutic implication. The 6th Gyeongnam Regional Cancer Center Symposium, "New Therapeutic Targets and Approaches to Fight Cancer", 11/08/2013, Gyeongnam Regional Cancer Center, Jinju(Korea)

13) 佐谷秀行: Therapeutic strategies for targeting cancer stem cells. 特別シンポジウム「がんの基礎研究から臨床開発へ」。第 72 回日本癌学会学術総会。10/03/2013、パシフィコ横浜、横浜

14) Saya H: Redox regulation of cancer cells by CD44v, a marker for cancer stem cell. International Session "New insights into cancer and metabolism", The 86th Annual Meeting of The Japanese Biochemical Society, 09/13/2013, Pacifico Yokohama, Yokohama(Japan)

15) Saya H: CD44 and gastric epithelial stem cells. 6th Annual Scientific Meeting, Singapore Gastric Cancer Consortium. 07/25/2013, NUHS Tower Block Auditorium, Singapore(Singapore)

16) Saya H: Novel therapeutic strategies for cancer stem cells. Plenary lecture, The 39th Annual Meeting of Korean Cancer Association,

06/14/2013, Lotte Hotel Seoul, Seoul(Korea)

17) Saya H: Roles of CD44 in cancer stem cells. Invited Speaker, Meet-the-Expert Session, The American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2013, 04/08/2013, Washington, DC(USA)

18) Saya H: Novel strategies for targeting cancer stem cells. Ninth AACR-Japanes Cancer Association Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research. 02/24/2013, Hyatt Regency Maui, Maui, Hawaii (USA)

19) Saya H: Role of CD44 in Cancer Stem Cells and Metastasis. The 43rd International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund "Cancer Heterogeneity: Impact on Carcinogenesis, Cancer Stem Cell, Microenvironment, Diagnosis and Treatment". 11/14/2012, Hotel Grand Palace, Tokyo(Japan)

20) Saya H: Characterization of brain tumor stem cells using induced cancer stem cell (iCSC) technology. Invited Lecture, Korean Neuro-Oncology Meeting. 9/22/2012, National Cancer Center, Gyeonggi-do (Korea)

21) 佐谷秀行: A novel therapeutic approach targeting the CD44 variant functions. シンポジウム S4 「Molecular targeting to cancer stem cell/cancer initiating cell」。第 71 回日本癌学会学術総会。9/19/2012、ホテルロイトン札幌、札幌

22) Saya H: Cancer stem cells: metabolism, metastasis and clinical approach. Cancer & Stem Cell Biology (CSCB) Seminar, 5/8/2012, Duke-NUS, Singapore(Singapore)

23) Saya H: Novel strategies for cancer stem cells. 8th OOTR Annual Conference, 4/20/2012, The Westin Miyako Hotel, Kyoto(Japan)

24) 佐谷秀行: がん幹細胞の治療抵抗性メカニズム。シンポジウム S5 「がん幹細胞研究の最前線」。第 70 回日本癌学会学術総会。10/3/2011、名古屋国際会議場、名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 3 件)

1) 出願番号: 2013-172401
出願日: 2013 年 8 月 22 日
公開番号: 2015-039544
公開日: 2015 年 3 月 2 日
出願人: 学校法人慶應義塾

発明者: Stéphane Fierro、栄長泰明、佐谷秀行、
永野修、清島亮
発明の名称: ダイヤモンドマイクロ電極による
生体内 pH 直接測定

2) 出願番号: 2012-080323

出願日: 2012 年 3 月 30 日

公開番号: 2013-208259

公開日: 2013 年 10 月 10 日

出願人: 学校法人慶應義塾

発明者: Stéphane Fierro、栄長泰明、佐谷秀行、
永野修

発明の名称: ダイヤモンド微小電極を用いた
還元型グルタチオンの測定装置

3) 出願番号: 2011-005311

出願日: 2011 年 1 月 13 日

公開番号: 2012-144498

公開日: 2012 年 8 月 2 日

出願人: 学校法人慶應義塾、学校法人近畿大
学、リンク・ジェノミクス(株)

発明者: 佐谷秀行、永野修、益子高、丹羽眞
一郎

発明の名称: 抗腫瘍剤

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐谷 秀行 (SAYA HIDEYUKI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 80264282

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし