

機関番号：84409

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20249065

研究課題名（和文）肉腫幹細胞の性状解析とウイルス工学を応用した幹細胞標的医薬の開発

研究課題名（英文）Characterization of sarcoma stem cells and development of the stem cell-targeting agents utilizing viral engineering

研究代表者

高橋 克仁（TAKAHASHI KATSUHITO）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター（研究所）・研究所・部長

研究者番号：40211338

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、肉腫の幹（起源）細胞分画を濃縮し、腫瘍溶解性ウイルスの細胞標的化技術を用いて幹（起源）細胞標的医薬の開発することにある。造腫瘍性の亢進した骨肉腫細胞のサブラインを分離し、造腫瘍性を親株と比較検証した。肉腫の一種である消化管間質腫瘍の幹（起源）細胞が、CD133(Low/-)分画の腫瘍内低酸素領域に静止状態で存在し、イマチニブに不応答性である可能性を示した。ヒト肉腫型中皮腫細胞の幹（起源）細胞が、CD133(Low/-)、CD44(+)の細胞分画に多く含まれることを明らかにした。研究代表者らが開発した腫瘍内低酸素微小環境を標的化し得るHSV-1腫瘍溶解性ウイルスd120DDΔRRがこれらの肉腫、中皮腫幹（起源）細胞に対して腫瘍溶解作用をもつことを確認した。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to concentrate the stem (tumor-initiating) cell fraction of sarcoma, and then to develop stem cell-targeted agent, utilizing cell-targeting technologies with oncolytic virus. Several lines of highly tumorigenic osateosarcoma were isolated. Tumor-initiating cells from gastrointestinal stromal tumor, sarcoma-like tumor, were concentrated into the cellular fraction characterized with the cell surface marker CD133(Low/-) in vitro. Those cells were shown to be silenced in the hypoxic region of tumor, and resistant to Imatinib treatment. Tumor-initiating cells from sarcomatous mesothelioma were concentrated into the cellular fraction with CD133(Low/-) and CD44(+). We showed that our HSV-1 oncolytic virus d120DDΔRR targeting hypoxic microenvironment of tumor successfully destroyed tumor-initiating cells from stromal tumor and mesothelioma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	25,300,000	7,590,000	32,890,000
2009年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2010年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
総計	38,300,000	11,490,000	49,790,000

研究分野：分子医学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：肉腫、幹細胞、腫瘍溶解性ウイルス

1. 研究開始当初の背景

| 肉腫など中胚葉起源の悪性腫瘍の多くに共

通する特徴は、化学療法や放射線治療に対する抵抗性であり、再発・転移の経過も一部の症例を除いて極めて早い。がん全般において悪性度の指標とされるこれらの特徴は肉腫においては古くから認識されていたものの、どのような細胞特性または腫瘍局所の微小環境に基づくものであるのかは長く不明のままであった。

このような状況の中で、がんの幹細胞説が登場した。①自己再生能と、②元の腫瘍と同じ表現型の腫瘍を形成する能力、③アポトーシス抑制能、をもったごく一部の「がん」幹細胞 (Cancer stem-like cells; CSCs)、または腫瘍起源細胞 (Tumor initiating cells; TICs) が腫瘍を定着させているというものである。白血病については既に CSCs が特定されその特徴も明らかにされていたが、固形癌においても、最近、脳腫瘍 (グリオブラストーマ)、乳癌、前立腺癌、大腸癌、膵臓癌、肝細胞癌において相次いで CSCs の存在が報告された。これら CSCs は、上記の特徴をもつ他、抗がん剤や放射線に対する耐性をもつことも明らかにされつつある。さらに、CSCs の細胞表面マーカーとして CD133、CD44、 $\alpha 6$ インテグリン、 $\alpha 1$ インテグリンなどが同定された。特に CD133 は、脳腫瘍、前立腺癌、大腸癌、膵臓がんなどの CSCs に共通に発現しており、抗体を用いて細胞を同定し単離するための表面抗原になることが報告された。CD133 は、もともと骨髄の造血幹細胞のマーカーとして同定された 5 回膜貫通型蛋白質で、最近では血管系細胞の前駆細胞である血管芽細胞や骨髄芽球に CD34 とともに発現していること、さらに、臍帯血の CD133 陽性細胞が血管肉腫や横紋筋肉腫の発生源である血管内皮や横紋筋に分化し得ることも報告された。また、一部の肉腫患者の抹消血で CD133 mRNA 産生細胞が治療に伴って増減することも報告されている。

骨軟部組織に発生する中胚葉由来の悪性腫瘍である肉腫の起源細胞に関しては、従来より、骨、軟骨、筋肉、脂肪細胞等に分化する能力をもつ間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell, MSC) および神経細胞や平滑筋細胞等に分化する能力をもつ神経堤幹細胞 (Neural crest stem cell, NCSC) との関連が指摘されてきた。実際、今年に入って、ユウイング肉腫の細胞が融合遺伝子 EWS-FLI1 の発現を抑制することにより、MSC の性質を示すことが明らかにされ、その起源が MSC または間葉系前駆細胞にあることが報告された。また 9 月には、SSCs/SICs の存在が高悪性度の骨・軟部肉腫で報告されたが、表面抗原な

どの性状解析は全く不明である。CSCs が何らかの原因で分化を停止した組織幹細胞に由来するという仮説に立てば、SSCs/SICs は CD133 や Oct4 を発現する骨髄または組織由来の造血・血管系の幹細胞や前駆細胞、あるいは CD44 を発現する MSC とその表現型を共有している可能性も考えられる。

脳腫瘍や大腸癌では、小規模な CSCs 集団のみが、完全な腫瘍の再生能力や転移能を有するとみられることから、化学療法や放射線療法後の癌の再燃・転移は CSCs が残存した結果ではないかと推測されている。最初からこれらの治療に抵抗性の肉腫では、1) SSCs/SICs の性質をもつ細胞集団がもともと多いのか、2) SSCs/SICs が治療に抗して生存するのに好適な腫瘍内微小環境 (幹細胞ニッチ) があるのか、という 2 つの可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨・軟部肉腫の発生源と考えられている間葉系幹細胞の解析に実績をもつ研究グループとウイルス工学を応用した肉腫標的医薬の開発に実績をもつ研究グループが共同して、SSCs/SICs を同定し、その遺伝子発現プロファイルや低酸素応答性に関する性状解析を行うとともに、腫瘍溶解性ウイルスの細胞標的化技術 (研究代表者らの特許技術) を駆使して肉腫幹細胞標的医薬の開発を試みることにあり、これは国内外に類をみない全く独創的なアプローチである。本研究の成果は、わが国発の革新的な骨・軟部肉腫治療法の創出につながるものと思われる。

3. 4. 研究の方法および成果 肉腫幹細胞の樹立と性状解析

研究分担者戸口田の京都大学グループは、既に NOD/SCID マウス移植モデルを用いた方法で骨肉腫の 5 つの細胞株と滑膜肉腫の一部の細胞株について肉腫起源細胞 (SICs) のサブラインの分離に成功しているので、この方法を用いてさらなる SICs の分離を試みた。具体的には、マトリゲルと NOD/SCID マウスを用いた系で、in vivo での選別により分離した造腫瘍性の亢進した骨肉腫細胞のサブラインを分離し、造腫瘍性を親株と比較検証した。

研究代表者と研究分担者山村らの大阪府立成人病センターのグループは、肉腫の一種である消化管間質腫瘍と平滑筋肉腫培養細胞について、フローサイトメトリーにより

CD133、CD44 等のがん幹細胞マーカーに陽性で SP 分画に濃縮される細胞をソーティングし、マトリゲルと NOD/SCID マウス移植モデルを用いた方法で生着の条件を検討した。レーザーキャプチャーマイクロダイセクション顕微鏡 (Leica; LMD6000) を用いて、培養液中の単一の生細胞を分離・培養した。

FACS でヒト消化管間質腫瘍培養細胞の side population 分画を分離し、その中の CD133 (Low/-) が 80 個で NOD-SCID マウスに腫瘍を形成できることを確認した。また、ヒト手術標本と SCID マウス移植標本の免疫組織化学では、ともに、増殖細胞は血管周囲に分布する CD133 (+) に多く、低酸素の微小環境にある CD133 (Low/-) はその多くが静止状態にあった。実際、CD133 (+) 細胞を含む領域と CD133 (Low/-) 細胞の領域をレーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) 法で解析すると、CD133 (Low/-) 細胞の領域では CD133 (+) 細胞を多く含む領域に比べて、低酸素で発現誘導される遺伝子群がより多く発現していることを確認した。さらに、CD133 (Low/-) 細胞から形成されたスフェロイドの成長は、低酸素条件で可逆的に停止することを明らかにした。以上の結果より、消化管間質腫瘍の幹 (起源) 細胞は、CD133 (Low/-) 分画の腫瘍内低酸素領域に静止状態で存在し、イマチニブに不応答性である可能性が示唆された。

ヒト胸膜悪性中皮腫の切除標本から樹立した肉腫型中皮腫細胞を幹細胞マーカーである CD133 と CD44 の発現を指標にして FACS で分画した後、NOD-SCID マウスにおける造腫瘍性を比較し、CD133 (Low/-)、CD44 (+) の細胞分画に中皮腫起源細胞が多く含まれる可能性を明らかにした。

幹細胞標的医薬の開発

HSV-1 ウイルス増殖標的化の基盤技術 (平成 20 年 4 月 11 日特許が成立) を応用し、がん幹細胞などの低酸素状態にある細胞を特異的に傷害するためのウイルス (低酸素状態にある細胞でより多く遺伝子を発現するウイルスベクター) を開発した。ODD 配列をウイルスの増殖に必須のタンパク質と融合させ、融合タンパク質をコードする遺伝子を含むウイルスを作製した。このウイルスが正常酸素分圧にある細胞に感染した場合、転写因子は ODD 配列内のプロリン残基がプロリン水酸化酵素によって水酸化修飾を受ける結果ユビキチン・プロテアソーム系によって認識されるため分解されるが、酸素分圧の低い条件では分解されない。したがって、このウイルス変異体は正常酸素分圧にある細胞で

は増殖できず、低酸素状態にある増殖細胞に感染した場合にのみ特異的に増殖し、腫瘍細胞を溶解することができる。

HSV-1 の複製開始に必須の転写因子である ICP4 のアミノ末端に、HIF1 α の ODD 内のユビキチン・プロテアソーム認識部位である 564 番目のプロリン残基を含む 57 個のポリペプチドを付加した ODD 融合 ICP4 遺伝子 (4221bp) を構築した。さらに、その上流に CMV プロモーター (588bp) を、その下流に IRES (585bp) を介して *E. Coli* 由来の LacZ-polyA 配列 (3.3 kb) または EGFP-polyA 配列を連結した約 9 kb の DNA 断片を構築した。

最初に、上記 DNA 断片をヒト胃がん細胞株にトランスフェクションし EGFP を恒常的に発現する G418 耐性クローンを選別した。この胃がん細胞クローンをを用いて、正常酸素分圧 (O_2 20%) と低酸素分圧 (O_2 1%) の条件で、ICP4 蛋白の発現が酸素分圧によって変化するかどうかを蛍光顕微鏡を用いて検討し、低酸素条件においてのみ、EGFP と ICP4 がともに同一細胞内で発現することを確認した。さらに、正常酸素分圧 (O_2 20%) と低酸素分圧 (O_2 1%) の条件で、上記 DNA 断片と ICP4 を欠失する HSV-1 変異体 *d120* ウイルスのゲノム DNA を、胃がん細胞にコトランスフェクションし、低酸素分圧 (O_2 1%) の条件でのみウイルスプラークが形成されることを確認した。

ODD-ICP4 配列を含む相同組換えベクターを構築し、ICP4 欠失 HSV-1 変異体 *d120* ウイルスのゲノム DNA とともに、ICP4 導入 Vero 細胞にコトランスフェクションした。限界希釈法と培養上清の β ガラクトシダーゼ酵素活性の ELISA 測定により組換え体ウイルス *d12. ODD Δ RR* を単一プラークとして精製した。続いて、*d12. ODD Δ RR* が抗ウイルス薬である GCV に感受性を示すことを確認し、上記ヒト胃癌細胞を用いて、ICP4 蛋白が低酸素分圧 (O_2 1%) の条件でより多く発現することを確認した。

ヒト GIST 培養細胞をがん幹細胞の細胞表面マーカーである CD133 陽性と陰性の分画に分けたのちシャーレに培養し、精製した *d12. ODD Δ RR* を MOI 0.01-0.0001 で感染させウイルス複製分析を行った。*d12. ODD Δ RR* は、GIST の腫瘍起源細胞をより多く含む CD133 陽性 GIST 細胞でよりよく増殖し、強い細胞障害作用を示した。さらに、FACS で分離した CD133 (Low/-)/CD44 (+) 分画の培養中皮腫細胞に対して、腫瘍内低酸素微小環境を標的化し得る HSV-1 腫瘍溶解性ウイルス *d12ODD Δ RR* が腫瘍溶解作用をもつことを確認した。

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8件)

- ① 高橋克仁、がん遺伝子治療の可能性—標的遺伝子療法による平滑筋肉腫の治療、がん治療最前線、査読無、69, 25-27, 2010
- ② Katakura H, Toguchida J et al. Mediastinal synovial sarcoma. Aoyama T, Okamoto T, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, Ito K, Jin Y, Ueda M, Nagayama S, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J. Histone modifiers, YY1 and p300, regulate the expression of cartilage-specific gene, chondromodulin-I, in mesenchymal stem cells. J Biol Chem. 査読有 285, 29842-29850, 2010
- ③ Jin Y, Toguchida J et al. Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 391, 1471-1476, 2010. (11名/⑩)
- ④ Ito K, Toguchida J et al. A novel method to isolate mesenchymal stem cells from bone marrow in a closed system using a device made by non-woven fabric. Tissue Eng Part C Methods 査読有 16, 81-91, 2010. (18名/⑧)
- ⑤ 高橋克仁、山村倫子、腫瘍溶解性ウイルスによる次世代のがん遺伝子治療、クリニクマガジン、査読無、479, 24-25, 2009
- ⑥ 草間俊行、山村倫子、高橋克仁他、CYVADIC療法が奏功した肉腫型腹膜悪性中皮腫の1例 癌と化学療法、査読有、36, 475-478, 2009
- ⑦ Toguchida J, Nakayama T. Molecular genetics of sarcomas: Applications to diagnoses and therapy. Cancer Sci. 査読有 100: 1573-80, 2009. (2名/①)
- ⑧ Watanabe M, Toguchida J et al. Induction of autophagy in malignant rhabdoid tumor cells by the histone deacetylase inhibitor FK228 through AIF translocation. Int J Cancer 査読有 124: 55-67, 2008. (14名/⑬)

[学会発表] (計7件)

- ① 山村倫子、高橋克仁、ウイルス工学を応用したがん細胞標的医薬の前臨床試験；腫瘍内低酸素微小環境の標的化、日本薬学会総会第131年会、3月30日、2011年

、静岡

- ② 山村倫子、村井淳、玉越智樹、高橋克仁、ウイルス工学を応用したがん細胞標的医薬の開発；がん幹細胞の標的化、第67回日本癌学会学術総会、2009年10月1日、横浜
- ③ 山村倫子、玉越智樹、村井淳、高橋克仁、カルボニン標的化腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルスによる悪性中皮腫に対する新治療法の開発、第129回日本薬学会総会3月27日、2009年、京都
- ④ 山村倫子、高橋克仁、GIST stem cells 第66回日本癌学会学術総会、10月29日、2008年、横浜
- ⑤ 高橋克仁、山村倫子 ウイルス工学を応用した肉腫標的医薬の開発. 第41回日本整形外科学会 骨軟部腫瘍学術総会、シンポジウム3、浜松、7月18日、2008年 (招待講演)
- ⑥ Takahashi K, Tamakoshi T, Yamamura H Physiological role of calponin in smooth muscle regulation: A lesson from knockout mice. Experimental Biology 2008 Symposium on Calponin and Smooth Muscle Thin Filament. (San Diego, USA), April 5-9, 2008 (Invited lecture)
- ⑦ Takahashi K, Yamamura H, GIST stem cells. The 5th Biannual Kuningas Foundation GIST Symposium, Helsinki, January 18-19, 2008 (Invited lecture)

[図書] (計1件)

高橋克仁、山村倫子 未来の医療遺伝子治療とは、がんを治すチカラ (大阪府立成人病センター編) 142-143, 2009

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：低酸素状態にある細胞で増殖するウイルスまたは遺伝子を発現するウイルスベクター

発明者：高橋克仁、山村倫子

権利者：科学技術振興機構(JST)

種類：特許

番号：特願 2008-007179、PCT/JP2009/050299

出願年月日：2009年1月13日

国内外の別：国際

○取得状況 (計1件)

名称：細胞特異的発現複製ベクター

発明者：高橋克仁、山村倫子

権利者：科学技術振興機構(JST)

種類：特許

番号：第4107919号

取得年月日：2008年4月11日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.mc.pref.osaka.jp/omc2/pathophysiology.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 克仁 (TAKAHASHI KATSUHITO)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪
府立成人病センター (研究所)・研究所・
部長
研究者番号：40211338

(2) 研究分担者

戸口田 淳也 (TOGUUCHIDA JUNYA)
京都大学再生医科学研究所・教授
研究者番号：40273502

山村 倫子 (YAMAMURA HISAKO)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪
府立成人病センター (研究所)・研究所・
研究員
研究者番号：50342994