

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390346

研究課題名（和文）癌の臓器特異性を基盤としたヒト化マウスを用いた癌性幹細胞療法の開発

研究課題名（英文）Isolation and regulation of organ specific cancer stem cell

## 研究代表者

中村 雅史（NAKAMURA MASAFUMI）

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：30372741

## 研究成果の概要（和文）：

乳癌を対象に癌性幹細胞としての特徴である多分化能・抗癌剤体性能を持つ細胞分画を分離し、転移形成能をマウスへの移植で確認した。この幹細胞分画の維持・増殖に必須な因子として Hedgehog シグナルを同定し、同シグナルの制御により癌性幹細胞分画を制御可能であることを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

Cancer stem cell (CSC) population was isolated in breast cancer cells. The population was confirmed to have the ability as CSC, which consisted of pluripotency, multi-drug resistance and tumorigenesis. Hedgehog (Hh) signal was found to be essential for maintenance and growth of CSC population. These data suggested that Hh signal is a good target of anti-CSC therapy.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：実験外科学

## 1. 研究開始当初の背景

癌は不均一な細胞集団であるが、このような不均一性を作り出す源として“癌性幹細胞（Cancer Stem Cell：CSC）”という概念が提唱されている。これは癌細胞塊中に一部の多分化能を有する細胞群“CSC”が存在しており、様々な表現形の細胞を作り出す源になっているという概念である。CSCでは、正常幹細胞と同様に薬剤排出機構＝薬剤耐性遺

伝子が活性化しており、抗癌剤に対する抵抗性の源となっていることも想定されている。また、CSC分画のみが転移形成能を持つと考えられており、CSC集団としての指標ともなっている。すなわち、癌根治への鍵の一つは「CSC制御」が握っていることを示唆している。

## 2. 研究の目的

従来の抗癌剤に抵抗性を示す癌性幹細胞に対する治療法を開発する。

(1) 癌性幹細胞分画の維持・増殖に関するシグナル伝達を明らかにする。

(2) 明らかにされたシグナル伝達の制御法を探索する。

## 3. 研究の方法

(1) 癌性幹細胞分画の探索：

通常光レーザー及び紫外線レーザーによる細胞分離器を用いて癌細胞を分画する。分離された分画をマウスに移植し細胞の生着能力・多分化能と薬剤耐性を検証し、癌性幹細胞分画の探索を行う。

(2) 癌性幹細胞分画候補の関係探索：

同一癌腫における癌性幹細胞分画候補の関係をフローサイトメトリーにより分析し、両者の共通性質より癌性幹細胞の生立条件を探索する。

(3) 癌細胞分画の形態形成シグナル活性化状態探索：

癌細胞分画の形態形成シグナル活性化状態を、シグナル上の転写因子や標的遺伝子産物産生の活性化状態で検証する。

(4) 癌性幹細胞の制御法開発：

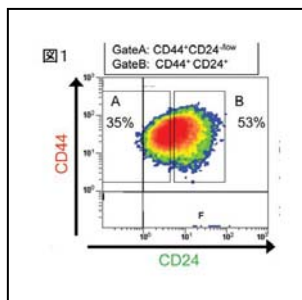
シグナル制御による癌細胞分画の維持・増殖抑制効果を検証する。

(5) 新規 Ptch1 親和性ペプチドによる癌性幹細胞制御：我々が考案した Hh シグナル経路の細胞表面レセプターである Ptch1 に対する機能抑制性親和性ペプチドによる癌性幹細胞制御の可能性を探索する。

## 4. 研究成果

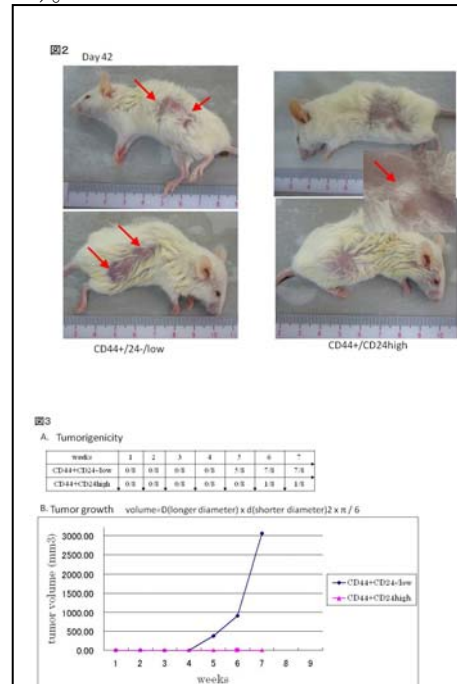
(1) 癌性幹細胞分画の探索：

乳癌細胞である MCF-7 細胞より通常光レーザー細胞分離器を用いて CD44+/CD24-/low 細胞を分離した。含有率は約 35%であった (図 1)。

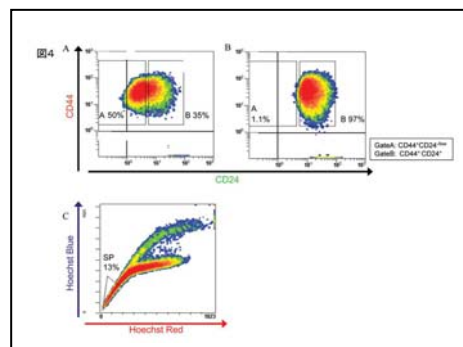


分離された CD44+/CD24-/low 細胞分画を対象となる分画とともにマウスに 8 か所移植し、生着率・成長率を調べた。細胞分画移植後 7 週間目の結果では CD44+/CD24-/low 細胞分画と対照分画 (CD44+/CD24-/high) の生着率は各々 7/8 (接種か所) vs 1/8 であり、CD44+/CD24-/low 細胞分画が高い生着率を示した (図 2、3 A)。また、各々の最大体積

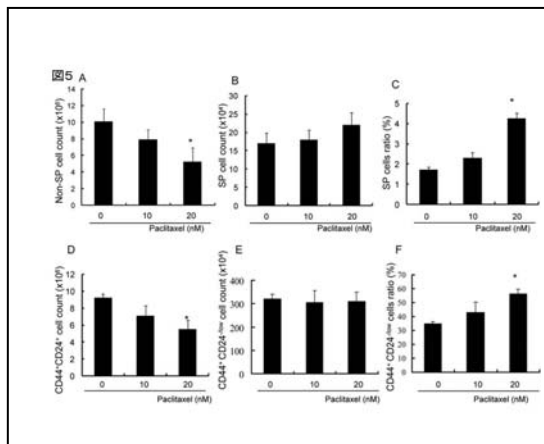
( $\text{volume} = D(\text{longer diameter}) \times d(\text{shorter diameter})^2 \times \pi / 6$ ) は約 3000mm<sup>3</sup> vs ほぼ計測不能大であり、CD44+/CD24-/low 細胞分画が腫瘍増大能力も高いことが示された (図 3 B)。



次に幹細胞候補分画の多分化能を検定した。細胞分離器で 95%の精度で分取された CD44+/CD24-/low 細胞を、10% FBS を含む RPMI 培地にて 72 時間培養したところ、35.1%が CD44+/CD24+ 細胞に、そして、50.0%は CD44+/CD24-/low 細胞に分化した (図 4 A)。それとは対照的に、CD44+/CD24+ 細胞は CD44+/CD24-/low 細胞への分化を示すことはなく、同じ性質を保持していた (図 4 B)。SP 細胞の分化能も調べられた。93%の精度で SP 細胞を分取した後に 72 時間培養されフローサイトメトリーで解析された。SP 細胞の中で、86.91%が非 SP 細胞に、13.09%が SP 細胞に分化した (図 4 C)。分取された非 SP 細胞は、ヘキスト 33342 の毒性のため、増殖することが困難であった。これらのデータは、CD44+/CD24-/low 細胞と SP 細胞が分化する能力を持つことを示した。



次に、癌性幹細胞分画としての抗癌剤体性を調べた。MCF-7 細胞を 10 nM および 20 nM のパクリタキセル添加後に 72 時間培養し、フローサイトメトリーで細胞数が計測された。非 SP 細胞数は、有意に減少したにもかかわらず、SP 細胞数は、パクリタキセル存在下でも減少しなかった (図 5 A, B)。その結果、総細胞数に対する SP 細胞の比率は著明に増加した (図 5 C)。CD44+/CD24-/low 細胞のパクリタキセル耐性能も検証された。パクリタキセル存在下で CD44+/CD24-/low 細胞数は、CD44+/CD24+細胞数とは対照的に減少せず (図 5 D, E)、結果として全細胞に対する CD44+/CD24-/low 細胞の割合の増加につながった (図 5 F)。これらの結果は、SP 細胞だけでなく、CD44+/CD24-/low 細胞もパクリタキセル耐性であることを示した。

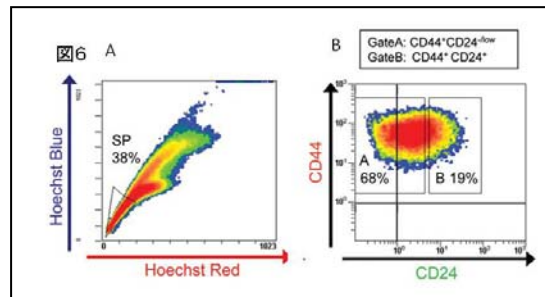


これらの結果より、我々が分離した CD44+/CD24-/low 細胞分画および SP 細胞分画が癌性幹細胞としての要件を満たすことが示された。

#### (2) 画癌性幹細胞分画候補の関係探索：

分取された CD44+/CD24-/low 細胞をヘキストで染色され、紫外線レーザーにより再び分析し別の癌性幹細胞分画候補とされている Side Population (SP) 分画との関係を検証した。MCF-7 より分離された CD44+/CD24-/low 細胞分画中には、約 38.28% の SP 細胞を認めた (図 6 A)。次に、MCF-7 細胞から SP 細胞が分取され、CD44+/CD24-/low 細胞数が調べられた。分取された SP 細胞は、抗 CD44 抗体 (FITC) と抗 CD24 抗体 (PE) と共に氷上で反応させ、アルゴンレーザーにより再び分析された。SP 細胞は、68% という高い割合の CD44+/CD24-/low 細胞を含んでいた一方で、MCF-7 細胞は 35% のみが、この特徴を保持していた (図 6 B)。これらのデータは、CD44+/CD24-/low 分画と SP 分画が一部分重複していることを示した。

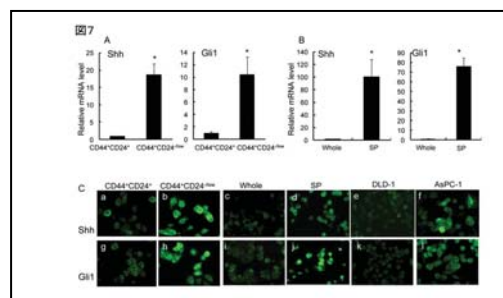
現在様々な癌性幹細胞分画法が提唱されているが、結果的に分離された分画は重複する可能性があると思われた。



#### (3) 癌細胞分画の形態形成シグナル活性化状態探索：

Hedgehog (Hh) 経路の標的遺伝子でありかつ転写因子でもあることより、Hh シグナルのよい活性化指標とされている Gli1 の発現をリアルタイム PCR で検証した。CD44+/CD24-/low 分画細胞は、他分画の細胞より高く Gli1 を発現していた (図 7 A)。SP 細胞においても、分取していない細胞と全く対照的に、Shh と Gli1 の高発現を示した (図 7 B)。Gli1 と Hh シグナルのリガンドである Shh の蛍光免疫染色における強度も同様に、CD44+/CD24-/low 分画で高く CD44+/CD24+細胞で低かった。Shh と Gli1 はまた、全細胞に比較し SP 細胞で高く発現しており (図 7 C)、リアルタイム RT-PCR の結果と一致した。

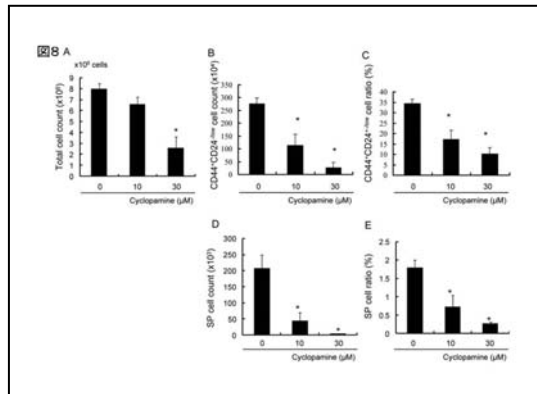
Hh シグナルが癌性幹細胞の維持・増殖に重要な役割を持つ可能性が示唆されたことにより、以下の項目で Hh シグナル制御による幹細胞制御の可能性を検討した。



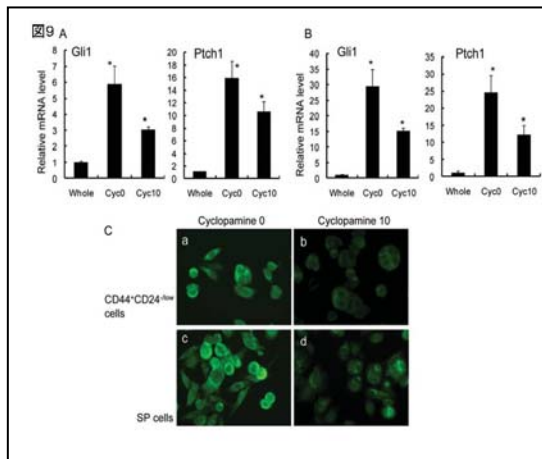
#### (4) 癌性幹細胞の制御法開発～Hh シグナル抑制による癌性幹細胞分画制御法の検討：

CD44+/CD24-/low 細胞と SP 細胞の増殖に関する Hh 経路の役割を調べるために、Hh シグナル伝達経路阻害剤であるシクロパミン存在下に培養された MCF7 の各分画をフローサイトメトリーで分析した。総細胞数はシクロパミンを用いて培養することにより減少したが、特に CD44+/CD24-/low 細胞の絶対数の減少傾向が著しく、総細胞に対する CD44+/CD24-/low 細胞の比率が減少した (図 8 A, B, C)。同様に、SP 細胞の絶対数と総細胞

に対する比率も、シクロパミン存在下で有意に低下した (図 8 D,E)。これらの結果は、CD44+/CD24-/low 細胞と SP 細胞の増殖が、乳癌細胞の全分画よりも、より強く Hh 経路に依存していることを示唆した。



シクロパミン存在下での Hh シグナル活性の抑制を確認するため、Hh 経路の標的遺伝子の発現強度がリアルタイム RT-PCR 法を用いて分析された。CD44+/CD24-/low 細胞、SP 細胞各分画における Gli1 と Ptch1 の発現強度は、シクロパミンとの共培養後に明らかに抑制された (図 9 A, B)。これらの所見は、蛍光免疫染色法によって更に確認された。CD44+/CD24-/low 細胞と SP 細胞両者が、シクロパミンと共培養後に、転写因子の一つであり Hh シグナル伝達経路の標的遺伝子の一つである Gli1 で染色された。Gli1 染色の強度は有意にシクロパミン投与で減少した (図 9 C)。



以上の結果より、Hh シグナル制御が癌性幹細胞制御に重要であることが判明した。

(5) 新規 Ptch1 親和性ペプチドによる癌性幹細胞制御：  
我々が同定している Patched1 蛋白親和性ペプチドと MCF7 を共培養し、乳癌幹細胞分画である CD44+/CD24-/low の変化を flowcytometry を用いて検討した。昨年の検

討で使用した 1 μg/ml ではペプチドの効果を確認できなかったため、今回は濃度増加による効果を確認した。結果、CD44+/CD24-/low と CD44+/CD24high 細胞分画の生着率は、1 コロニー当たり細胞数 2,000/20,000/200,000 個を接種したところ、生着コロニー/接種コロニーは各々 0/4, 8/8, 4/4

(CD44+/CD24-/low 細胞分画)、0/4, 1/8, 2/4 (CD44+/CD24+細胞分画)であり、我々の手法で分離した CD44+/CD24-/low 細胞分画が実際に癌幹細胞を高濃度に含んだ分画であることが証明された。次に、以前我々が抗 Hedgehog シグナル効果を持つことを示した新規 Patched1 親和性ペプチドを用いて、上記癌幹細胞分画の制御を試みた。Patched1 親和性を MCF7 細胞を共培養し flowcytometry で解析したところ、1 μg/ml には明らかな効果を確認できなかったが、10 μg/ml では CD44+/CD24-/low 分画の割合が減少した。ペプチド濃度依存性に CD44+/CD24-/low 細胞分画が減少することが確認された。以上より、Patched1 親和性ペプチドは、以前報告した MCF7 増殖抑制に加えて、MCF7 癌幹細胞分画の制御が可能であることが示された。以上より、新たな癌幹細胞制御法による難治癌克服のための創薬の方向性が示された。

結語：

本課題により、CD44+/CD24-/low 細胞分画と SP 細胞分画は、多分化能・転移形成・抗癌剤体性といった性質を保持しており、ともに重複していた乳癌における癌細胞性分画であることが示された。そして、この癌細胞分画の制御は、Hh シグナルの抑制により可能であることが明らかになった。

## 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 4 件)

1. Tanaka H, Nakamura M, Kameda C, Kubo M, Sato N, Kuroki S, et al. The Hedgehog signaling pathway plays an essential role in maintaining the CD44+CD24-/low subpopulation and the side population of breast cancer cells. *Anticancer Res* 2009; 29:2147-2157.
2. Kameda C, Tanaka H, Yamasaki A, Nakamura M, Koga K, Sato N, et al. The Hedgehog pathway is a possible therapeutic target for patients with estrogen receptor-negative breast cancer. *Anticancer Res* 2009; 29:871-879.
3. Kameda C, Nakamura M, Tanaka H, Yamasaki A, Kubo M, Tanaka M, et al. Oestrogen

receptor- $\alpha$  contributes to the regulation of the hedgehog signalling pathway in ER $\alpha$ -positive gastric cancer. Br J Cancer; 102:738-747.

4. Chikazawa N, Tanaka H, Tasaka T, Nakamura M, Tanaka M, Onishi H, et al. Inhibition of Wnt signaling pathway decreases chemotherapy-resistant side-population colon cancer cells. Anticancer Res; 30:2041-2048.

〔学会発表〕(計 17 件)

1 ; 田中晴生、中村雅史、他 ; 腫瘍幹細胞を標的として乳癌治療法の開発

第 2 1 回 日本バイオセラピー学会学術集会総会 2008/11/18 東京

2 ; 近沢 信人、中村 雅史、他 ; Wnt シグナルを標的とした薬剤抵抗性大腸癌治療法の可能性、第 2 1 回 日本バイオセラピー学会学術集会総会 2008/11/18 東京

3 ; 甲斐 昌也、中村 雅史、他 乳癌幹細胞に対する簡易抗癌剤感受性試験法の可能性

第 2 1 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 2008/11/18 東京

4 ; Tanaka H., Nakamura M., Novel Peptides Stabilizing Tumor-Suppressor Ptchd-1 Control the Growth of Hedgehog Pathway Dependent Cancers、Joint Meeting of the American Pancreatic Association & Japan Pancreas Society 2009 年 11 月 6 日 Oahu, USA

5 ; 甲斐昌也、中村雅史 他 乳がん組織における Hedgehog シグナル系活性化に及ぼす術前化学療法の影響 : 乳がん幹細胞療法開発への応用

第 2 2 回 日本バイオセラピー学会学術集会総会 2009 年 11 月 26 日 大阪

6 ; 田中晴生、中村雅史 他 Hedgehog (Hh) シグナル系を標的とした「乳癌幹細胞」制御療法の可能性

第 2 2 回 日本バイオセラピー学会学術集会総会 2009 年 11 月 26 日 大阪

7 ; 亀田千津、中村雅史 他 胃癌における Estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) の治療標的としての新たな可能性 : ER $\alpha$  シグナル経路と Hedgehog 経路とのクロストーク

第 2 2 回 日本バイオセラピー学会学術集会総会 2009 年 11 月 26 日 大阪

8 ; 田中晴生、中村雅史 他 Hedgehog (Hh) シグナル系を標的とした「乳癌幹細胞」制御療法の可能性

第 4 7 回 日本癌治療学会学術集会 2009 年 10 月 23 日 横浜

9 ; Tanaka H., Nakamura M., et al. Development of novel breast cancer stem cell therapy targeting hedgehog signaling

pathway  
11th International Conference 2009 年  
3 月 11 日 St.Gallen, Switzerland

1 0 ; 亀田千津、中村雅史 他、胃癌における Estrogen receptor  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) と Hedgehog 経路との新たな連関

第 1 1 0 回 日本外科学会定期学術集会  
2010 年 4 月 9 日 名古屋

1 1 ; 田中晴生、中村雅史、他、Hedgehog (Hh) シグナル系を標的とした「乳癌幹細胞制御療法」の可能性

第 1 1 0 回 日本外科学会定期学術集会  
2010 年 4 月 9 日 名古屋

1 2 ; 宗崎正恵、中村雅史、他、非浸潤性乳管癌の進展・発育における Hedgehog signal 系の関与 : 治療への展開の可能性

第 1 1 0 回 日本外科学会定期学術集会  
2010 年 4 月 9 日 名古屋

1 3 ; 近沢信人、中村雅史、他、Wnt シグナル阻害による大腸癌の抗癌剤耐性克服 : siRNA 療法の可能性

第 1 1 0 回 日本外科学会定期学術集会  
2010 年 4 月 9 日 名古屋

1 4 ; 甲斐昌也、中村雅史、他、癌組織における腫瘍関連分子発現の定量的解析の開発 : 乳癌幹細胞制御療法のための Hedgehog シグナル系解析例

第 1 1 0 回 日本外科学会定期学術集会  
2010 年 4 月 9 日 名古屋

1 5 ; 北浦良樹、中村雅史、他、効果的な膀胱癌治療法開発のための癌局所微小環境の解析

第 1 1 0 回 日本外科学会定期学術集会  
2010 年 4 月 9 日 名古屋

1 6 ; 田坂健彦、中村雅史、他、膀胱癌に対する新たな治療戦略 : Paclitaxel/ $\gamma$ -secretase 阻害剤併用療法の可能性と機序解析

第 1 1 0 回 日本外科学会定期学術集会  
2010 年 4 月 9 日 名古屋

1 7 ; 中村雅史 Hedgehog シグナル : 固形癌の臨床につながる TR

日本がん分子標的治療学会、第 7 回トランスレーショナルリサーチワークショップ  
2011 年 1 月 28 日 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 雅史 (NAKAMURA MASAFUMI)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号：30372741

### (2) 研究分担者

片野 光男 (KATANO MISTUO)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号：10145203

赤司 浩一 (AKASHI KOUICHI)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号：80380385

野村 政壽 (NOMURA MASATOSHI)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号：30315080

### (3) 連携研究者；なし ( )

研究者番号：