

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830084

研究課題名(和文)がん幹細胞の静止期維持機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of maintenance of quiescence in cancer stem cells

研究代表者

武石 昭一郎 (Takeishi, Shoichiro)

九州大学・生体防御医学研究所・特任助教

研究者番号：10647720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、がん研究において「がん幹細胞」という細胞が注目されている。「がん幹細胞」自体は非常に数が少なく、ほとんど増殖しないが、その子孫である「がん細胞」は急速に増殖し、最終的に生命を脅かす。従来開発されてきた抗がん剤や放射線療法は急速に増殖する細胞を殺すため、がん幹細胞にはほとんど効果がなく、治療後に残存したがん幹細胞が再発や転移を引き起こす。つまり、がんを完全に治療するためには、このがん幹細胞を撲滅する方法の開発が必要となる。本研究では、乳がん幹細胞の静止期維持機構の解明を目指し、乳がんマウスモデルの作製、ならびに静止期維持に関わっていると推測された分子を有していない乳がん細胞の樹立を行った。

研究成果の概要(英文)：In addition to the properties of self-renewal and multipotency, cancer stem cells share the characteristics of their distinct cell cycle status with somatic stem cells. Cancer stem cells (CSCs) are maintained in a quiescent state (G0 phase) with this characteristic conferring resistance to anticancer therapies that target dividing cells. Elucidation of the mechanisms of CSC quiescence might therefore be expected to provide further insight into CSC behaviors and lead to the elimination of cancer. In this project, with the aim of deciphering the mechanism of maintenance of quiescence in breast cancer stem cells, we generated mouse models of this cancer and several breast cancer cell lines deficient in putative G0 maintenance factor.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん幹細胞 細胞周期 静止期 タンパク質分解 ユビキチン Fbxw7

1. 研究開始当初の背景

近年、がん治療後の再発や転移の原因として、「がん幹細胞」が注目を集めている。これまでに少なくとも一部のがんにおいて、がん組織を構成している細胞にヒエラルキーが存在し、多くのがん細胞はこのヒエラルキーの根幹にある少数のがん幹細胞から生じることが報告されている。その後の研究により、このがん幹細胞は増殖期から脱出して静止期(G₀期)に留まっていることが明らかとなった。これまでのがん治療の戦略は、増殖期にあるがん細胞の細胞周期の進行を抑制することであったために、この従来の治療では静止期に維持されているがん幹細胞を撲滅することはできない。この残存したがん幹細胞から、原発巣において再びがん細胞が生じるのが「再発」であり、がん幹細胞が他の部位へ移動しがん細胞を生じるのが「転移」である。したがって、がん幹細胞の静止期維持メカニズムを解明し、その機構を打破する手法の創出はがんの根治につながると期待されるが、その分子機構は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

がんの中でも乳がんは近年、死亡率、罹患率ともに著しく増加しており、現在、女性で最も罹患率が高いがんである。生涯で罹患する確率は、日本では25-30人に1人であるが、欧米諸国ではさらに高く、8-10人に1人と言われている。最近になり、抗エストロゲン薬などの内分泌療法や、抗ヒト上皮成長因子受容体2抗体などの分子標的療法が行われるようになってきているが、依然として多くの症例において治療後の再発や転移がみられ、これらのメカニズムの解明が急務である。

この治療後の再発や転移の原因として、乳がんにおいても以前からがん幹細胞(乳がん幹細胞)の存在が想定されていたが、2003年になり、乳がん組織中の CD44⁺CD24⁻細胞が乳がん幹細胞として同定され [Al-Hajj et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2003)], 乳がん組織にもがん幹細胞を根幹としたヒエラルキーが存在することが明らかとなった。この乳がん幹細胞の生物学的特徴を研究することにより、新たな乳がん治療が可能になると期待されるが、その詳細な解析はこれまで行われていない。そこで、本研究では乳がん幹細胞の静止期維持機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 乳がんマウスモデルの確立

乳がん幹細胞の静止期維持機構を解明するため、まず乳がんマウスモデルの作製を試みた。具体的にはマウス由来、およびヒト由来の様々な乳がん細胞株をマウスの fat pad に移植し、乳がん発症の有無や、転移をきたすかどうかを検証した。

(2) 静止期維持因子を欠損した乳がん細胞の樹立

次に、CRISPR/Cas システムを用いて、静止期の維持に関わっていると推測された因子を欠損した乳がん細胞株の樹立を試みた。

4. 研究成果

(1) 乳がんマウスモデルの確立

現在、乳がんの研究に用いられている細胞株は複数存在するが、その中でもまず、ヒトの髄様がんに類似した乳がんを自然発症した B6 マウスから作製された E0771 細胞に着目した。フローサイトメトリーを用いて、前述の乳がん幹細胞マーカー (CD24、CD44) の発現を調べたところ、この細胞株は乳がん幹細胞分画を多く含んでいることが分かった (図 1)。

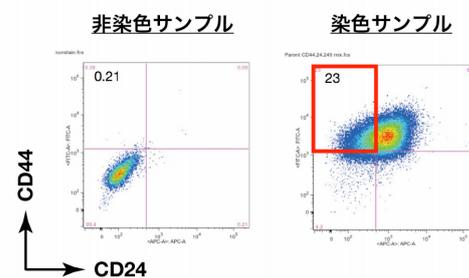


図 1 E0771 細胞における乳がん幹細胞マーカーの発現

E0771 細胞には乳がん幹細胞分画 (CD44⁺CD24⁻、赤枠) が多く含まれている。

そこで、蛍光色素 (tdTomato) を導入した E0771 細胞を B6 マウスの fat pad に移植し、この細胞から実際に乳がんが発症するかどうかを検証した。すると、移植した部位に tdTomato 陽性の腫瘍の形成が確認された (図 2 左)。しかし、乳がんの主な転移臓器の一つである骨では E0771 細胞は検出されなかった (図 2 右)。

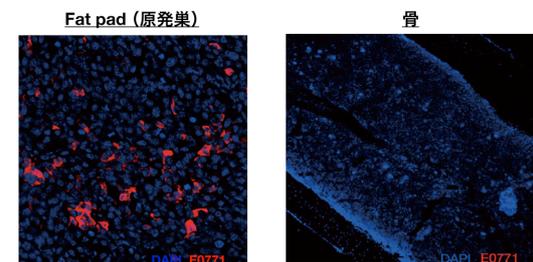


図 2 tdTomato⁺E0771 細胞を移植したマウスの原発巣ならびに骨の切片像

原発巣では tdTomato⁺細胞が認められたが、骨では検出されなかった。

次に、乳がんの転移モデルの作製を試みた。転移の際、がん細胞は上皮細胞の性質を喪失して間葉系細胞の機能を獲得する (上皮間葉転換、epithelial-mesenchymal transition; EMT) ことが知られている。そこで、様々な乳がん

細胞株において上皮細胞ならびに間葉系細胞のマーカー遺伝子の発現を調べたところ、ヒト乳がん由来の MDA-MB-231 細胞が EMT を起こしていることが明らかになった (図 3)。

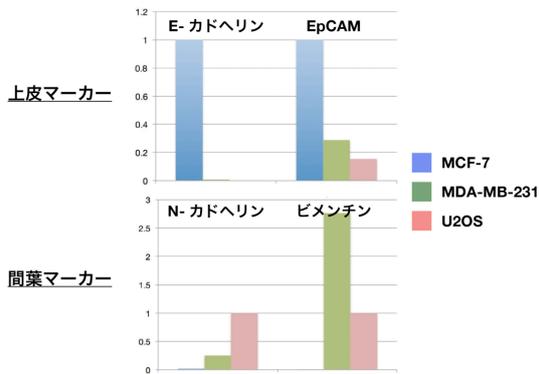


図 3 MDA-MB-231 細胞における上皮細胞ならびに間葉系細胞のマーカー遺伝子の発現 MDA-MB-231 細胞では、上皮マーカーである E-カドヘリン、EpCAM の発現がみられず、間葉マーカーである N-カドヘリン、ビメンチンが発現している。MCF-7 細胞 (乳がん由来) と U2OS 細胞 (骨肉腫由来) はそれぞれ上皮細胞、間葉系細胞のコントロールとして使用した。

この MDA-MB-231 細胞に蛍光色素 (mVenus) を導入し、免疫不全マウス (NOD-SCID マウス) の fat pad に異種移植したところ、移植部位に mVenus 陽性の腫瘍が形成された (図 4 左、中) のみならず、骨内膜領域に転移が認められた。

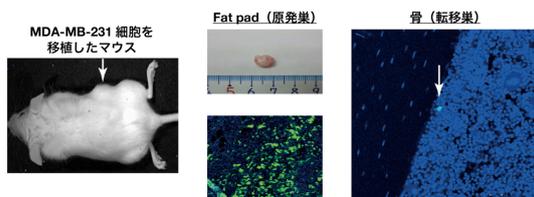


図 4 mVenus⁺MDA-MB-231 細胞を移植したマウスの原発巣ならびに転移巣の切片像 Fat pad および骨において、mVenus⁺細胞が検出された。

(2) 静止期維持因子を欠損した乳がん細胞の樹立

乳がん幹細胞の静止期維持因子の分子候補として、細胞周期のアクセル分子 c-Myc のユビキチンリガーゼである「Fbxw7」に着目した。この Fbxw7 は、われわれが白血病におけるがん幹細胞 (白血病幹細胞) の静止期維持因子として同定した分子である [Takeishi et al., *Cancer Cell* (2013); Takeishi & Nakayama, *Br. J. Cancer* (2014)]。白血病マウスモデルにおいて Fbxw7 を欠損させると、白血病幹細胞が静止期から細胞周期へと誘導され、抗がん剤に感受性を示すようになる (図 5)。

これまでのがん幹細胞研究により、各種組

織から作製した iPS 細胞が同じ性質を持つように、様々ながんにおけるがん幹細胞は、種や臓器の枠組みを超えた共通の細胞生物学的特性を数多く有することが明らかとなっている。そこで、Fbxw7 は乳がん幹細胞においても静止期維持因子として機能しているのではないかと考えた。

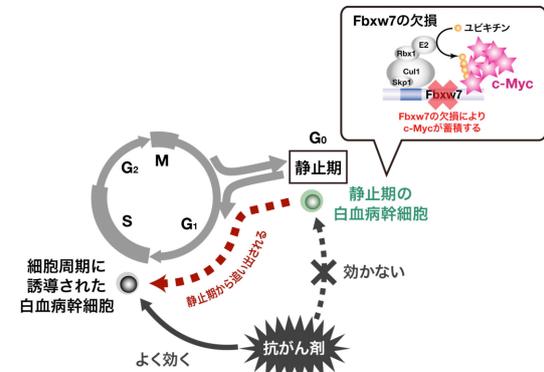


図 5 白血病幹細胞の静止期維持機構 ユビキチンリガーゼ Fbxw7 は c-Myc を分解することにより、白血病幹細胞を静止期に維持している。Fbxw7 を欠損した白血病幹細胞は静止期から細胞周期へと追い出され、抗がん剤に感受性を示す。

この仮説を検証するため、CRISPR/Cas システムを用いて、Fbxw7 欠損 E0771 細胞の樹立を試みた。そして、イムノブロットアッセイにより、E0771 細胞の 2 種類のラインにおいて Fbxw7 が欠損していることを確認した (図 6)。

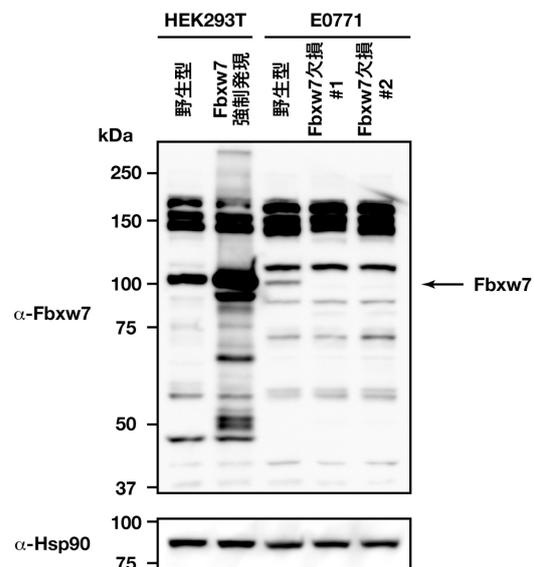


図 6 E0771 細胞における Fbxw7 の発現 野生型の HEK293T 細胞 (lane 1) と比較して、Fbxw7 を過剰発現させた HEK293T 細胞 (lane 2) において濃くなっているバンドが見られる (矢印)。この高さのバンドは野生型の E0771 細胞 (lane 3) でも見られるが、Fbxw7 をノックアウトした 2 種類のラインでは消失している (lane 4, 5)。

現在、この Fbxw7 欠損 E0771 細胞の移植実験、ならびに Fbxw7 欠損 MDA-MB-231 細胞の作製を行っている。

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 2 件)

- ① Takeishi, S., Nakayama, KI.: Role of Fbxw7 in the maintenance of normal stem cells and cancer-initiating cells. *Br. J. Cancer* (査読有), 111: 1054-1059 (2014).
- ② *Matsumoto, A., *Takeishi, S., Nakayama KI.: p57 regulates T-cell development and prevents lymphomagenesis by balancing p53 activity and pre-TCR signaling. *Blood* (査読有), 123: 3429-3439 (2014). (*Co-first authors)

[学会発表] (計 13 件)

- ① 武石昭一郎, 松本有樹修, 仲一仁, 平尾敦, 中山敬一: p57を欠損させた白血病幹細胞はニッチ制御の変化によりがん遺伝子依存性となる. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜 (11/27, 2014).
- ② Takeishi, S., Matsumoto, A., Nakayama, KI.: Disruption of quiescence by p57 ablation confers oncogene addiction to leukemia stem cells through altered niche regulation. **The 24th Hot Spring Harbor International Symposium**, Fukuoka, Japan (11/7, 2014).
- ③ Takeishi, S., Matsumoto, A., Naka, K., Hirao, A., Nakayama, KI.: Ablation of p57 confers oncogene addiction on CML stem cells through altered niche regulation. **The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (Plenary Session)**, Osaka, Japan (11/1, 2014).
- ④ 武石昭一郎: がん治療の真の標的「がん幹細胞」の静止期維持機構とその打破. 京都大学原子炉実験所専門研究会, 大阪 (8/10, 2014).
- ⑤ Takeishi, S., Matsumoto, A., Nakayama, KI.: Disruption of quiescence by p57 ablation confers oncogene addiction on leukemia stem cells through altered microenvironmental regulation. **The 12th Stem Cell Research Symposium**, Fukuoka, Japan (5/31, 2014).
- ⑥ Takeishi, S., Matsumoto, A., Onoyama, I., Nakayama, KI.: Fbxw7 prevents the G0-G1 transition to maintain quiescence in cancer stem cells. **Cold Spring Harbor Laboratory Meeting "The Cell Cycle"**, New York, USA (5/15, 2014).
- ⑦ 武石昭一郎, 松本有樹修, 小野山一郎, 仲一仁, 平尾敦, 中山敬一: Ablation of Fbxw7 eliminates leukemia-initiating cells by preventing quiescence. **がん支援冬期公開シンポジウム**, 東京 (1/31, 2014).

- ⑧ 武石昭一郎, 松本有樹修, 小野山一郎, 仲一仁, 平尾敦, 中山敬一: Ablation of Fbxw7 Eliminates Leukemia-Initiating Cells by Preventing Quiescence. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸 (12/3, 2013).
- ⑨ Takeishi, S., Matsumoto, A., Onoyama, I., Naka, K., Hirao, A., Nakayama, KI.: Ablation of Fbxw7 eliminates leukemia-initiating cells by preventing quiescence. **The 3rd France-Japan Cancer Workshop**, Toulouse, France (11/23, 2013).
- ⑩ 武石昭一郎: Fbxw7による白血病幹細胞の静止期維持機構の解明と治療応用. 第19回血液科学セミナー, 東京 (11/9, 2013).
- ⑪ 武石昭一郎: がん幹細胞の静止期維持機構の解明とがん治療への応用. 第72回日本癌学会学術総会(ランチョンセミナー), 横浜 (10/3, 2013).
- ⑫ 武石昭一郎: Fbxw7による白血病幹細胞の静止期維持機構の解明と治療応用. 第1回ブリストル血液学アカデミー, 福岡 (9/7, 2013).
- ⑬ 沖田康孝, 武石昭一郎, 松本有樹修, 小野山一郎, 仲一仁, 平尾敦, 中山敬一: ユビキチンリガーゼ Fbxw7 の阻害は白血病幹細胞を静止期から追い出しこれを根絶する. **がん若手研究者ワークショップ**, 茅野 (9/4, 2013).

[図書] (計 11 件)

- ① 武石昭一郎: p57 regulates T-cell development and prevents lymphomagenesis by balancing p53 activity and pre-TCR signaling. *臨床血液*, 55: 976, 日本血液学会 (東京) (2014).
- ② 武石昭一郎, 中山敬一: 癌幹細胞の静止期維持機構とその破綻. *Surgery Frontier*, 21: 58-60, メディカルレビュー社 (東京) (2014).
- ③ 武石昭一郎: Fbxw7による白血病幹細胞制御. *血液内科*, 68: 278-284, 科学評論社 (東京) (2014).
- ④ 武石昭一郎, 中山敬一: DNA 量の変化などを利用した細胞周期の解析. **直伝! フローサイトメトリー 面白いほど使いこなせる!**, 46-57, 羊土社 (東京) (2014).
- ⑤ 武石昭一郎, 中山敬一: 癌幹細胞の静止期維持機構. *Surgery Frontier*, 20: 70-72, メディカルレビュー社 (東京) (2013).
- ⑥ 武石昭一郎: Ablation of Fbxw7 eliminates leukemia-initiating cells by preventing quiescence. *臨床血液*, 54: 2142, 日本血液学会 (東京) (2013).
- ⑦ 武石昭一郎, 中山敬一: がん関連遺伝子産物の転写後発現調節を標的とした治療法の開発. **次世代がん戦略研究Update**, 265-268, 南山堂 (東京) (2013).
- ⑧ 武石昭一郎: 母由来の H19-Igf2 遺伝子座のゲノム刷り込みは生体の造血幹細胞を静止期に維持する. *細胞工学*, 32: 985, 学

研メディカル秀潤社 (東京) (2013).

- ⑨ 武石昭一郎: ホスファチジルセリン受容体BAI1とアポトーシス細胞は筋芽細胞融合の新たな促進因子である. **細胞工学**, 32: 880, 学研メディカル秀潤社 (東京) (2013).
- ⑩ 武石昭一郎, 中山敬一: Fbxw7 阻害は静止期を破綻させることにより白血病幹細胞を根絶する. **実験医学**, 31: 1761-1764, 羊土社 (東京) (2013).
- ⑪ 武石昭一郎, 中山敬一: ユビキチンリガーゼ Fbxw7 の阻害は白血病幹細胞を静止期から追い出しこれを根絶する. **ライフサイエンス新着論文レビュー**, <http://first.lifesciencedb.jp/archives/6867#more-6867>, ライフサイエンス統合データベースセンター (東京) (2013).

[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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武石 昭一郎 (Shoichiro Takeishi)
九州大学・生体防御医学研究所・特任助教
研究者番号: 10647720

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし