

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670135

研究課題名(和文)上皮性がん幹細胞と白血病幹細胞の共通制御メカニズムへのアプローチ

研究課題名(英文)Common molecular mechanisms regulating murine breast cancer stem cells and leukemia stem cells

研究代表者

仲 一仁 (NAKA, Kazuhito)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：70372688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん幹細胞はがんの再発や転移を引き起こす原因となる細胞として注目されているが、上皮性腫瘍におけるがん幹細胞の維持機構は明らかでない。本研究では、がん幹細胞の制御メカニズムの共通性を手掛りとして上皮性腫瘍のがん幹細胞の特性を明らかにするため、CML幹細胞と乳がん幹細胞の代謝産物の比較解析を行った。その結果、乳がん幹細胞、並びにCML幹細胞において、不飽和脂肪酸ドコサヘキソ酸が発現上昇していることを見出した。当該研究成果によって、不飽和脂肪酸の獲得や蓄積、あるいはその代謝産物が乳がん幹細胞やCML幹細胞の共通の制御メカニズムに関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although it is now widely accepted that cancer stem cells are the cell-of-origin of the vast majority of mature cancer cells and are reportedly responsible for the recurrence of disease following anti-cancer therapy, the molecular mechanisms regulating cancer stem cells in epithelial tumors has remained elusive. The biological characteristics of mature cancer cells appear to be distinct among breast cancer cells originate from endoderm and leukemia cells originate from mesoderm. However, I hypothesized that common molecular mechanisms such as stem cell quiescence and/or therapeutic resistance might sustain the long-term survival of breast cancer stem cells and chronic myelogenous leukemia (CML) stem cells. In this study, I used sophisticated metabolomics techniques to investigate the distinct and common molecular mechanisms maintaining self-renewal capacity of murine breast cancer stem cells and murine CML stem cells in vivo.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：がん幹細胞 乳がん幹細胞 CML幹細胞 代謝産物 メタボローム

1. 研究開始当初の背景

近年、がん細胞中には、少数ながら非常に多くのがん細胞を生み出す能力を有するがん幹細胞が存在する可能性が報告されている。このがん幹細胞は抗がん剤に対する抵抗性を有しており、治療後に残存したがん幹細胞から再発が引き起こされる。すなわち、がんの再発を克服する上で抗がん剤抵抗性のがん幹細胞の治療が重要となる。

このようながん幹細胞は最初に白血病において発見された。1997年にカナダ・トロント大学の Dick 教授らは、白血病患者において幹細胞様の特性を有する白血病細胞 (白血病幹細胞) が存在し、この細胞を免疫不全マウスに移植すると高い自己複製能と白血病発症能を有することを証明した。現在、このようながん幹細胞コンセプトは一部の上皮性腫瘍にも適応できると考えられており、上皮性腫瘍におけるがん幹細胞の同定や治療法の研究が進められている。

乳がんでは HER2 などの増殖シグナルの活性化を引き起こす遺伝子変異が知られており、乳がん患者の治療にはハーセプチンなどの分子標的薬が開発されている。しかし、乳がん患者では抗がん剤治療後、長期の経過のちに再発が起こることが知られており、このような治療後の再発の克服が臨床上の重大な問題となっている。これまでに、世界の多くの研究者によって、乳がん患者由来乳がん幹細胞、及びマウス乳がんモデルを用いた乳がん幹細胞の治療法の研究が進められている。

2. 研究の目的

がんの再発や転移を引き起こす原因としてがん幹細胞が注目されているが、上皮性腫瘍におけるがん幹細胞の維持機構は明らかでない。補助事業者 仲は、これまでに慢性骨髄性白血病 (CML) のマウスモデルを用いて CML 幹細胞の維持機構を解析してきた。

内胚葉由来の上皮細胞を起源とする乳がん細胞と、中胚葉由来の白血病細胞の生物学的特性は異なると考えられる。しかし、休眠状態での制御や治療抵抗性といったがん幹細胞の特性の制御には共通性が存在するのではないかという独自の仮説を着想するに至った。

本研究では、テトラサイクリン制御型 CML マウスモデルより純化した CML 幹細胞と、乳がんマウスモデル MMTV-PyVT より純化した乳がん幹細胞の代謝産物のメタボローム解析を行い、がん幹細胞の制御メカニズムの共通性を手掛りとして、乳がん幹細胞の特性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 乳がん自然発症マウスモデル

乳がん自然発症モデルとして、乳腺組織特異的マウス乳がんウイルス (MMTV) の LTR (long-terminal repeat) 配列の制御下で、ポリオーマウイルス中型 T 抗原を発現する *MMTV-PyMT* マウス (FVB バックグラウンド, ジャクソン研究所: #002374) を用いて解析を行った。また、比較対照として、野生型の FVB マウスを用いた。

2) マウス正常乳腺細胞、並びにマウス乳がん幹細胞の純化

乳がんモデル *MMTV-PyVT* マウスより乳がん組織、並びに野生型 FVB マウスより正常乳腺組織を採取し、抗 CD14 (Sa2-8) 抗体、抗 cKit (2B8) 抗体、抗 CD24 (M1/69) 抗体、抗 CD49f (G0H3) 抗体、抗 CD31 (PECAM/MEC13.3) 抗体、抗 CD45 (30-F11) 抗体、並びに抗 TER-119 (Ly-76/TER-119) 抗体を用いて染色を行った。この染色を行ったマウス乳がん細胞からセルソーター (FACS Aria III・米国 BD 社製) を用いて、乳がん幹細胞 $CD14^+cKit^-CD24^+CD49f^{high}$ 分化マーカー陰性細胞、分化が進行した乳がん細胞である

$CD14^+cKit^+$ $CD24^+CD49f^{high}$ 分化マーカー陰性細胞、及び $CD14^-CD24^+CD49f^{high}$ 分化マーカー陰性細胞を純化した。一方、野生型の FVB マウスより正常乳腺幹細胞を得るため、 $CD24^+CD49f^{high}$ 分化マーカー陰性細胞を純化した。

3) テトラサイクリン制御型 CML モデル

CML 幹細胞、並びに正常造血幹細胞の比較を行うため、テトラサイクリン誘導型 CML マウスモデル、並びに同腹仔の健常マウスを用いて解析を行った。幹細胞特異的にテトラサイクリン制御性転写活性化因子 (tTA) を発現するトランスジェニックマウス *Scl-tTA* マウス (ジャクソン研究所: #6209) と、tTA によって *BCR-ABL1* の発現制御を行うことが可能な *tetO-BCR-ABL1* トランスジェニックマウス (ジャクソン研究所: #6202) の交配を行い、両トランスジーンを有する *Scl-tTA*・*tetO-BCR-ABL1* ダブルトランスジェニックマウスを樹立した。この *Scl-tTA*・*tetO-BCR-ABL1* ダブルトランスジェニックマウスではテトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリン (Dox) (20mg/l; Sigma 社製) の投与により *BCR-ABL1* の発現を抑制することができ、反対に、Dox 投与を中止することにより *BCR-ABL1* を発現して CML の発症を誘導することができるテトラサイクリン制御型 CML マウスモデルとして知られている。この *Scl-tTA*・*tetO-BCR-ABL1* ダブルトランスジェニックマウスの Dox 投与を中止し、5 週間後、CML 発症マウスを得た。比較対照として同腹仔の *Scl-tTA* 単独トランスジェニックマウスを健常マウスとして用いた。

4) マウス造血幹細胞及び CML 幹細胞の純化 *Scl-tTA*・*tetO-BCR-ABL1* ダブルトランスジェニックマウス、並びに同腹仔の *Scl-tTA* 単独トランスジェニックマウスの Dox 投与を中止し、5 週間後、CML 発症マウス、並びに健

常マウスから骨髄単核球を取得した。この骨髄単核細胞を、抗 CD4 (L3T4)、抗 CD8 (53-6.7)、抗 B220 (RA3-6B2)、抗 TER119 (Ly-76)、抗 Gr-1 (RB6-8C5)、抗 Mac1 (M1/70)、抗 Sca-1 (E13-161.7)、並びに抗 c-Kit (2B8) 抗体を用いて染色した。これらの染色を行ったマウス CML 細胞、並びに正常骨髄単核細胞から、セルソーター (FACS Aria III)を用いて、それぞれ、マウス CML 幹細胞 ($cKit^+$ 、分化マーカー陰性、 $Sca-1^+$ 細胞、 KLS^+ 細胞)、並びに正常造血幹細胞 (KLS^+ 細胞) の純化を行った。

5) メタボローム解析

マウス CML 幹細胞、並びに正常造血幹細胞における代謝産物の比較解析を行うため、メタボローム解析を行った。Dox 投与中止 5 週間後の CML 発症マウス(4 匹 x 3)、並びに正常マウス(6 匹 x 4)からマウス CML 幹細胞 (KLS^+ 細胞)、並びに造血幹細胞 (KLS^+ 細胞) (細胞数 $1.8-2.5 \times 10^5$)をセルソーター (FACS Aria III)を用いて純化した。単離した CML 幹細胞、並びに造血幹細胞は -80°C で凍結した。

同様に、マウス乳がん幹細胞、並びに正常乳腺幹細胞における代謝産物のメタボローム解析を行った。MMTV-PyMT マウス(2 ヶ月齢、メス・3 匹)、並びに正常 FVB マウス (5 週齢、メス・3 匹)からマウス乳がん幹細胞、並びに乳腺幹細胞 (細胞数 $1.0 -2.0 \times 10^5$)をセルソーター (FACS Aria III)を用いて純化した。単離した乳がん幹細胞、並びに正常乳腺幹細胞は -80°C で凍結した。

メタボローム解析は米国メタボロン社 (Durham, ノースカロライナ州, 米国)にて実施した。メタボローム解析は超高速液体クロマトグラフィ/質量分析装置 (Ultrahigh Performance Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy: UPLC/MS/MS) Waters Acquity UPLC (Waters 社製) と Q-Exactive high resolution/accurate mass spectrometer (米国 Thermo Scientific 社製) を用いて実施した。

4. 研究成果

乳がん自然発症モデルマウス *MMTV-PyVT* より乳がん組織を採取し、セルソーターを用いて、乳がん幹細胞として報告されている $CD24^+CD49f^{high}$ 分化マーカー陰性細胞を純化した。さらに、この乳がん幹細胞のうち、 $CD14^+cKit^+CD24^+CD49f^{high}$ 分化マーカー陰性細胞、分化が進行した乳がん細胞である $CD14^+cKit^+CD24^+CD49f^{high}$ 分化マーカー陰性細胞、及び $CD14^+CD24^+CD49f^{high}$ 分化マーカー陰性細胞を純化した。これらの細胞を用いて、細胞増殖のマーカーとして知られている *Ki67* の染色を行い、細胞増殖能を解析した。その結果、乳がん幹細胞のうち、細胞増殖活性の低い特性を有する細胞集団を得ることに成功した。さらに、この休眠状態の乳がん幹細胞を、正常乳腺幹細胞を外科的に切除した乳腺脂肪組織 (Cleared fat pad) に移植し、一ヶ月後、造腫瘍能を解析した。その結果、当該乳がん幹細胞集団は、造腫瘍能を有することを確認した。

一方、テトラサイクリン制御型 CML マウスモデルを用いて CML 幹細胞 (KLS^+ 細胞) を得た。まず、マウス CML 幹細胞における代謝産物を明らかにするためメタボローム解析を行った。その結果、マウス CML 幹細胞では正常造血幹細胞と比較してジペプチド種が高発現していることが明らかとなった。ジペプチド種の産生機序として、プロテアソームやオートファジーといったタンパク質分解系の亢進や、トランスポーターによる取込み活性の関与が推察された。RNA シークエンス法によりマウス正常造血幹細胞と CML 幹細胞での遺伝子発現を解析した結果、細胞へのジペプチド種の取込みに関わるオリゴ/ジペプチドトランスポーターをコードする *Slc15a2* 遺伝子が CML 幹細胞において高発現していることを見出した (Naka *et al.*, *Nat Commun.* 2015)。

次いで、これら休眠状態のマウス乳がん幹

細胞と正常乳腺幹細胞におけるメタボローム解析を行った。まず、CML 幹細胞で発現上昇が認められたジペプチド種について解析を行ったが、正常乳腺幹細胞と比較して乳がん幹細胞におけるジペプチド種の発現変化は認められなかった。次いで、個々のアミノ酸の発現レベルの解析を行った結果、正常乳腺幹細胞と比較して乳がん幹細胞ではセリン、スレオニン、チロシン、アラニン、グリシン、ヒスチジン、リジン、トリプトファン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸の発現上昇を認めた。一方で、プロリン、アルギニン、チミジン、アスパラギンは乳がん幹細胞において発現低下が認められた。また、グルタミンは正常乳腺幹細胞と乳がん幹細胞との間で発現の差は認められなかった。

さらに乳がん幹細胞と CML 幹細胞との間で共通して変動の見られる代謝産物を解析した。その結果、不飽和脂肪酸のうちドコサヘキソン酸 (Docosahexaenate) が発現上昇していることが明らかとなった。ドコサヘキソン酸は血中における脂質濃度を低下して動脈硬化や脳梗塞、冠動脈硬化症などの予防効果を有することが知られている。しかし、乳がん幹細胞や CML 幹細胞の自己複製能の維持や抗がん剤抵抗性における役割は明らかでない。本解析によって、不飽和脂肪酸の獲得や蓄積、あるいはその代謝産物が乳がん幹細胞や CML 幹細胞の維持に関わる共通のメカニズムとなる可能性が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Kim J., Kim S.J., Naka K. (corresponding author). (2016) Transcriptome sequencing of hematopoietic stem cells and chronic myelogenous leukemia stem cells. **Genomics Data.** 7(3):57-59. doi: 10.1016/j.gdata.2015.11.017. (査読有り)

2. Naka K. (co-corresponding author), Ishihara K., Jomen Y., Jin C.H., Kim D.-H., Gu Y.-K., Jeong E.-S., Li S., Krause D.S., Kim D.-W., Bae E.J., Takihara Y., Hirao A., Oshima H., Oshima M., Ooshima A., Sheen Y.Y., Kim S.J. and Kim D.K. (2016) Novel oral transforming growth factor- β signaling inhibitor EW-7197 eradicates CML-initiating cells. **Cancer Sci.** 107(2): 140-148. doi: 10.1111/cas.12849. (査読有り)
 3. Naka K. (co-corresponding author), Jomen Y., Ishihara K., Kim J., Ishimoto T., Bae E., Mohney R.P., Stirdivant S.M., Oshima H., Oshima M., Kim D.-W., Nakauchi H., Takihara Y., Kato Y., Ooshima A., and Kim S.J. (2015) Dipeptide species regulate p38-MAPK-Smad3 signalling to maintain chronic myelogenous leukaemia stem cells. **Nat. Commun.** 6:8039 doi:10.1038/ncomms9039. (査読有り)
 4. Lee B., Yoon K.Y., Lee S.H., Kang J.M., Kim J.I., Shim S.H., Kim H.-M., Song S.H., Naka K., Kim A.K., Yang H.-K., Kim S.J. (2015) Homozygous Deletions at 3p22, 5p14, 6q15, and 9p21 Result in Aberrant Expression of Tumor Suppressor Genes in Gastric Cancer. **Genes, Chromosomes and Cancer.** 54(3):142-55. doi: 10.1002/gcc.22226. (査読有り)
 5. Bae E., Sato M., Kim R.-J., Kwak M.-K., Naka K., Gim J., Kadota M., Tang B., Flanders K.C., Kim T.-A., Leem S.-H., Park T., Liu F., Wakefield L. M., Kim S.-J., Ooshima A.(2014) Effect of Smad3 linker and C-tail phosphorylation on tumorigenesis and metastasis in breast cancer cell lines. **Cancer Res.** 74(21): 6139-49. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0803. (査読有り)
 6. Ali M.A., Naka K., Yoshida A., Fuse K., Kasada A., Hoshii T., Tadokoro Y., Ueno M., Ohta K., Kobayashi M., Takahashi C., and Hirao A. (2014) Association of a murine leukaemia stem cell gene signature based on nucleostemin promoter activity with prognosis of acute myeloid leukaemia in patients, **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 450(1): 837-43. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.066. (査読有り)
 7. Imai Y., Takahashi A., Hanyuu A., Hori S., Sato S., Naka K., Hirao A., Ohtani N., and Hara E. (2014) Crosstalk between the RB-pathway and AKT signaling forms a Quiescence-Senescence switch, **Cell Report.** 7(1):194-207. doi: 10.1016/j.celrep. (査読有り)
 8. Hoshii T., Kasada A., Hatakeyama T., Ohtani M., Tadokoro Y., Naka K., Ikenoue T., Ikawa T., Kawamoto H., Araki K., Yamamura K., Matsuda S., and Hirao A. (2014) Loss of mTORC1 induces developmental blockage in early T-lymphopoiesis and eradicates T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 111(10):3805-10. doi: 10.1073/pnas. (査読有り)
 9. Ju X., Ishikawa T., Naka K., Ito K., Ito Y., Oshima M. (2014) Context-dependent activation of Wnt signaling by tumor suppressor RUNX3 in gastric cancer cells. **Cancer Sci.** 105(4):418-24. doi: 10.1111/cas.12356. (査読有り)
- [学会発表] (計 8 件)
1. Kazuhito Naka, Akira Ooshima, Yukio Kato, Yoshihiro Takihara, and Seong-Jin Kim, Dipeptide species regulate nutrient signalling essential for the maintenance of chronic

- myelogenous leukaemia stem cells (Poster), Keystone Symposia, Stem Cells and Cancer, 平成28年3月8日, ビーバーランリゾートカンファレンスセンター, コロラド州・ブリッケンリッジ市 (米国).
2. 仲 一仁, 瀧原義宏, CML幹細胞をターゲットとする新しい治療戦略 (ワークショップ, がん治療抵抗性の解明にむけた新しいアプローチ), 第38回分子生物学会年会, 平成27年12月1日, 神戸国際会議場, 神戸市.
 3. 仲 一仁, がん幹細胞の抗がん剤抵抗性メカニズム (指定演題), 第18回癌と骨病変研究会, 平成27年11月13日, 千代田放送会館, 東京.
 4. 仲 一仁, CML幹細胞をターゲットとする新しい治療戦略 (ランチョンセミナー), 第77回日本血液学会学術集会, 平成27年10月18日, ANAクラウンプラザホテル金沢, 金沢市.
 5. Kazuhito Naka, Kaori Ishihara, Yoshie Jomen, TGF β Signaling Inhibitor eradicates CML Stem Cells, 平成26年度 新学術領域研究 「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」 冬期公開シンポジウム, 平成27年1月26-27日, 学術総合センター内一橋大学一橋講堂, 東京.
 6. Kazuhito Naka, Kaori Ishihara, Yoshie Jomen, TGF β Signaling Inhibitor eradicates CML Stem Cells, Fourth Joint International Symposium on TGF- β and Cancer, 平成27年1月13-14日, つくば国際会議場, つくば市.
 7. 仲 一仁, Novel Therapeutic Strategy for Targeting CML stem cells, 第73回日本癌学会学術総会, 平成26年9月25日, パシフィコ横浜, 横浜市.
 8. Kazuhito Naka, Dong-Hyun Kim, Shaoguang Li, Yhun Yhong Sheen, Akira Oshima,

Seong-Jin Kim, and Dae-Kee Kim The Novel Oral TGF β Signaling Inhibitor Targets Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells (Poster), Sixteenth Annual John Goldman Conference on Chronic Myeloid Leukemia Biology and Therapy, Loews Philadelphia Hotel, 平成26年9月6日, ペンシルベニア州・フィラデルフィア市 (米国).

[図書] (計2件)

1. 仲 一仁, CML 幹細胞を標的とする治療戦略の可能性, 血液内科, 70(4):499-505, 2015.
2. 仲 一仁, がん幹細胞の TGF- β シグナル伝達, 日本臨床 (特集がん幹細胞), 73(5):784-789, 2015.

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

名称: 慢性骨髄性白血病治療剤

発明者: 仲 一仁, 定免由枝, 石原薫理

権利者: MedPacto

種類: 特許

番号: 特願 2015-2070

出願年月日: 平成27年2月4日

国内外の別: 国内

名称: A composition for inhibiting growth or proliferation of chronic myelogenous leukemia cancer cell and a method thereof

発明者: Seong-Jin Kim, Kazuhito Naka

権利者: CHA industry of academic cooperation foundation (IACF), 広島大学

種類: 特許

番号: 10-2015-0043305

出願年月日: 平成27年3月27日

国内外の別: 外国

名称: 慢性骨髄性白血病治療剤

発明者: 仲 一仁

権利者: 広島大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-075195

出願年月日: 平成27年4月1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

仲 一仁 (NAKA, Kazuhito)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・

准教授

研究者番号: 70372688