

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04292

研究課題名(和文) 癌幹細胞ニッチの分子基盤解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular basis for the cancer stem cell niche

研究代表者

田賀 哲也 (TAGA, Tetsuya)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：40192629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞を支持するニッチの解明は癌の理解と根絶に重要である。本課題は独自の手法で探索した癌幹細胞ニッチ擬態ポリマーに結合する鉄運搬分子transferrin (Tf)の同定を手掛かりにその解明を行った。グリオーマの進展における鉄貯蔵腫瘍随伴マクロファージ(TAM)の関与およびTAMの動員と分化への癌幹細胞の寄与を示した。またグリオーマの術中検出に5-ALAから代謝されるPpIXの蛍光が利用されるが癌幹細胞はTf受容体に取り込む鉄を利用して非蛍光性hemeへ変換し検出を免れることを示した。これらの結果は、グリオーマ癌幹細胞は鉄代謝に関わるニッチを自ら構築して利用する生存戦略をとることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSCs) reside in a microenvironment, niche. Elucidation of the CSC niche helps develop new cancer therapy. We have identified a CSC niche-mimicking polymer from 376 synthetic polymers and identified an iron-carrier transferrin (Tf) which binds to it. In the tumor formed in the mouse brain following transplantation of rat C6 glioma CSCs, iron was found to be stored in tumor-associated macrophages (TAMs), suggesting contribution of iron-storing TAMs to cancer progression. We further demonstrated that CSCs recruit monocytes and induce their differentiation into TAMs. Since PpIX, a fluorescent metabolite of 5-ALA, accumulates in glioma cells, 5-ALA is used for fluorescence-guided surgical resection. We indicated that CSCs exhibit low PpIX accumulation among glioma cells via nonfluorescent conversion by iron incorporated by Tf receptor, suggesting that CSCs escape from surgical resection. We propose that glioma CSCs have a capacity to construct self-advantageous niche.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：癌 癌幹細胞 ニッチ グリオーマ 膵臓癌 ヘム 鉄 5-ALA

1. 研究開始当初の背景

これまで国内外の多くの先駆的研究者により推進されてきた癌研究は、癌化の原因と癌病態について多様な観点からつまびらかにしてきたが、癌による死が国民の死因の重要な位置を占める現在、癌の根絶につながるブレークスルーをさらに期待する声は強い。このような状況下、「癌幹細胞」の概念すなわち、癌組織の再構築能力に秀でた特殊な性質の細胞が存在して癌の治療抵抗性・再発・転移に寄与するのではないかという考え方は、これまでにない癌の理解と癌克服に向かうパラダイムシフトを生じさせる新機軸として期待される。

そのような癌幹細胞の生存や維持ならびに癌の進展に寄与する微小環境「ニッチ」の分子基盤解明により癌幹細胞を標的とした癌根絶に向かうための成果を目指す本研究課題を立案・遂行した背景は、癌幹細胞が正常幹細胞と同様にその微小環境(癌幹細胞ニッチ)によって維持されているとの観点に基づいている。本研究課題を着想した意義のひとつは、この癌幹細胞ニッチの分子基盤解明を、合成ポリマーを活用したニッチ擬態分子(ミミクリー)の構築というストラテジーで行うという新規性にある。

本研究課題では、準備研究により進行中であるグリオーマ幹細胞のニッチの解明に主として取り組む他、グリオーマ同様に予後不良であるということ的背景に膵臓癌幹細胞についても合成ポリマーを用いた癌幹細胞ニッチへのアプローチを実施することとした。これまでの準備研究で行った合成ポリマーアレイのスクリーニングでポリウレタン系のグリオーマ幹細胞ニッチ擬態ポリマーPU10をすでに得ており、またPU10に付着して癌幹細胞の生存を助けることが示唆される分子を質量分析によっていくつか同定したことを背景として本課題は実施された。

さて研究開始当初の背景について補足すると、癌幹細胞ニッチの新規治療標的としての重要性については、白血病に関する先駆的研究で示されたように(Ishikawa et al., Nat. Biotech. 25: 1315-1321, 2007)、細胞の休眠化と抗がん剤抵抗性の付与など癌幹細胞維持のための至適微小環境の提示の発見等の研究成果を背景として認識されている。研究代表者はこれまでに、癌細胞株中における *in vivo* での癌再構築能力の著しい癌幹細胞集団の同定(Kondo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 781-786, 2004)を行い、またその後、癌幹細胞集団の一部がニッチ機能をもつ細胞集団へと分化し癌幹細胞の維持に寄与するとともに、これらの細胞集団が両方存在することが癌幹細胞の維持と癌の進展に至るといふ癌の利己的な生存戦略の存在を明らかにした(Tabu et al., 当時未発表データ)。後者の概念は本課題の研究代表者が胚性幹(ES)細胞研究の第一人者 Austin Smith と共同で実施した準備研究で得た概念

であり、それは培養中のES細胞集団の環境が分化条件に陥ると集団の中にES細胞維持因子(LIF)産生細胞に分化するものが出るというものである(Dani et al., Dev. Biol. 203: 149-162, 1998)。これまでのこのような研究背景は、癌幹細胞ニッチ擬態ポリマーに結合する癌幹細胞の生存・維持を支持する蛋白質の機能解析研究すなわち、*in vitro* 培養系を経た移植モデル系等による *in vivo* での生体ニッチ解明の研究展開にあたっての重要な足掛かりとなっている。

2. 研究の目的

癌組織の再構築能力に秀で治療抵抗性を示す癌幹細胞の理解ならびに、癌幹細胞を支持する微小環境(ニッチ)の重要性が認識されているが、分子基盤が未解明であることが現状における癌根絶の進展を遅らせている一つの背景と考えらえる。

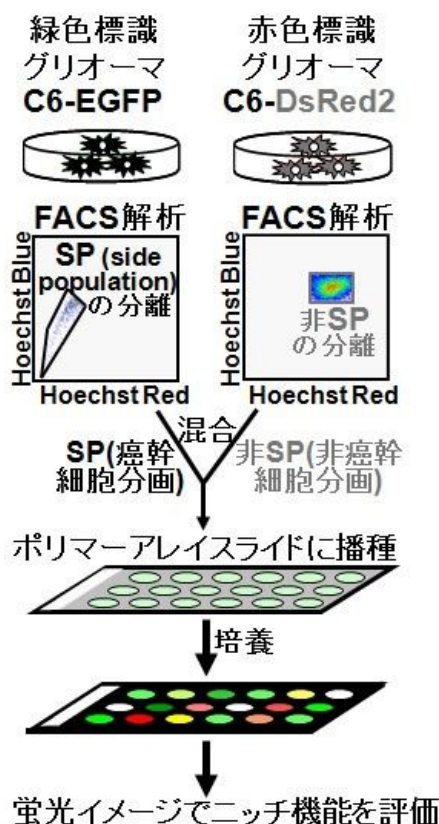
本研究課題が取り組む分野の状況を見ると、癌の根絶における癌幹細胞の至適生存環境解明と標的化の重要性は認識されつつも、その実体つまりニッチの分子的説明が不明確であることが、大きな問題点であるといえる。言うまでもなく国内外において、この癌幹細胞ニッチを規定する分子の探索は精力的に行われているが、これまでのところ、全容が解明されたとは言い難い状況にあり、従来の遺伝子発現プロファイリング等がカバーできない新たなアプローチが必要とされていた。

本課題は癌幹細胞を自己複製させる機能をもつ合成ポリマー(癌幹細胞ニッチ擬態ポリマー)の探索という斬新な方法でその解決にあたるのが目的である。研究代表者が海外共同研究者と開発を進めた多種類の合成ポリマー群のアレイスライドと蛍光イメージングによる癌幹細胞自己複製ニッチ評価系は確立しており、またすでにグリオーマ幹細胞のニッチ擬態ポリマーとしてひとつのポリマーおよびそれに結合するニッチ分子候補を得ていることから、それらを手掛かりに癌幹細胞ニッチの分子基盤解明という目的達成に向けて本課題を実施した。広く癌の病態理解や新規治療法の開発に寄与することが期待されるという点で本課題の意義は大きい。

3. 研究の方法

癌幹細胞ニッチの分子基盤解明に向けて必要な、癌幹細胞のニッチ機能をミミックスする合成ポリマーアレイ関連の実験は、University of Edinburgh School of Chemistry の Bradley 教授グループとの良好な共同研究関係構築によって、サンプルの授受や癌幹細胞に対するニッチ機能評価ならびに結果のフィードバックを経た新たなポリマー合成などが実施される。そのストラテジーは、図に示すように、数百種類の化学合成ポリマーをスライドガラスにスポットし

たアレイ上に、研究代表者らが以前明らかにしたラット C6 グリオーマ中の Hoechst 33342 色素染色性の低い癌幹細胞「side population (SP)細胞」(Kondo et al., PNAS 2004) に対して自己複製させる作用つまりニッチ機能を持つポリマーの網羅的探索である。



この手法により数百種類の合成ポリマーを用いて網羅的にニッチ機能を探索して癌幹細胞ニッチ擬態ポリマーを得た後は、同ポリマーに結合する蛋白質を電気泳動後に回収して質量分析を行うという手法でニッチ構成分子を同定する。すでに 376 種類の合成ポリマーアレイを用いた準備研究で癌幹細胞ニッチ機能の高い PU10 ポリマーを得ており、PU10 結合蛋白質として本研究課題で取り組む 3 つの興味深い分子、galectin-1、transferrin、transferrin を同定した。

これらの手法で新たな癌幹細胞ニッチ擬態ポリマーを探索するとともに、すでに同定した癌幹細胞ニッチ擬態ポリマーPU10 については上述の結合分子を手掛かりに、研究代表者がルーチンに行っている C6 グリオーマ幹細胞の in vitro 培養系あるいは免疫不全マウスへの移植評価系に阻害剤を添加あるいは投与して検討する手法を執る。

4. 研究成果

(1) 準備研究でラット C6 グリオーマの癌幹細胞を支持するニッチ擬態ポリマーPU10 に結合する癌幹細胞ニッチ分子候補として鉄運搬分子 transferrin (Tf) を同定し、グリオーマ患者の癌部遺伝子発現データベース解析で、Tf 受容体の発現と悪性度との間に正相関

を見出していたことから、グリオーマ癌幹細胞は鉄代謝に関わるニッチを自ら構築して利用する生存戦略をとるといふ仮説を立て、C6 グリオーマ幹細胞のマウス脳内移植系を用いて、グリオーマ組織中における CD204 陽性の腫瘍随伴マクロファージ (TAM) に 3 価鉄 (貯蔵鉄) の存在を見出した。これにより癌の進展における鉄貯蔵 TAM の関与が明らかとなった。

(2) C6 グリオーマ癌幹細胞と非癌幹細胞について cDNA マイクロアレイ解析を行い、単球動員やマクロファージ分化を担う CCL2 や GM-CSF などの遺伝子発現が、癌幹細胞において亢進していたことから、CCL2 受容体に対する阻害剤や GM-CSF の中和抗体を用いた解析を実施し、TAM の腫瘍内動員・分化に癌幹細胞が関与していることを明らかにした。

(3) 前項を展開させた研究で癌幹細胞によって誘導された TAM は CD11c low と CD11c high の 2 種類に大別され、後者のみが腫瘍を進展させる能力を有していることも見出した。

(4) 先に述べた第(1)項目で考察したようにグリオーマ幹細胞に鉄代謝が寄与していることから、鉄に関わるヘム代謝経路に着目した。ヘム前駆体のプロトポルフィリン IX (PpIX) は 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) から代謝され、鉄と結合してヘムに変換される。光感受性物質である PpIX は腫瘍細胞特異的に蓄積することから、5-ALA はグリオーマ術中診断薬として頻用されている。ラットグリオーマ C6 細胞を 5-ALA 処理後に PpIX の蛍光強度を測定したところ SP 細胞 (癌幹細胞) は PpIX の低蓄積性を示し、グリオーマ中の癌幹細胞は検出が困難であることを示唆した。これは現行の術中診断法でグリオーマの癌幹細胞が検出・摘出できない可能性を示しており、臨床診断学的に大きな示唆を与える成果である。さらに鉄キレート剤デフェロキサミン処理で SP 細胞における PpIX の蓄積レベルが劇的に改善したことから、癌幹細胞を標的とした新たな診断法の開発に道を拓くものである。

(5) 前項の成果はラットグリオーマを用いた研究によるものであったことから、ヒトの系での解析を行うため、熊本大学の共同研究者から供与された 2 株のヒトグリオーマ細胞株を用いてヒトグリオーマに焦点を当てた。これら 2 株を、グリオーマ幹細胞亜集団を維持する増殖因子を添加したスフェア形成系または接着系で培養した後、5-ALA を添加して PpIX 合成を促した。Flow cytometry による細胞内 PpIX 定量の結果、2 株いずれもブロードな PpIX 蓄積パターンを示した。この結果に基づき今後 PpIX 低蓄積性および PpIX 高蓄積性の亜集団についてマウス脳内移植モデルにより腫瘍形成能の検討が可能となっ

た。

(6)研究代表者らは以前グリオーマ細胞株 C6 において Hoechst33342 色素排出性細胞集団 (side population, SP) が癌幹細胞画分であることを報告した。癌幹細胞の代謝特性解明の一環として C6 細胞を細胞内ミトコンドリア量と活性酸素量の指標となる蛍光プローブで染色したところ SP 細胞 (癌幹細胞) が低い蛍光強度を示した。この低い蛍光強度は SP 細胞に発現する ABC transporter によるプローブ排出が一因であることがわかり、蛍光プローブを用いた癌幹細胞の代謝解析には注意を要することを提示した。

(7)これまでに確立した合成ポリマーアレイスライドと蛍光解析による癌幹細胞ニッチ探索系を適用して、可視化腭臓癌幹細胞(東京医科歯科大学の共同研究者が樹立)のニッチ探索を、研究協力者 Bradley 教授からポリマーの再合成の協力を得て進めた。蛍光による定量的解析で、腭臓癌幹細胞の自己複製ニッチ擬態ポリマーと腭臓癌幹細胞トラップポリマーの探索を行った。その結果、腭臓癌幹細胞をトラップする候補ポリマーを特定することができた。候補ポリマーをスケールアップして腭臓癌幹細胞トラップ能を検証した結果、有意なトラップ能は確認できなかった。海外研究協力者と共同で今後さらに多様なペプチド含有ポリマーを合成してポリマーアレイによる探索を進める。

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 10 件)

Saito K, Nobuhisa I, Harada K, Takahashi S, Anani M, Lickert H, Knai-Azuma M, Kanai Y, Taga T. Maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells in fetal intra-aortichematopoietic clusters by the Sox17-Notch1-Hes1 axis. *Experimental Cell Research* 365:145-155, 2018 査読有
DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.02.014

Ito K, Noguchi A, Uosaki Y, Taga T, Arakawa H, Takizawa. Gfap and Osmr regulation by BRG1 and STAT3 via interchromosomal gene clustering in astrocytes. *Molecular Biology of Cell* 29:209-219, 2018 査読有
DOI: 10.1091/mbc.E17-05-0271

Harada K, Nobuhisa I, Anani M, Saito K, Taga T. Thrombopoietin contributes to the formation and the maintenance of hematopoietic

progenitor-containing cell clusters in the aorta-gonad-mesonephros region. *Cytokine* 95:35-42, 2017 査読有
DOI: 10.1016/j.cyto.2017.02.012

Wang W, Tabu K, Hagiya Y, Sugiyama Y, Kokubu Y, Murota Y, Ogura SI and Taga T. Enhancement of 5-aminolevulinic acid-based fluorescence detection of side population-defined glioma stem cells by iron chelation. *Scientific Reports* 7: 42070, 2017 査読有
DOI: 10.1038/srep42070

Murota Y, Tabu K and Taga T. Requirement of ABC transporter inhibition and Hoechst 33342 dye deprivation for the assessment of side population-defined C6 glioma stem cell metabolism using fluorescent probes. *BMC Cancer* 16:847, 2016 査読有
DOI: 10.1186/s12885-016-2895-8

Tabu K, Muramatsu N, Mangani C, Wu M, Zhang R, Kimura T, Terashima K, Bizen N, Kimura R, Wang W, Murota Y, Kokubu Y, Nobuhisa I, Kagawa T, Kitabayashi I, Bradley M, Taga T. A synthetic polymer scaffold reveals the self-maintenance strategies of rat glioma stem cells by organization of the advantageous niche. *Stem Cells* 34:1151-1162, 2016 査読有
DOI: 10.1002/stem.2299

Kokubu Y, Tabu K, Muramatsu N, Wang W, Murota Y, Nobuhisa I, Jinushi M, Taga T. Induction of protumoral CD11c(high) macrophages by glioma cancer stem cells through GM-CSF. *Genes to Cells* 21:241-251, 2016 査読有
DOI: 10.1111/gtc.12333

Inagaki T, Kusunoki S, Tabu K, Okabe H, Yamada I, Taga T, Matsumoto A, Makino S, Takeda S, Kato K. Up-regulation of lymphocyte antigen 6 complex expression in side-population cells derived from a human trophoblast cell line HTR-8/SVneo. *Human Cell* 29:10-21, 2016 査読有
DOI: 10.1007/s13577-015-0121-7

Kimura T, Wang L, Tabu K, Tsuda M, Tanino M, Maekawa A, Nishihara H, Hiraga H, Taga T, Oda Y, Tanaka S. Identification and analysis of CXCR4-positive synovial

sarcoma-initiating cells. *Oncogene* 35:3932-3943, 2016 査読有
DOI: 10.1038/onc.2015.461

Sudo G, Kagawa T, Kokubu Y, Inazawa J, Taga T. An increase of GFAP-positive astrocytes in histone demethylase GASC1/KDM4C/JMJD2C hypomorphic mutant mice. *Genes to Cells* 21:218-225, 2016 査読有
DOI: 10.1111/gtc.12331

[学会発表](計 28 件)

田賀 哲也、梶 康一. 神経膠腫癌幹細胞の利己的生存戦略による癌の進展. 第 38 回日本炎症・再生医学会(招待講演) 2017

Tabu K, Wang W, Murota Y and Taga T. Self-expanding strategies of glioma stem cells that involves macrophages to adapt to iron-deprivation stress. The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2017

Murota Y, Wenqing GY, Tabu K, and Taga T. Establishment of glioma mouse model by transducing oncogenic H-RasV12 gene into the p53 deficient astrocytes. The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2017

梶 康一、巽 瑠璃子、田賀 哲也. 宿主単球・マクロファージの誘導によるグリオーマ幹細胞の鉄欠乏ストレスへの適応: ニッチ自己構築機構の解明. Consortium of Biological Sciences 2017. 2017

松永 浩明、梶 康一、田賀 哲也. グリオーマ幹細胞による宿主マクロファージ制御におけるオートスキジス様細胞死の役割. Consortium of Biological Sciences 2017. 2017

室田 吉貴、Sara Schmidt、梶 康一、伊藤 浩光、田中 真二、Mark Bradley、田賀 哲也. 膵臓癌幹細胞ニッチを擬態する合成ポリマーのスクリーニング. Consortium of Biological Sciences 2017. 2017

Murota Y, Schmidt S, Tabu K, Ito H, Tanaka S, Bradley M and Taga T. Screening for human pancreatic cancer stem cell niche mimicry by using synthetic polymer microarrays. The 15th Stem Cell Research Symposium. 2017 年

Saito K, Nobuhisa I, and Taga T. The mechanism of maintaining the undifferentiated state of hematopoietic stem cell by Sox17 and TET family members. The 40th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. 2017

Nobuhisa I, Takahashi S, Saito K, and Taga T. Role of adhesion molecules induced by a transcription factor Sox17 in intra-aortic hematopoietic cell cluster formation in midgestation mouse embryos. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 2017

Tabu K, Kokubu Y, Muramatsu N, Nomoto S, Wang W and Taga T. Adaptive response of rat C6 glioma stem cells to iron deprivation by which the development of tumor infiltrating macrophages is induced. The 14th Stem Cell Symposium. 2016

Wang W, Tabu K, Sugiyama Y, Hagiya Y, Ogura SI and Taga T. Resistance of glioma stem cells to 5-aminolevulinic acid (ALA)-based detection due to enhanced metabolic conversion of protoporphyrin IX. The 14th Stem Cell Symposium. 2016

Murota Y, Tabu K and Taga T. C6 glioma stem cell-derived extracellular vesicles promote the development of macrophages. The 14th Stem Cell Symposium. 2016

Tabu K, Wang W, Murota Y and Taga T. Adaptive response of C6 glioma stem cells to iron deprivation through macrophage induction. 第 75 回日本癌学会学術総会. 2016

Wang W, Tabu K, Hagiya Y, Murota Y, Ogura SI and Taga T. Enhancement of 5-aminolevulinic acid-based fluorescence detection of glioma stem cells by chelating iron. 第 75 回日本癌学会学術総会. 2016

齋藤 清香, 信久 幾夫, Anani Maha, 原田 果歩, 高橋 聡美, Lickert Heiko, 金井正美, 金井克晃, 田賀 哲也. Maintenance of hematopoietic stem and progenitor cell phenotype of intra-aortic cell clusters in the AGM region through the Sox17-Notch1-Hes1 axis. The 39th Annual Meeting of the

Molecular Biology Society of Japan.
2016

Kagawa T, Yamaguchi Y, Sudo G, Kokubu Y, Hattori S, Takao K, Miyakawa T, Inazawa J, Taga T. Astroglial development is regulated by DNA and histone methylation: from molecular basis to behavioral abnormalities in gene-manipulated mice. Cold Spring Harbor Asia meeting on Novel Insights into Glia Function & Dysfunction. (招待講演) 2016

Taga T Tabu K. Characterization of C6 glioma cancer stem cells and their niche. Seoul National University, Cancer Research Institute (SNUCRI) Annual Symposium 2015 “Innovative Approaches to Explore Novel Druggable Targets” (招待講演) 2015

Tabu K, Muramatsu N, Taga T. Synthetic polymer-based approach revealed an adaptive capacity of glioma stem cells by inducing tumor-infiltrating and iron-accumulating macrophages. The 38th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. 2015

Wang W, Tabu K, Kokubu Y, Hagiya Y, Ogura S, Taga T. Splenic abnormal erythropoiesis in C6 glioma-bearing mice: an implication for their environment of cancer stem cells. 第74回日本癌学会学術集会. 2015

〔図書〕(計2件)

梶 康一、田賀 哲也. 株式会社エヌ・ティイー・エス. がん幹細胞によるがん進展メカニズム (次世代がん治療). 2017, 386

梶 康一、室田 吉貴、田賀 哲也. 日本バイオマテリアル学会. 合成ポリマーを用いた癌幹細胞ニッチの特性解明 (バイオマテリアル-生体材料-). 2017, 82

〔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〕

(1)ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/scr/subjects/index.html>

<http://www.tmd.ac.jp/mri/scr/english/subjects/index.html>

http://reins.tmd.ac.jp/html/100007289_ja.html

http://reins.tmd.ac.jp/html/100007289_en.html

(2)プレスリリース：癌再発に深く関わる癌幹細胞が診断薬 5-ALA による検出を免れる特性を発見

http://www.tmd.ac.jp/archive-tmd/kouhou/20170207_1.pdf

(3)市民公開講座：田賀 哲也. 幹細胞の基本の“き”. 2016年2月19日

(4)高校生を対象とした幹細胞のミニレクチャーと観察実習

大阪府立 茨木高等学校. 2016.8.3

私立 本郷高等学校. 2016.8.22

大阪府立 茨木高等学校. 2017.8.3

筑波大学附属 駒場高等学校. 2017.12.14

6. 研究組織

(1)研究代表者

田賀 哲也 (TAGA, Tetsuya)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号：40192629

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

ブラッドレイ マーク (BRADLEY, Mark)
University of Edinburgh・School of Chemistry・Professor