

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460061

研究課題名(和文) 転写因子IRF-2を分子標的とした癌幹細胞除去戦略

研究課題名(英文) Establishment of the eradication strategy for cancer stem cells by targeting IRF2

研究代表者

佐藤 卓 (Sato, Taku)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・非常勤講師

研究者番号：40375259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌の根治には、腫瘍組織中の化学療法や放射線治療に抵抗性の癌幹細胞の駆逐が必須である。毛包幹細胞は、マウス皮膚がんモデルの解析において皮膚がんの発生母細胞(癌幹細胞)であることが示されている。本研究では、毛包幹細胞を題材としてIFNの作用がその幹細胞性を低下させるストレスとなりうることを、IFNシグナルが過剰となるIRF2欠損マウスで明らかにした。また、遺伝子発現解析や細胞系譜追跡の実験から、この幹細胞性の低下が幹細胞の「異常分化」によって生じていることを明らかにした。このようなIFNの作用は今後、癌幹細胞を駆逐する戦略として有望であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to cure cancer, it is necessary to eliminate cancer stem cells (CSCs), that is resistant to chemotherapy and radiotherapy in a tumor tissue. Hair follicle stem cells (HFSCs) are cell of origin of cancer in mouse skin cancer model. Interferon regulatory factor 2 (IRF-2) is transcriptional factor which negatively regulate IFN signaling in a cell. In this study, I found that the functional decline of HFSCs was induced by direct and/or indirect effect of physiologic IFNs in vivo in IRF2 deficient mice. Furthermore, based on comprehensive gene expression analysis and lineage tracing experiment, chronic IFN exposure induces "aberrant differentiation" on HFSCs. These effects of IFN may applicable for the strategy to eradicate CSCs.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：組織幹細胞 癌幹細胞 サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織が均一な腫瘍細胞の集まりではなく、分化した腫瘍細胞の供給源となる「癌幹細胞」を含むことが、患者由来の腫瘍組織や、マウス発癌モデルにおいて証明されている (*Cell stem cell*. 2012, 10:717)。このごく限られた数の癌細胞は、化学療法や放射線治療に対して強い抵抗性を示すことから、その残存が、癌の再発や転移をもたらす原因と予想される。さらに、ごく最近の報告では、腫瘍の悪性化が、単に増殖能の高い癌細胞クローンが増加することで起こるのではなく、より自己複製能の高い癌細胞クローン (癌幹細胞) が選択され、濃縮されることでもたらされることが実験的に示されている (*Nature*. 2012, 488:527)。これらの事実は、現行の“細胞の増殖”を標的とした抗癌剤治療のみでは悪性腫瘍の根治が不可能であり、癌幹細胞の“自己複製能 (即ち幹細胞性)”を標的とし、同能力を低下させる治療戦略の確立が必要であることを強く示唆している。

申請者は、これまでに、感染防御によく知られたインターフェロン (IFN) の細胞内シグナルを、“負”に制御する転写因子である、Interferon Regulatory Factor-2 (IRF2) が、意外にも造血幹細胞の幹細胞性 (自己複製能) の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにしている (*Nat Med*. 2009, 15:696)。さらに *Irf2* 遺伝子欠損マウス (*Irf2*<sup>-/-</sup>マウス) の造血幹細胞に認められた「幹細胞性の低下」が、同マウスの他の臓器に局在する組織幹細胞にも共通して認められるか検討した。その結果、表皮の幹細胞においても同様の幹細胞機能異常を認めたことから、IRF2 が様々な組織幹細胞に共通して「幹細胞性維持」に重要な master regulator であることが示唆された (投稿準備中)。

本申請研究では、これらの正常組織幹細胞の解析や血液腫瘍モデルから得られた知見を踏まえ、まず IRF2 欠損による組織幹細胞減少のメカニズムを解明する。その上で、IRF2 及び IFN シグナルを治療ターゲットとすることで、腫瘍の悪性化の抑制や癌幹細胞の駆逐の可能性を「皮膚癌マウスモデル」において検証する。

## 2. 研究の目的

「研究開始当初の背景」に示した、これまでの知見を踏まえ、本申請研究では、以下の点を明らかにすることを目標とした。

### (1)

*Irf2* 遺伝子を欠損することによる組織幹細胞減少のメカニズムを正常表皮幹細胞を題材に明らかにする。第一に考えられる原因は、生理的な IFN シグナルの制御不全であり、この点を *Irf2*<sup>-/-</sup>*Ifnar1*<sup>-/-</sup> 及び *Irf2*<sup>-/-</sup>*Stat1*<sup>-/-</sup>マウスの解析から明らかにする。具体的には後述の通りであるが、これらのマウスの表皮幹細胞数の解析や、*in vivo* の組織再生実験から、IFN シグナルをキャン

セルすることで *Irf2*<sup>-/-</sup>マウスに見られる幹細胞減少が回復するかを検討する。また、表皮幹細胞減少をもたらす責任細胞を同定するために *Irf2*<sup>-/-</sup>マウスを背景とし、表皮細胞特異的に IFN シグナルがキャンセルされるコンディショナルノックアウトマウスを作製し、脱毛や表皮幹細胞機能異常が認められるかを同様に検討する。また、幹細胞減少のより直接的な要因を明らかにするため、*Irf2*<sup>-/-</sup>マウスから表皮幹細胞を精製し、網羅的遺伝子発現解析を行う。特に、幹細胞減少の要因として一般的に想定される、幹細胞の「分化」、「老化」、「アポトーシス」に関わる遺伝子についてコントロールマウス由来幹細胞との発現の差異に着目する。

### (2)

皮膚の化学発癌モデルを確立し、*Irf2*<sup>-/-</sup>マウスにおける腫瘍形成の程度及び、良性腫瘍 (papilloma) から悪性腫瘍 (SCC) への癌の進展の頻度を検討する。また SCC への進展が認められた場合には、これらの腫瘍組織における幹細胞様分画の頻度について、Lineage tracing 法を用い、組織学的な検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) *Irf2*<sup>-/-</sup>マウスにおける表皮幹細胞の減少メカニズムの解明

これまでの *Irf2*<sup>-/-</sup>マウスの解析から、①加齢に伴い、*Irf2*<sup>-/-</sup>マウスの表皮では、CD34<sup>+</sup>a6 integrin<sup>+</sup>表皮幹細胞分画がコントロールマウスに比べ有意に減少していること (未発表データ)、② *Irf2*<sup>-/-</sup>マウスでは、“抜毛 (ばつもう)” 後におこる「毛の再生」がコントロールマウスに比べ遅延し、また部分的にしか起こらないこと (未発表データ、投稿準備中) などを観察している。毛の再生は、毛包バルジ領域に分布する CD34<sup>+</sup>幹細胞から progeny が供給され、これにより、毛包構造が発達することで誘導されることから (*Cell*. 2011, 144:92)、*Irf2*<sup>-/-</sup>マウスでは、機能的な毛包幹細胞が減少している可能性が考えられる。本申請研究では、まず、*Irf2*<sup>-/-</sup>マウスの表皮幹細胞減少の要因を明らかにする。マウス表皮には、複数の幹細胞サブセットが分布しているが (*Cell Stem Cell*. 2010, 7:656)、ここではバルジ領域に分布する CD34<sup>+</sup>a6 integrin<sup>+</sup>毛包幹細胞 (以下、hair follicle stem cell, HFSC) を実験対象とする。(DMBA/TPA 誘導性の皮膚癌モデルでは、腫瘍がバルジ領域の幹細胞に由来することが示されている (*PNAS*. 2011, 108:7425)。) 本研究では、HFSC を生後 5-7 ヶ月齢の脱毛が観察されたマウス背部表皮より精製し、網羅的遺伝子発現解析 (マイクロアレイ, Agilent, SurePrint G3 Mouse Gene Expression 8x60K) を行った。得られたアレイデータは、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) により、*Irf2*<sup>-/-</sup>マウスの HFSC においてコントロールマウスのそれに比べ発現が亢進または抑制されてい

る“パスウェイ”や、サンプル間での HFSC などに特徴的な遺伝子群 (Gene signature) の発現の“偏り”を検査し、*Irf2*<sup>-/-</sup>マウスの HFSC に生じた性状変化の全体像をあきらかにしようと考へた。

*Irf2*<sup>-/-</sup>マウスを背景としながら同時に *Stat1* や *Ifnar1* 遺伝子を欠損し IFN シグナルがキャンセルされたマウスでは、*Irf2*<sup>-/-</sup>マウスに認められる脱毛や皮膚症状が完全にレスキューされる。また CD8+T 細胞を除去することでも同様に病態が改善することから、IFN が病因であり、それらは CD8+T 細胞に作用し機能を修飾するか、CD8+T 細胞から分泌されて表皮組織 (HFSC) に何らかの影響を及ぼすかいずれかと考へられる。そこで、本研究では *Irf2*<sup>-/-</sup>マウスを背景とし、表皮細胞特異的に IFN シグナルがキャンセルされるコンディショナルノックアウトマウスを作製し、脱毛や表皮幹細胞機能異常が認められるかを検討した。

さらに、*Irf2*<sup>-/-</sup>マウス HFSC の生体内での振る舞いを検討するために、同細胞の *in vivo* Lineage tracing 実験を行った。このために、*Irf2*<sup>-/-</sup>マウスと HFSC レポーターマウスである Keratin15 (K15)-CrePGR マウス、及び Rosa-*lsl*-LacZ マウスの三系統を交配し、*Irf2*<sup>-/-</sup>:*K15*-CrePGR:*Rosa-lsl-LacZ* マウスを作製した。これらのマウスの背部に RU486 を塗布し Cre リコンビナーゼを誘導後、背部の毛を抜毛し、その 5 日後に、各々のマウスの HFSC が生み出す Progeny の分布を組織学的に検討した。

## (2) 皮膚癌モデルの確立

本申請研究では、発癌物質である DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene) 及び TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetone) をマウス背部に塗布することで誘導する皮膚癌モデルを用いる。このモデルでは、TPA 塗布開始後 6-12 週にかけて、塗布部位に良性腫瘍 (papilloma) を形成し、20 週ごろまでに一部が、SCC に移行する。より具体的には、生後 23, 25, 27 日目にマウス背部にアセトンに溶解した DMBA (100 nmol in 200ul アセトン) を塗布し、その後、週に 2 回 TPA (27.2 nmol in 200ul アセトン) を塗布し続ける。さらに生後、49, 51 日目において再度 DMBA を塗布した。(Nature, 2012, 488:527 を参照した。)

## 4. 研究成果

### (1) *Irf2*<sup>-/-</sup>マウスにおける表皮幹細胞の減少メカニズムの解明

まず初めに脱毛や皮膚症状が正常に戻る *Irf2*<sup>-/-</sup>:*Stat1*<sup>-/-</sup> マウス及び *Irf2*<sup>-/-</sup>:*Ifnar1*<sup>-/-</sup> マウスで HFSC の機能が回復しているか確認するために、体毛の再生実験を行った。その結果、*Irf2*<sup>-/-</sup>:*Ifnar1*<sup>-/-</sup> 及び *Irf2*<sup>-/-</sup>:*Stat1*<sup>-/-</sup> マウスのいずれにおいて

も抜毛 10 日後に体毛の再生を認め HFSC の機能回復が確認された。つまり、本マウスでは確かに何らかの IFN の作用が、結果として HFSC の機能低下をもたらしている。そこで、IFN の直接の作用が HFSC 機能を低下させるかを検討するために、表皮細胞特異的に IFN シグナルがキャンセルされるコンディショナルノックアウトマウスを作製し、まず *Irf2*<sup>-/-</sup> マウスのような脱毛が認められるかを検討した。本研究では、表皮特異的 Cre 発現マウスとして Keratin14 (K14)-Cre トランスジェニックマウスを用いた。交配により *Irf2*<sup>-/-</sup>:*K14*-Cre:*Ifnar1*<sup>fl/fl</sup> マウス及び *Irf2*<sup>-/-</sup>:*K14*-Cre:*Stat1*<sup>fl/fl</sup> マウスを作製し、自然な脱毛が生じるかを検討したが、いずれのマウスにおいても *Irf2*<sup>-/-</sup> マウスと同様の脱毛を認めた。しかしながら、これらのマウスでは、IFN- $\alpha$  または IFN- $\gamma$  いずれか一方の IFN シグナルをキャンセルしているにすぎないため、現在、いずれのシグナルも同時キャンセルしうるマウスの作製をすすめており、今後同マウスでも脱毛が生じるかを検討する計画である。

一方で、*Irf2*<sup>-/-</sup> マウスでの HFSC 減少の要因を明らかにする目的で、コントロールマウスと *Irf2*<sup>-/-</sup> マウス各々の HFSC をサンプルとしてマイクロアレイ解析を行った。得られたデータをもとに、GSEA を行ったところ、予想された通り、HFSC のレベルにおいても IFN- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  によって活性化する遺伝子群 (各 IFN- $\alpha$  signature, IFN- $\gamma$  signature, 図 1) が *Irf2*<sup>-/-</sup> マウス HFSC で統計学的有意に発現亢進していた。同時に、炎症応答を示す遺伝子群 (Inflammatory signature, 図 2) や、IL-6-JAK/Stat 経路に関わる遺伝子群 (IL6-JAK/Stat Pathway signature, 図 2) の発現が、同細胞で亢進しており、*Irf2*<sup>-/-</sup> マウスの HFSC が周囲の微小環境から様々な炎症・免疫因子の作用を受けていると考えられた。さらに重要な結果として、*Irf2*<sup>-/-</sup> マウス HFSC では、コントロールマウス HFSC に比べ、HFSC 特異的遺伝子群 (HFSC signature, 図 3) の発現が有意に低下し、これとは逆に毛包間表皮細胞に特徴的な遺伝子群 (IFE signature, 図 3) の発現が有意に亢進していることが判明した。以上の結果から、*Irf2*<sup>-/-</sup> マウスでは HFSC に対する炎症・免疫因子の刺激が、HFSC に“異常分化”をもたらし、結果として幹細胞性が低下していることが示唆された (図 4)。

さらに、上記の通り、*Irf2*<sup>-/-</sup> マウス HFSC の生体内での振る舞いをトレース可能なレポーターマウスを作製し同細胞の *in vivo* Lineage tracing 実験を行った (*Irf2*<sup>-/-</sup>:*K15*-CrePGR:*Rosa-lsl-LacZ* マウス)。コントロールマウスでは K15 陽性が抜毛刺激によって毛包細胞を生み出し、毛包が成長した (体毛が再生した) のに対し、*Irf2*<sup>-/-</sup>:*K15*-CrePGR:*Rosa-lsl-LacZ* マウスでは毛包細胞の生産や毛包の成長は極めて軽微

であり、一方で HFSC が表皮細胞を生み出していることが分かった。この結果は、GSEA の結果と相関し HFSC に“異常分化”が生じていることを示している。

## (2) 皮膚癌モデルの確立

上記、*Irf2*<sup>-/-</sup>マウスの HFSC の性状解析から IFN には HFSC の異常分化を誘導する作用があることが示唆された。従って、本作用を用い癌幹細胞の“幹細胞性”を低下させることができれば、既存の抗がん剤との併用によって癌幹細胞の駆逐が可能かもしれない。本研究では、癌の悪性度を反映し、より癌幹細胞の機能を *in vivo* で評価する上で有用なモデルとして DMBA 及び TPA をマウス背部に塗布することで誘導する皮膚癌モデルを選択した。しかしながら、既報のプロトコルを用いてモデルの樹立を試みているのにも関わらず、本研究期間内に評価可能な発癌モデルが確立できなかった。

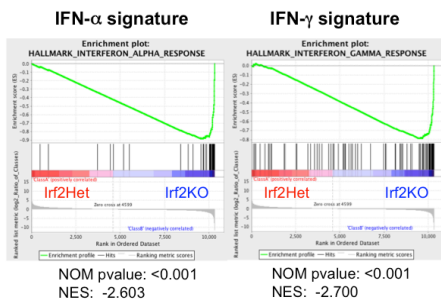


図1. *Irf2*<sup>-/-</sup>マウス及び *Irf2*<sup>Het</sup>マウス HFSC における IFN シグナル関連遺伝子群の発現比較 (GSEA)

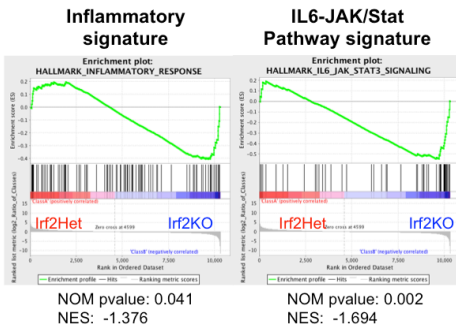


図2. *Irf2*<sup>-/-</sup>マウス及び *Irf2*<sup>Het</sup>マウス HFSC における炎症関連遺伝子群の発現比較 (GSEA)

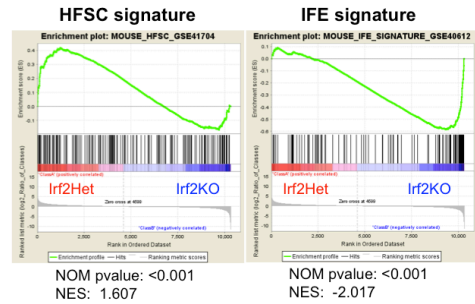


図3. *Irf2*<sup>Het</sup>マウス及び *Irf2*<sup>-/-</sup>マウス HFSC における HFSC 遺伝子群、表皮細胞遺伝子群の発現比較 (GSEA)

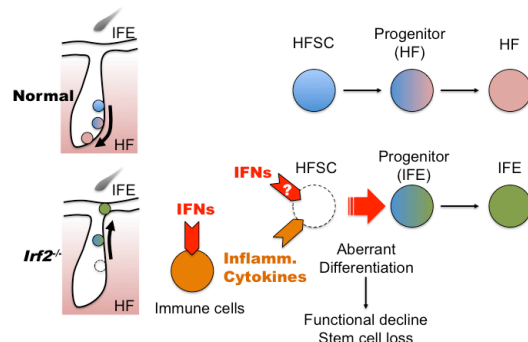


図4. *Irf2*<sup>-/-</sup>マウスの HFSC 減少メカニズム  
HF: Hair follicle, IFE: Interfollicular epidermis

## 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. Kobayashi H, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Karigane D, Haeno H, Yamamoto KN, Sato T, Ohteki T, Hayakawa Y, Barber GN, Kurokawa M, Suda T, Takubo K. Bacterial c-di-GMP affects hematopoietic stem/progenitors and their niches through STING. *Cell Rep.* 11:71. 2015. 査読有り. doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.066.

2. Nakanishi Y, Sato T, Ohteki T. Commensal Gram-positive bacteria initiates colitis by inducing monocyte/macrophage mobilization. *Mucosal Immunol.* 8:152. 2015 査読有り doi: 10.1038/mi.2014.53.

3. Ohyagi H, Onai N, Sato T, Yotsumoto S, Liu J, Akiba H, Yagita H, Atarashi K, Honda K, Roers A, Müller W, Kurabayashi K, Hosoi-Amaike M, Takahashi N, Hirokawa M, Matsushima K, Sawada K, Ohteki T. Monocyte-derived dendritic cells perform hemophagocytosis to fine-tune excessive immune responses. *Immunity.* 39:584. 2013. 査読有り doi: 10.1016/j.immuni.2013.06.019.

4. Sato T, Ikeda M, Yotsumoto S, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Fukuda T, Ohashi T, Suda T, Ohteki T. Novel interferon-based pre-transplantation conditioning in the treatment of a congenital metabolic disorder. *Blood*. 121:3267. 2013. 査読有り doi: 10.1182/blood-2012-07-443713.

[学会発表] (計 0 件)

[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  
該当無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 卓 (Satou Taku)  
東京医科歯科大学 難治疾患研究所  
非常勤講師  
研究者番号： 40375259

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：