

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22130008

研究課題名(和文)人工癌幹細胞ニッチの構築による癌幹細胞維持シグナルの解明と新規治療戦略の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular basis and therapeutic targets for cancer stem cells through establishing their synthetic niche mimics

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) 139,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラットC6グリオーマの癌幹細胞分画を用いたスクリーニングでウレタン系ポリマーPU10が同癌幹細胞のニッチ機能を有することを見出し、PU10結合性ニッチ分子として鉄運搬蛋白トランスフェリン(Tf)を同定した。C6癌幹細胞のマウス脳内移植で形成される腫瘍中のCD204陽性腫瘍随伴マクロファージ(TAM)に3価鉄の存在を確認した。データベース解析から、グリオーマにおけるTf受容体やCD204の発現と腫瘍の悪性度に正相関を見出した。同癌幹細胞集団が産生するGM-CSFがCD204陽性TAM分化に寄与することも示した。他の結果も総合して癌幹細胞はニッチを自ら構築し癌進展を図る生存戦略を持つと考察する。

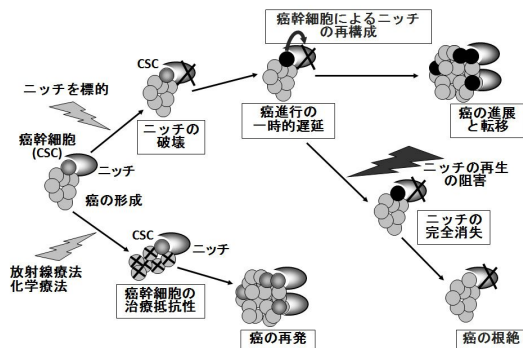
研究成果の概要(英文)：CSCs have been postulated as key drivers of cancer relapse and progression, and are supposed to be maintained under the specialized microenvironment called niche. To explore the niche mimicry for rat C6 glioma side population (SP) cells (recognized as CSCs), nearly 400 types of acrylate- and urethane-based synthetic polymers were examined. We found that urethane-based PU10 polymer exhibited the highest niche activity in supporting C6 CSCs. TOF/MS analysis of PU10-bound proteins identified an iron carrier transferrin (Tf). Iron is stored in tumor infiltrating CD204+ macrophages, whose protumoral activity is potently enhanced by CSC-secreted soluble factors. Supportively, the clinical data of 376 glioma patients obtained from NCI (USA) database revealed that expressions of Tf receptor and CD204 genes are found to be predictive of glioma patients' malignancies. Our findings will help elucidate the complex nature of the CSC niche and provide novel therapeutic targets to eradicate cancers.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：癌 癌幹細胞 グリオーマ ニッチ ポリマー マクロファージ TAM 鉄

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、癌の根絶につながるブレークスルーをさらに期待する社会的要請は高いままである。このような状況下で、「癌幹細胞」の概念、すなわち、治療抵抗性を有し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、癌の進展や再発および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大きな注目を集めた。そこで、癌幹細胞を標的とする腫瘍根絶技術の新構築を目指すため発足した新学術領域研究「癌幹細胞」では、癌幹細胞が正常幹細胞と同様に微小環境（癌幹細胞ニッチ）によって維持されているとの観点から、種（たね）としての癌幹細胞と、それに対応する土壌としての癌幹細胞ニッチの双方の視点で取り組むべきものとした（下図）。同領域の計画研究としての本研究



課題は研究開始当初から、それを着想した際の意義について、後者の視点すなわち癌幹細胞ニッチの視点からのアプローチに重きを置き、人工癌幹細胞ニッチの構築という独創性と新規性の高いストラテジーによってニッチシグナルの解明と治療戦略の開発に係るブレークスルーを得ることにした。

癌幹細胞ニッチの新規治療標的としての重要性は、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にある。研究代表者らはこれまで癌細胞株中における *in vivo* での癌再構築能力が著しく高い癌幹細胞集団を同定した (Kondo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 781-786, 2004)。また胚性幹(ES)細胞研究の第一人者、英国 Austin Smith 博士との共同で得た概念つまり、ES 細胞集団の微小環境が分化条件に傾くと集団の中に 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概念(Dani et al., Dev. Biol. 203: 149-162, 1998)に基づき、癌幹細胞集団の一部がニッチ階層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腫瘍再構築能を亢進させるという癌の利己的生存戦略が存在するという仮説(上図の上端部)の着想を得た。このような背景から本研究を開始した。

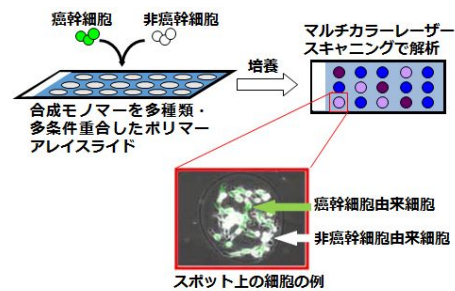
2. 研究の目的

癌の根絶における癌幹細胞の至適生存環境解明と治療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。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きたが、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、遺伝子発現プロファイリング等の従来方法がカバーできない新たなアプローチが必要とされる。そこで、癌幹細胞ニッチをミミックする擬態分子としてのポリマーを数百種類スポットしたアレイ上で癌幹細胞の維持あるいは集団拡大を評価することで、高効率の網羅的なアプローチを行い、このような人工癌幹細胞ニッチの観点から癌幹細胞維持シグナルの解明を行い新規治療戦略開発のための手がかりを得ることを目的として本研究は立案された。この探索によるアプローチは、ニッチを規定する構造が、糖鎖付加、リン酸化、切断など種々の修飾や複数分子の組み合わせの産物である場合にもニッチ分子の特質をカバー可能であると考えた。研究代表者がこれまで蓄積した癌幹細胞の特性研究や幹細胞自己複製シグナルの研究成果を発展させることで目標達成が可能なレベルにあると考えた。

3. 研究の方法

(1)ポリマーアレイ解析:

研究代表者が海外共同研究者と取り組んで来た、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での人工ニッチ探索システム(下図)は、造腫瘍活性



の高い癌幹細胞分画とそうでない分画(同じ癌細胞集団に由来)のアレイスライド上での細胞培養と、培養後の細胞動態を評価するための網羅的レーザー・スキャニング解析からなる。ヒットポリマーを特定した場合は、中規模化学合成により、詳細な展開研究を行った。

(2)免疫不全マウスへの移植と腫瘍サイズの定量:

ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだラット C6 グリオーマ細胞に由来する癌幹細胞あるいは対照細胞を、NOD/SCID (NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J)マウスの右脳線条体に移植し、経時的に *in vivo* imaging system

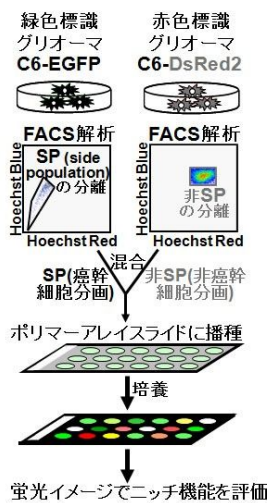
(IVIS)により生物発光量を定量した。
 (3)癌幹細胞ニッチポリマーに結合する蛋白質の同定：

癌幹細胞ニッチ機能を有するものとして特定したポリマーに結合した蛋白質をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、銀染色で認められるバンドを切り出し、脱色およびトリプシン部分分解処理したものを、質量分析システムにより分子の同定を行った。

4. 研究成果

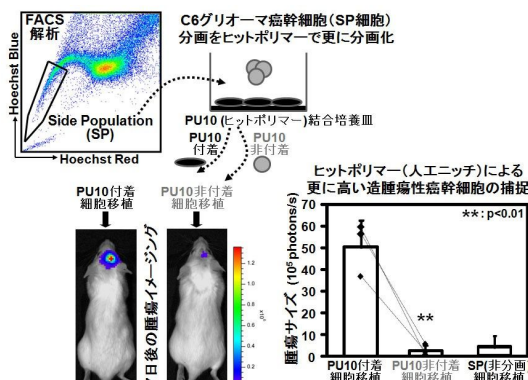
(1)癌幹細胞に対するニッチ機能を有する合成ポリマーのスクリーニングとヒットポリマーの特定：

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での人工ニッチ探索システムを用いて、研究代表者らが以前明らかにしたラットグリオーマ細胞株 C6 中の Hoechst 33342 色素による染色性の低い癌幹細胞「side population (SP)細胞」を特異的に維持または増殖させることができるニッチ機能を持つポリマーの網羅的探索を、上図のように行った。その結果、C6 グリオーマ癌幹細胞 (SP 細胞) のニッチ機能を有するポリウレタン系のポリマーPU10 をヒットポリマーとして特定することができた。



(2) ヒットポリマーPU10 の癌幹細胞ニッチ特性の解析：

ヒットポリマーPU10 を中規模合成してコートした培養皿上に C6 グリオーマ SP 細胞を、播種・培養したところ、付着 (Ad) と非付着 (NAd) の 2 群に分けられた (下図上部)。それぞれの細胞を NOD/SCID マウスの脳内移植で造腫瘍活性を検討したところ、PU10 付着細胞は速やかに腫瘍を形成した (下図下部)。この結果は、PU10 ポリマーがラット C6 グリオーマ幹細胞のニッチ機能を有していることを示している。またこれらの結果は、C6 グ



リオーマ細胞のうちこれまでに癌幹細胞集団とされた SP 細胞集団中に、更に腫瘍再構築能の高い細胞が存在することを示すとともに、合成ポリマーを用いた本研究のアプローチが今後、癌幹細胞のニッチの特性解明と治療標的の同定および治療戦略の策定に有効であることを意味する。

(3) 癌幹細胞ニッチ機能を有するポリマーPU10 に結合する蛋白質の同定：

PU10 に結合する蛋白質をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、銀染色で認められるバンドを切り出し、脱色およびトリプシン部分分解処理したものを、国立がん研究センター研究所との共同研究により質量分析したところ、鉄運搬分子として知られる transferrin (Tf) がニッチ候補分子として同定された。

(4) 癌幹細胞ニッチ機能を有するポリマーPU10 に結合する Tf の意義に関する解析：

ラット C6 グリオーマ癌幹細胞 (SP 細胞) をマウス脳内に移植して形成される腫瘍組織を鉄染色したところ、CD204 陽性の腫瘍随伴マクロファージ (tumor-associated macrophage, TAM) において 3 価鉄 (貯蔵鉄) の存在が確認され、癌の進展における鉄貯蔵 TAM の関与が示唆された。米国 National Cancer Institute より公開されているグリオーマ患者 376 例の癌部遺伝子発現データベースの解析からも、Tf 受容体や CD204 の発現と予後を含む腫瘍の悪性度との間に正相関が確認された。

また、SP 細胞と MP 細胞に発現する遺伝子について cDNA マイクロアレイ解析を行ったところ、単球の動員やマクロファージ前駆細胞の増殖およびマクロファージ分化を担う CCL2、CXCL12、GM-CSF などの遺伝子発現が、SP 細胞において亢進しており、癌幹細胞自身が TAM の発生を制御する作用を持つと考察された。癌幹細胞は腫瘍内にニッチを自ら構築し利用する巧みな生存戦略をとるものと推察できる。

グリオーマ幹細胞集団から産生される、マクロファージ分化を担う GM-CSF の遺伝子発現亢進の癌病態における意義について、さらに抗 GM-CSF 中和抗体を用いた解析を行い、癌幹細胞集団が産生する GM-CSF が確かに CD204 陽性 TAM の分化誘導に関与することを示した。

(5) 癌幹細胞と TAM との相互作用に関するデータベースを用いた解析：

癌幹細胞は腫瘍内に巧みにニッチを構築し、その微小環境を利用して癌の進展に寄与させる生存戦略をとるものと推察する。腫瘍内の TAM の存在が古くから知られているが、本研究では、米国 National Cancer Institute より公開されているグリオーマ患者 376 例の癌部遺伝子発現データベースの解析から、TAM マーカー-CD68 および CD204 の発現と腫瘍の悪性度との正相関を確認した。

(6) 癌幹細胞と TAM との相互作用に関する in

vitro 培養および in vivo 移植実験による解析：

マウス骨髄由来単球を in vitro で培養する際に、ラット C6 グリオーマ癌幹細胞 (SP 細胞) 培養上清を添加して培養した群と、非癌幹細胞 (main population, MP 細胞) 培養上清を添加して培養した群を準備し、前者を、SP 細胞で教育された機能的に造腫瘍活性に寄与するマクロファージではないかとの仮説を立てた。NOD/SCID マウスの脳内に C6 癌幹細胞 (SP 細胞) を移植する際に、SP 細胞で教育したマクロファージを共移植すると、MP 細胞で培養した対照マクロファージとの共移植に比べて、強い腫瘍形成をもたらした。以上の結果から、癌幹細胞は効率的に単球からマクロファージへの増殖・分化を促し、誘導されたマクロファージは TAM 様の働きで腫瘍の進展を促すという利己的な癌幹細胞ニッチ構築の仕組みを持つと考察した。

(7) 癌幹細胞における鉄代謝の意義に関する解析：

癌幹細胞ニッチポリマー PU10 に結合する分子として Tf が同定されたことから、これに関連して癌幹細胞と鉄代謝との関係について解析を進めた。アミノレブリン酸 (5-ALA) から種々の中間体を経て PpIX が合成され鉄が配位され Heme となる。5-ALA はその代謝産物であるプロトポルフィリン IX (PpIX) の腫瘍選択的蓄積性から、脳腫瘍の術中診断および光線力学療法 (PDT) 薬として国内外で広く臨床適用されている。東京工業大学との共同研究により、グリオーマの幹細胞集団は非幹細胞集団に比べて PpIX 含有量が低いことがわかった。グリオーマの術中検出や光線力学療法に 5-ALA からの PpIX 合成系が利用されるためこの知見の意義は大きく、治療成績向上に向けた展開研究を実施中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

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, in press. 査読有

Anani M, Nobuhisa I, Osawa M, Iwama A, Harada K, Saito K, Taga T. Sox17 as a candidate regulator of myeloid restricted differentiation potential. Development, Growth & Differentiation, 2014 Aug;56(6):469-79, 2014. 査読有 doi: 10.1111/dgd.12147.

Nobuhisa I, Osawa M, Uemura M, Kishikawa Y, Anani M, Harada K, Takagi

H, Saito K, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Iwama A, Taga T. Sox17-mediated maintenance of fetal intra-aortic hematopoietic cell clusters. Molecular and Cellular Biology, 34(11):1976-90, 2014. 査読有 doi: 10.1128/MCB.01485-13

Bizen N, Inoue T, Shimizu T, Tabu K, Kagawa T, Taga T. A growth-promoting signaling component cyclin D1 in neural stem cells has antiastrogliogenic function to execute self-renewal. Stem Cells, 32:1602-1615, 2014. 査読有 doi: 10.1002/stem.1613.

Kusunoki S, Kato K, Tabu K, Inagaki T, Okabe H, Kaneda H, Suga S, Terao Y, Taga T, Takeda S. The inhibitory effect of salinomycin on the proliferation, migration and invasion of human endometrial cancer stem-like cells. Gynecologic Oncology, 129:598-605, 2013 査読有 doi: 10.1016/j.ygyno.2013.03.005

Tabu K, Bizen N, Taga T, and Tanaka S. Gene Regulation of Prominin-1 (CD133) in Normal and Cancerous Tissues. Advances in Experimental Medicine and Biology, 777, 73-85, 2013. 査読有 doi: 10.1007/978-1-4614-5894-4_5.

備前典久、田賀哲也 . サイトカインのすべて：増殖因子 LIF . 臨床免疫・アレルギー科 (Clinical Immunology & Allergy), 57, 545-552, 2012. 査読無

Nobuhisa I, Yamasaki S, Ramadan A, and Taga T. CD45 low c-Kit high cells have hematopoietic properties in the mouse aorta-gonad-mesonephros region. Experimental Cell Research, 318, 705-715, 2012. 査読有 doi: 10.1016/j.yexcr.2012.01.017.

鹿川哲史、備前典久、田賀哲也 . アストロサイトの発生・分化 . Clinical Neuroscience, 29, 1239-1242, 2011. 査読無

Yamasaki S, Nobuhisa I, Ramadan A, and Taga T. Identification of a yolk sac cell population with hematopoietic activity in view of CD45/ c-Kit expression. Development Growth & Differentiation, 53, 870-877, 2011. 査読有 doi:

10.1111/j.1440-169X.2011.01293.x.

鹿川哲史、田賀哲也 . Wnt・FGF・Notch シグナル相互作用による神経幹細胞自己複製の制御機構 . 医学のあゆみ, 233, 1031-1036, 2010. 査読無

Ramadan A, Nobuhisa I, Yamasaki S, Nakagata N, and Taga T. Cells with hematopoietic activity in the mouse placenta reside in side population. *Genes to Cells*, 15, 983-994, 2010. 査読有

doi:

10.1111/j.1365-2443.2010.01432.x.

Yoshinaga Y, Kagawa T, Shimizu T, Inoue T, Takada S, Kuratsu J, and Taga T. Wnt3a promotes hippocampal neurogenesis by shortening cell cycle duration of neural progenitor cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30, 1049-1058, 2010. 査読有

doi: 10.1007/s10571-010-9536-6.

Inoue T, Kagawa T, Inoue-Mochita M, Isono K, Ohtsu N, Nobuhisa I, Fukushima M, Tanihara H, and Taga T. Involvement of the HIPK family in regulation of eyeball size, lens formation and retinal morphogenesis. *FEBS Letters*, 584, 3233-3238, 2010. 査読有

doi: 10.1016/j.febslet.2010.06.020.

[学会発表](計55件)

(以下は研究代表者の招待講演の一部抜粋)

田賀哲也、榎康一、備前典久. 人工ニッチ構築による幹細胞分化制御ニッチの分子基盤解明へのアプローチ 第35回日本炎症・再生医学会、万国津梁館、沖縄 2014年7月1-4日

Tetsuya Taga and Kouichi Tabu. Characterization of C6 glioma cancer stem cell niche by using synthetic polymers for the development of therapeutic strategies. 2014 Seoul National University CRI Cancer Symposium. Mokpo, Korea. April 16-19, 2014.

Tetsuya Taga. Glioma stem cell survival strategy in view of niche involving immune/inflammatory cells. 11th World Congress on Inflammation, Natal, Brazil. September 21-25, 2013.

Tetsuya Taga, Kouichi Tabu, and Nozomi Muramatsu. Understanding of

cancer stem cell niche for the development of novel therapeutic strategies. Seoul National University CRI Cancer Symposium. Seoul, Korea. May 2-4, 2013.

Tetsuya Taga, Kouichi Tabu, Norihisa Bizen, and Nozomi Muramatsu. Multi-disciplinary approaches towards understanding cancer stem cell (CSC) self-renewal strategies: CSC niches as therapeutic targets. 2012 Seoul National University CRI Cancer Symposium: Innovative Approaches to Explore Novel Druggable Targets. Seoul, Korea. May 16-18, 2012.

田賀哲也、癌幹細胞の自己複製戦略. 第56回日本人類遺伝学会 シンポジウム、幕張メッセ、千葉市 2011年11月11日

田賀哲也、神経幹細胞の分化制御シグナル. 第96回医工学フォーラム、京都大学、京都市 2011年7月22日

田賀哲也、幹細胞維持機構の考察による癌の生存戦略解明へのアプローチ. 第316回情報計算化学生物学会研究講演会「がん研究とがん治療薬の最前線」日本化学会化学会館、東京都 2011年4月18日

Tetsuya Taga. Signaling and neural stem cell. 3rd Latin America Course and Workshop, Embryonic Stem Cells as a Model System for Embryonic Development. Cuernavaca, Mexico. February 27-March 10, 2011.

Tetsuya Taga. Cross-interactions among cell-external cues and cell-intrinsic programs controlling brain development. The 33rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Symposium on Epigenetic regulation in development and differentiation. Kobe International Conference Center, Kobe, December 7, 2010.

Norihisa Bizen, Takeshi Shimizu, Toshihiro Inoue, Tetsushi Kagawa, and Tetsuya Taga. Cross-talk between growth and differentiation pathways in cell fate determination in the developing brain. The 16th International Conference of the International Society of

Differentiation. Nara-Ken New Public Hall, Nara. November 15-18, 2011.

Tetsuya Taga. Neural Stem Cell Fate Determination and Molecular Basis of Neural Stem Cell Self-Renewal. International Symposium on Stem Cells, Organogenesis, and Regeneration in Fayoum. Fayoum, Egypt. October 27-29, 2010.

梶康一、備前典久、清水健史、鹿川哲史、田賀哲也、幹細胞の自己複製戦略の考察による癌細胞制御へのアプローチ。第19回癌病態治療研究会「幹細胞研究の癌治療戦略への応用」シンポジウム、東京ステーションコンファレンス、東京都、2010年6月30日-7月1日

〔図書〕(計5件)

備前典久、鹿川哲史、田賀哲也。脳神経系の再生医学-発生・再生の融合的新展開-。診断と治療社、pp. 28-33, 2015.

田賀哲也。カンデル神経科学。メディカル・サイエンス・インターナショナル、pp. 1160-1181, 2014.

田賀哲也、梶康一、備前典久。ものづくりから考察する幹細胞の居心地 「ものづくり技術からみる再生医療 -細胞研究・創薬・治療-」 田畑泰彦編、分担執筆 シーエムシー出版、pp. 18-24, 2011.

Tabu K, Taga T, and Tanaka S. Tumor stem cells: CD133 gene regulation and tumor stemness. In Stem Cells and Cancer Stem Cells. Vol. 2, Part 2. Springer. pp. 145-153, 2011.

Tabu K, Taga T, and Tanaka S. Glioma stem cells. In Molecular targets of CNS tumors. Garami M ed. InTech. pp. 151-176, 2011.

〔その他〕

ホームページ等

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

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

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)連携研究者

鹿川 哲史 (KAGAWA, Tetsushi)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
研究者番号：50270484

信久 幾夫 (NOBUHISA, Ikuo)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
研究者番号：40332879

梶 康一 (TABU, Kouichi)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任助教
研究者番号：10466469
(平成25-26年度に連携研究者)