

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07156

研究課題名(和文) 癌幹細胞によるニッチ構築の分子細胞基盤とその制御 - 鉄欠乏応答からのアプローチ

研究課題名(英文) Elucidation of molecular and cellular basis for niche development toward cancer stem cell regulation

研究代表者

楠 康一 (Tabu, Kouichi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：10466469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は神経膠腫(グリオーマ)を対象にがん幹細胞とその微小環境(ニッチ)を標的とする新しい治療法の開発を目指して、基礎的知見の集積を目指した。(1)グリオーマがん幹細胞の一部が自発的な細胞死を介して微小環境の形成を担うことを明らかにした。(2)そのようなニッチ構築がん幹細胞がグリオーマの第一選択薬テモゾロミド処理時に高く濃縮される重要な治療標的であることを示した。(3)ニッチ構築がん幹細胞に機能性の高分子化合物(ポリマー)を同定した。これらは新たながん根絶技術の開発へと道を拓く有益な成果と考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん微小環境(ニッチ)を構成する分子・細胞要素は極めて多岐に渡ることから、それらの包括的な理解と制御は未だ達成されていない。本研究におけるニッチ構築がん幹細胞の同定は、がん微小環境の全容解明を飛躍的に促す足掛かりとなる成果であり、高い学術的意義を有する。また、従来の低分子抗がん剤に耐性の高いがん幹細胞に対し機能性のポリマーを同定できたことは新たながん根絶技術の開発を期待できる成果であり、大きな社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：This study was carried out with the aim of developing the therapies targeting cancer stem cells (CSCs) and their microenvironments (niche). We have revealed that a subpopulation of CSCs has the comprehensive role for constructing niche and that such niche-constructing CSCs (ncCSCs) are dramatically enriched after the treatment of anti-glioma drug Temozolomide. We also identified some biomimetic polymer compounds that promote or inhibit the expansion of ncCSCs. Our findings could help develop new therapeutics for CSCs/niche intervention, potentially leading to cancer eradication.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん幹細胞 微小環境 ニッチ 治療抵抗性 再発 ポリマー 高分子 亜集団

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) がん進展に重要な役割を果たす微小環境は、内皮細胞・周皮細胞などの血管構成細胞や単球・マクロファージ(M₁)・T/Bリンパ球・樹状細胞(DC)などの免疫担当細胞が複雑に混在した中から構成されており、その形成機構の全容は未だ解明されていなかった。

(2) 腫瘍内に新生する血管内皮細胞の一部ががん幹細胞自身に由来することや、腫瘍内に浸潤する腫瘍随伴マクロファージ(tumor-associated M₂; TAM)ががん幹細胞に由来する液性因子により分化誘導されることが分かっていたが、そのような微小環境形成を担うがん幹細胞亜集団の分離および可視化は達成されていなかった。

(3) がん幹細胞は従来の細胞浸透性の低分子抗がん剤に耐性の高い再発源であることから、その増殖・生存を人為的に制御する新規技術の開発が喫緊の課題とされていた。

2. 研究の目的

本研究は微小環境の新たな形成機構の解明を目的として、がん幹細胞中に見出した自発的細胞死の観点から死細胞のTAM誘導における役割について、基礎的知見の蓄積を目指した。また、がん幹細胞内に複数の微小環境要素の形成を担う発生源(ニッチ構築がん幹細胞)が存在するとの仮説を検証するため、その分離マーカーの同定による可視化と性状解析を進めた。さらに、がん幹細胞を標的とする新たな根絶技術の開発を目的として、ニッチ構築がん幹細胞に機能性的高分子化合物(ポリマー)を探索した。

3. 研究の方法

(1) ラット神経膠腫(グリオーマ)細胞株C6、および2つの膠芽腫患者由来細胞(PDC)株GBM#12137、GBM#10135を用いて、がん幹細胞および非がん幹細胞の濃縮培養を行い、PI染色とFACS解析により死細胞画分を分離した。透過型電子顕微鏡や蛍光プローブを用いて死細胞の形態学的・生化学的特性を解析した。GM-CSFで分化誘導した骨髄由来単球の初代培養にがん幹細胞由来の死細胞を添加し、TAM誘導に対する影響を検証した。死細胞添加後のM₁およびM₂マーカー遺伝子の発現を検証し、死細胞により教育されたM₂の特性を解析した。

(2) 独自のがん幹細胞のcDNAマイクロアレイ解析データとGliovis解析ツール(文献)より取得した膠芽腫患者の遺伝子発現データを用いて、膠芽腫の悪性度を予測するためのがん幹細胞特異的遺伝子群を抽出した。さらにCIBERSORT(文献)を用いた解析により、複数の免疫細胞の制御と相関をもつニッチ構築がん幹細胞のマーカーを特定した。蛍光レポーター細胞をゲノム編集により作製し、ニッチ構築がん幹細胞の分離と性状解析を行った。

(3) エジンバラ大学との国際共同研究で、ポリマー-microarray解析を実施し、ニッチ構築がん幹細胞に維持・死滅をもたらす機能性的高分子化合物(ポリマー)を探索した。

4. 研究成果

(1) 膠芽腫に生成するオートスキジス様自発的ネクローシス細胞死の発見: C6細胞株の通常培養系において、PI(+)/FSC(low)の死細胞画分が自発的に産生されていることを見出した。透過型電子顕微鏡を用いた形態学的解析の結果、PI(+)/FSC(low)の死細胞は細胞膜の崩壊・メッシュ状の細胞質などのネクローシス様の特徴と、細胞質の断片化・正常な核膜・クロマチンの核膜辺縁への濃縮などのアポトーシス様の特徴を併せ持つ形態を呈していた(図1)。これらの特徴はautoschizis(オートスキジス、自己割裂)と呼ばれるネクローシスの定義に一致していたが、オートスキジスはがん細胞をVitamin CおよびK3で処理した際に観察される細胞死として知られていた(文献)。そこでDNA含有量・活性型caspase-3の発現・ミトコンドリア膜電位などの生化学的特性を検証したところ、核溶解(karyolysis)とオルガネラの消失を伴う非アポトーシス性の細胞死であることが立証され、これをオートスキジス様産物(autoschizis-like products; ALPs)と命名した。ALPsは膠芽腫PDCおよびマウス脳内移植腫瘍組織にも検出されたことから、オートスキジス様ネクローシスは膠芽腫細胞に自然発生する普遍的な細胞死であると考えられた。

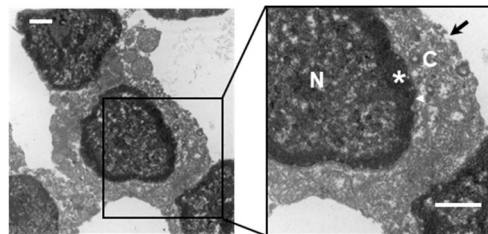


図1 C6グリオーマ細胞中に見出されたオートスキジス様自発的ネクローシス細胞死産物の透過型電子顕微鏡画像。N: スポンジ状の核、C: メッシュ状の細胞質、*: 核膜辺縁へのクロマチンの濃縮、矢印: 崩壊した細胞膜、Scale bars=1 μ m。

(2) がん幹細胞由来ALPsによるTAMの誘導: 生体内において死細胞はM₂やDCにより貪食排除されることから、ALPsのTAM誘導への影響を検証した。がん幹細胞および非がん幹細胞より産生されたALPsのAnnexin-V染色を行ったところ、何れのALPsにも高いphosphatidylserine(PS)の発現が確認され、がん細胞とM₂/DCとの間に死細胞貪食を介する相

相互作用が想定された。そこでマウス骨髄より単球を調整し GM-CSF を用いて M /DC を誘導した後、培養液中に PKH67 でラベルした ALPs を添加した。添加 2 時間後から M による ALPs の貪食が確認され、貪食した M の大部分は膠芽腫における TAM マーカー CD204 および CD11c を発現していることが確認された。しかし、24 時間後における ALPs 貪食 TAM の割合は、がん幹細胞由来の ALPs と非がん幹細胞由来の ALPs との間で同等であった。そこで、添加 96 時間後までの長期培養を行い、ALPs が TAM の生存に及ぼす影響を検証したところ、がん幹細胞由来の ALPs を添加した場合には、CD204(+)/CD11c(+)/TAM の絶対的な生存数が増加することが明らかとなった。以上の結果から、がん幹細胞はオートスキジス様細胞死を介して TAM の発生を促すことが示された。

(3) 膠芽腫の再発に寄与する M1 型 TAM の発見 :

ALPs により誘導された TAM の性状を解析するため、抗腫瘍性の M1-M および腫瘍促進性の M2-M の典型的なマーカーの発現を検証したところ、ALPs 添加時には M1 マーカーのひとつである IL12b 遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった。IL12b 遺伝子は T 細胞の活性化などに関わるサイトカイン IL12/IL23 の共通サブユニットをコードする遺伝子であることから、ALPs 誘導性の TAM は M1 型の M と考えられた。一方、膠芽腫患者の再発例において、IL12/IL23 の発現は患者の予後と有意な相関を示し (図 2) さらに膠芽腫 PDC 株の培養系への IL12 組換えタンパク質の添加は、がん幹細胞によるスフィア形成能を有意に促進した。さらに in silico の解析において、膠芽腫患者検体における各種免疫細胞の浸潤度と各種 TAM マーカー CD68・CD163・CD204・CD206・CD11c の発現量との相関を検討したところ、これら既知の TAM マーカー群は初発例において M2-M の浸潤度と高い相関を示したのに対し、再発例においては M0・M1・M2 型全ての M の浸潤レベルと広く高い相関を示した。さらに IL12/IL23 の発現は、再発例においてのみ TAM マーカー群およびヒトがん幹細胞マーカー CD133 の発現と高い相関を示した。最後に膠芽腫再発患者を M1-M を高く含む群・M2-M を高く含む群・両タイプの M を含まない群に分類して予後との相関を検証したところ、従来抗腫瘍性と考えられていた M1-M を高く含む群で最も予後の悪いことが明らかとなった。以上の結果は、膠芽腫では再発時に微小環境の再構築が起きている可能性を示唆している。M1/M2-M などの既存の生物学的概念の多くは外科的に摘出された初発例から得られた知見に基づいていると考えられ、がん幹細胞の強い関与が示唆される再発例に対しては既存の概念に囚われないより慎重な検証が必要と考えられた。

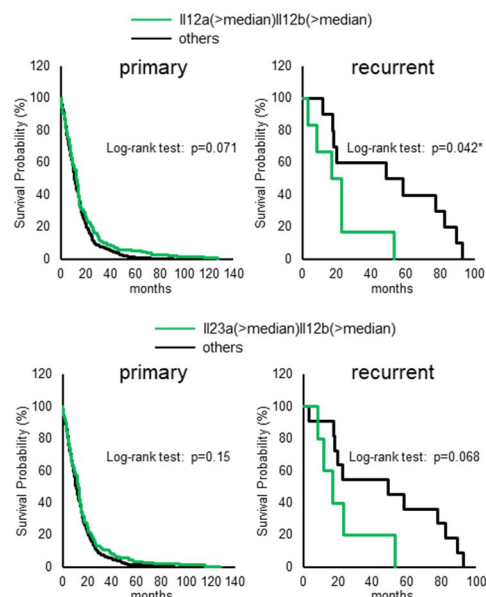


図2 膠芽腫の初発患者497例、および再発患者16例におけるIL12およびIL23の発現と予後との相関。

(4) ニッチ構築がん幹細胞の分離と制御性化合物の同定

上記がん幹細胞死を介する TAM 誘導は、がん幹細胞内に微小環境形成を担う亜集団とがん進展に関わる亜集団の棲み分けが存在することを示唆する重要な結果であった。そこでがん幹細胞内に存在するニッチ構築亜集団を分離するため、膠芽腫患者検体における各種免疫細胞の浸潤度と相関を示すがん幹細胞特異的マーカーを探索した。単球・M の高い浸潤レベル、およびリンパ球と DC の低い浸潤レベルと相関を示すがん幹細胞マーカーとしてケモカイン CCL2 分子を同定した。ゲノム編集により CCL2 遺伝子の蛍光レポーター細胞 (可視化モデル) を作製し、CCL2 陽性細胞ががん幹細胞の一部を占めること、グリオーマの第一選択薬テモゾロミド処理時に濃縮される重要な再発源であることが明らかとなった。さらにこのようなニッチ構築がん幹細胞を制御する化合物を同定するため、エジンバラ大学との国際共同研究によりポリマー microarray 解析を実施し、機能性のポリマーを探索した。数百種類のポリマーの中から、ニッチ構築がん幹細胞に維持・死滅をもたらすポリマーを複数同定した。これらは従来の低分子抗がん剤に耐性の高いがん幹細胞の制御を達成するためのブレークスルーとして、今後の治療法開発への道を拓く意義の高い成果である。

< 引用文献 >

- Bowman R et al. Gliovis data portal for visualization and analysis of brain tumor expression datasets. Neuro-Oncology, Vol.19, No.1, 2017, pp139-141.
- Newman AM et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. Nat Methods, Vol.12, No.5, 2015, pp453-457.
- Gilloteaux J et al. Scanning electron microscopy and transmission electron microscopy aspects of synergistic antitumor activity of vitamin C-vitamin K3 combinations against human prostatic carcinoma cells. Scanning Microsc, Vol.9, No.1, 1995, pp159-173.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tabu K, Liu W, Kosaku A, Terashima K, Murota Y, Aimaitijiang A, Nobuhisa I, Hide T and Taga T	4. 巻
2. 論文標題 Glioma stem cell (GSC)-derived autoschizis-like products confer GSC niche properties involving M1-like tumor-associated macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.3193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 榎康一、田賀哲也	4. 巻 273
2. 論文標題 合成ポリマーを用いたがん幹細胞ニッチの解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 週刊医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 474-479
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tabu K, Zhang S, Kosaku A, Venkateswaran S, Kohsaka S, Bradley M, Taga T
2. 発表標題 Synthetic polymer-based stratification of soft tissue sarcomas with different gene alterations and cells of origin
3. 学会等名 11th World Biomaterials Congress (WBC2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎康一, Liu Wenyu, 田賀哲也
2. 発表標題 A self-expanding strategy of glioma stem cells via promoting the development of M1-like tumor-associated macrophages
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠康一, 田賀哲也
2. 発表標題 Visualiziation and validation of monocyte-recruiting cells as a potential target of glioma stem cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aimaitijiang Alapati, 楠康一, 田賀哲也
2. 発表標題 Glioma stem cells modulate erythropoiesis in mouse bone marrow
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠康一, Liu Wenyu, 秀拓一郎, 田賀哲也
2. 発表標題 Autoschizis-like spontaneous necrosis mediates a self-expanding strategy of glioma stem cells by modulating tumor-associated macrophages
3. 学会等名 第17回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aimaitijiang Alapati, 楠康一, Wang Wenqian, 信久幾夫, 田賀哲也
2. 発表標題 Enhanced erythropoiesis in bone marrow of C6 glioma-bearing mice
3. 学会等名 第17回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taga T and Tabu K
2. 発表標題 Development of Treatment Strategies Targeting Cancer Stem Cells
3. 学会等名 The 3rd Meeting of International Society of Precision Cancer Medicine Annual Meeting 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tabu K and Taga T
2. 発表標題 A monocyte-recruiting phenotype defines functional heterogeneity of glioma cells with stemness and chemoresistance
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tabu K and Taga T
2. 発表標題 Identification of a subpopulation of glioma cells with a potential for tumor niche development involving myeloid cells
3. 学会等名 第16回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎康一、巽瑠璃子、田賀哲也
2. 発表標題 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
3. 学会等名 Consortium of Biological Sciences 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 室田吉貴、Sara Schmidt、楠康一、伊藤浩光、田中真二、Mark Bradley、田賀哲也
2. 発表標題 脳腫瘍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
3. 学会等名 Consortium of Biological Sciences 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松永浩明、楠康一、田賀哲也
2. 発表標題 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
3. 学会等名 Consortium of Biological Sciences 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tabu K, Wang W, Murota Y and Taga T
2. 発表標題 Self-expanding strategies of glioma stem cells that involves macrophages to adapt to iron-deprivation stress
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Murota Y, Wenqing GY, Tabu K, and Taga T
2. 発表標題 Establishment of glioma mouse model by transducing oncogenic H-RasV12 gene into the p53 deficient astrocytes
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田賀哲也、楠康一
2. 発表標題 神経膠腫癌幹細胞の利己的生存戦略による癌の進展
3. 学会等名 第38回日本 炎症・再生医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Murota Y, Schmidt S, Tabu K, Ito H, Tanaka S, Bradley M and Taga T
2. 発表標題 Screening for human pancreatic cancer stem cell niche mimicry by using synthetic polymer microarrays
3. 学会等名 第15回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 楠康一、田賀哲也	4. 発行年 2017年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 7
3. 書名 次世代がん治療 発症・転移・再発メカニズム「がん幹細胞によるがん進展メカニズム」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科歯科大学難治疾患研究所幹細胞制御分野ホームページ http://www.tmd.ac.jp/mri/scr/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	田賀 哲也 (Taga Tetsuya) (40192629)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授 (12602)	
研究協力者	秀 拓一郎 (Hide Takuichiro) (40421820)	北里大学・医学部・准教授 (32607)	
研究協力者	ブラッドレイ マーク (Bradley Mark)	エディンバラ大学・School of Chemistry・Professor	