

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19790241

研究課題名（和文） 癌幹細胞を標的とした癌化学療法の探索

研究課題名（英文） Investigation of the targeted therapy for cancer stem cells.

研究代表者

片山 量平 (KATAYAMA RYOHEI)

財団法人癌研究会・癌化学療法センター・基礎研究部・研究員

研究者番号：60435542

研究成果の概要：各種培養細胞株中に SP 細胞が存在することを発見し、それらが、がん幹細胞様の性質（自己複製能、高い造腫瘍性、治療抵抗性）を有することを確認した。薬剤抵抗性の SP 細胞を抗がん剤感受性化させるために、我々のグループがこれまで、抗がん剤多剤耐性克服薬として臨床試験を行ってきた、ABC トランスポーター阻害剤を併用したところ、SP 細胞由来の腫瘍にも顕著な腫瘍縮小効果が得られた。さらに SP 細胞と nonSP 細胞を比較し、発現解析を行った結果、SP 細胞に共通して過剰発現する蛋白質および、microRNA を同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：がん幹細胞、ABC トランスポーター、抗がん剤耐性

1. 研究開始当初の背景

近年になって腫瘍組織中にもがん幹細胞と呼ばれる幹細胞様細胞が存在することが示されてきた。がん幹細胞は増殖が遅いことや、薬剤排出たんぱく質（ABC トランスポーターなど）の発現上昇といった機構により抗がん剤が効きにくくなっていると考えられており、がんの再発、転移を担う細胞集団であると考えられている。従って、がん幹細胞を標的とした化学療法の開発は再発のリスクを抑えたより効果的な治療法となる可能

性がある。そこで、がん幹細胞の性状解析を行い、標的となりうる分子を探索することが治療薬開発に向けて非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究ではがん幹細胞の性状解析を行い、新しいがん治療のターゲットを探索することで、再発のないより効果的ながん化学療法を見出すことを目標とする。そのために本研究では、がん幹細胞と分化したがん細胞の違いをまず1つはトランスポーターに焦点をあ

て解析し、新しいがん治療の標的分子を見つけることを目的とする。また同時に、がん幹細胞とその他のがん細胞の差異を探索し、新たながん治療の標的となる分子、シグナル伝達経路を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

がん幹細胞を濃縮するために各種培養細胞を、DNA 結合蛍光色素 Hoechst33342 を用いて細胞を染色し、フローサイトメトリーにより蛍光強度の低い Side Population (SP) 細胞を分離する。分離した細胞を用いて、自己複製能力、抗がん剤感受性、造腫瘍性等の検討をする。

さらに、分離した SP 細胞、nonSP 細胞から mRNA を分離して、定量 RT-PCR 法にて ABC トランスポーターの発現量を調べる。また、cDNA マイクロアレイを用いて SP 細胞特徴的な遺伝子発現パターンを探索する。

4. 研究成果

各種培養細胞株中に SP 細胞が存在することを発見し (図 1、四角く囲った部分)、それらが、がん幹細胞様の性質 (自己複製能、高い造腫瘍性) を有することを確認した。

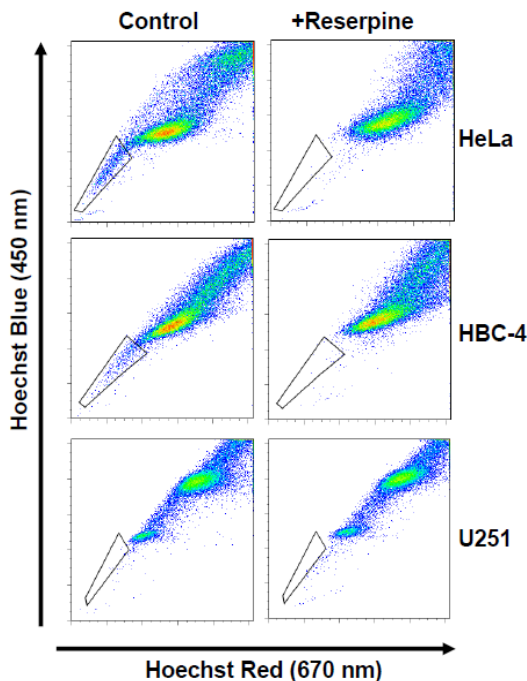


図1: 各種癌細胞株中にSP細胞 (四角囲い) が存在する

そこで、SP 細胞および nonSP 細胞を免疫不全マウスに移植し、抗がん剤での治療実験を行った結果、SP 細胞由来の腫瘍の方が治療抵

抗性を示した (図 2)。

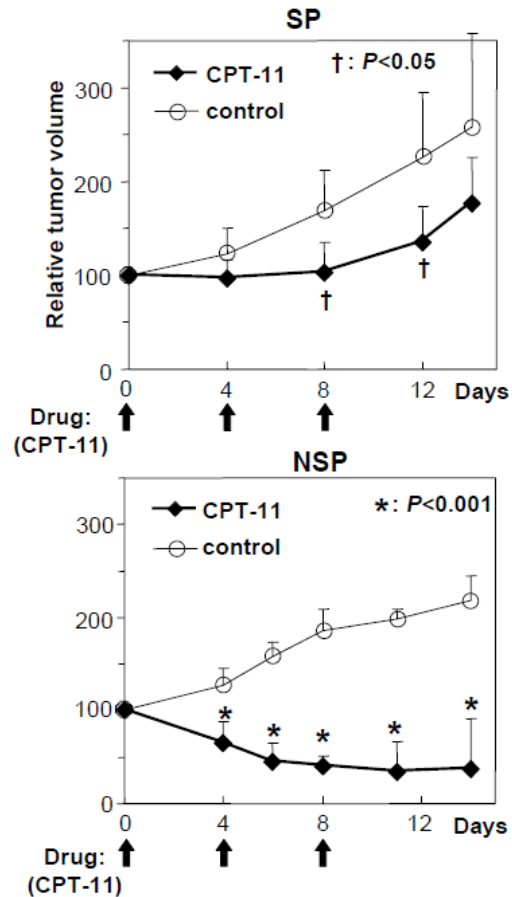


図2: SP細胞由来の腫瘍は治療抵抗性を示す。
↑: 薬剤投与日

次に、薬剤抵抗性の SP 細胞を抗がん剤感受性化させるために、我々のグループがこれまで、抗がん剤多剤耐性克服薬として臨床試験を行ってきた、ABC トランスポーター阻害剤を併用したところ、SP 細胞由来の腫瘍にも顕著な腫瘍縮小効果が得られた。この ABC トランスポーター阻害剤は、これまで、ABCB1 および ABCC1 の阻害剤として開発が進められてきたが、本研究において、SP 細胞で過剰発現の見られた ABCG2 の阻害活性も有することを見出した (図 3)。(ここまでの結果は論文にまとめ、現在投稿中)

また、他に SP 細胞に過剰発現をしている ABC トランスポーターが無いかどうかを、定量 RT-PCR 法を用いてヒトに存在する 49 種類の ABC トランスポーター全てを網羅的に解析した。その結果、ABCG2 に加えて、ある ABC トランスポーターが、様々な細胞株に共通して SP 細胞に過剰発現していることを見出した。この ABC トランスポーターに対する抗体の作製を試みたが、細胞外領域が極端に小さ

いうえ、糖鎖修飾を受けており、作製できなかった。このABCトランスポーターの発現は乳がんの予後と逆相関するとの報告もあり、今後更なる解析が必要であり、現在検討中である。

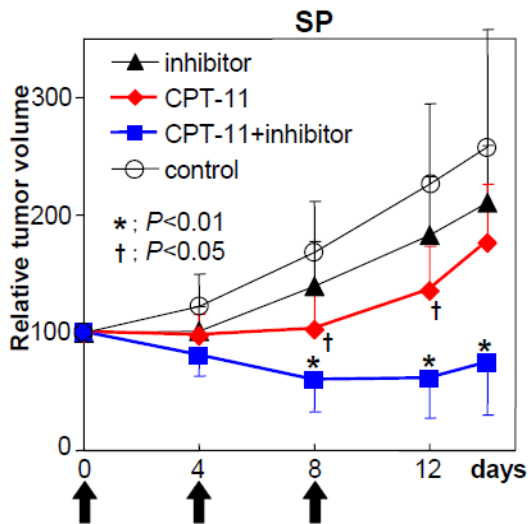


図3: 治療抵抗性を示したSP細胞由来の腫瘍も、阻害剤の併用により顕著な腫瘍縮小が認められた。
↑:薬剤投与日

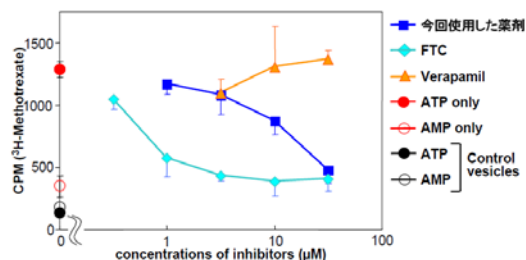


図4: ABCG2 overexpressed membrane vesicle を用い、ABCG2によりATP依存的に輸送される抗がん剤(メトトレキサート)の輸送を測定。今回使用した薬剤はABCG2の阻害活性も有することが分かる。

また、SP細胞で共通した発現上昇を示す遺伝子群を同定するために、乳がんを中心に4細胞株より分離したSP、nonSP細胞よりmRNAを抽出して、マイクロアレイ解析を行った(図5)。その結果、SP細胞で共通して発現上昇している遺伝子群を見出した。その中には、生存シグナルに関係すると思われる分子の過剰発現や、あるmicroRNAの過剰発現があった。現在、同定した遺伝子群の発現上昇するメカニズム、SPにおける重要性について、ある転写因子に着目して解析を進めている。また、同定したmicroRNAについては、標的タンパク質の探索および、SP細胞における発現上昇機構、miRNA発現の意義について検討している。

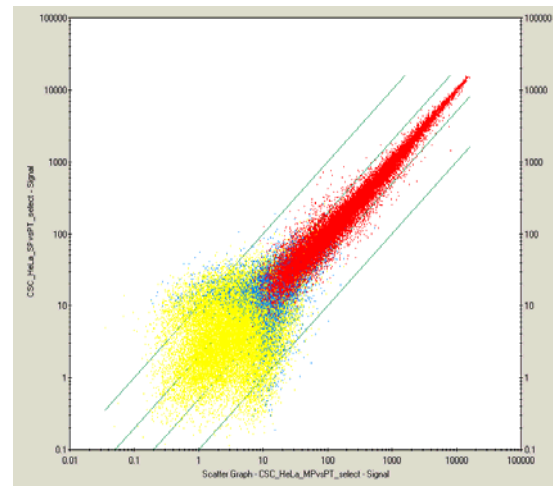


図5: マイクロアレイによるSPとnonSP発現遺伝子の網羅的解析

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)

[学会発表] (計2件)

①片山量平, 小池清恵, 鶴尾隆, 藤田直也

Purification and characterization of side population (SP) cells from various carcinoma cell lines
第66回日本癌学会学術総会, 2007年10月3日、横浜

②片山量平, 小池清恵, 佐藤重男, 鶴尾隆, 藤田直也

Side Population細胞に過剰発現するABCトランスポーターの同定とその解析
第8回「関東ホルモンと癌研究会」, 2008年1月19日、東京

③Ryohei Katayama, Yoshikazu Sugimoto, Takashi Tsuruo, Naoya Fujita

Dofequidar fumarate sensitizes Side Population cells to chemotherapeutic drugs by inhibiting ABCG2/BCRP-mediated drug export.

第100回 アメリカ癌学会総会, 2009年4月19日、米国 デンバー

[図書] (計2件)

①片山量平, 鶴尾隆, 藤田直也

南山堂、癌の分子標的治療 29章「がん幹細胞-2」、2008年、262-268

②片山量平、藤田直也

金芳堂、癌分子標的治療研究実践マニュアル
20 章「Cancer Stem Cell の分離方法」、2009
年、188-194

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 量平 (KATAYAMA RYOHEI)

財団法人癌研究会・癌化学療法センター・
基礎研究部・研究員

研究者番号：60435542

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：