

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20248032

研究課題名（和文）

癌幹細胞と血管新生誘導カスケードを標的とする固形癌の増殖制御解析

研究課題名（英文）

A study on the suppression protocol on proliferation of solid tumors regulating cancer stem cells and neo-vascularization

研究代表者

松田 浩珍（MATSUDA HIROSHI）

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：80145820

研究成果の概要（和文）：悪性度の高い固形癌では、切除手術の後に癌増殖が著しく加速し短期間で再発することがある。薬剤抵抗性の癌幹細胞と高い血管新生誘導能が、癌組織の急速な拡大に関与すると考えられているが、その制御法は見出されていない。本研究では、血管新生を制御する因子を検索し、血管新生を誘導する遺伝子群を標的とするサイレンシング療法や血管新生抑制因子に対する遺伝子制御療法などを検討、有効な血管新生制御法を開発した。また、癌幹細胞の薬物への低感受性機構を解明し、新たな薬物療法確立への基礎研究データを得た。

研究成果の概要（英文）：In a malignant solid carcinoma, proliferation of cancer cells are sometimes accelerated after a surgery and radiation therapy and a cancer may recur in a short term. It is thought that a cancer stem cell of the drug resistance and the high vascularization inducibility bring the rapid expansion of the cancer tissue, but the control method is not yet found. Based on the author's past research on mast cell tumors, we evaluated a silencing therapy or a gene control therapy for the endogenous inhibitors for vascularization and hypoxia inducible factors which controlled neo-vascularization. We developed effective therapy for controlling neo-vascularization. In addition, we elucidated mechanism of the drug resistance of cancer stem cells and obtained fundamental research data for establishment of a novel therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	20,000,000	6,000,000	26,000,000
2009年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2010年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
年度			
年度			
総計	34,000,000	10,200,000	44,200,000

研究分野：腫瘍学、臨床獣医学

科研費の分科・細目：獣医畜産学・臨床獣医学

キーワード：低酸素反応性因子・癌・遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

悪性度の高い固形癌では、切除手術や放射線治療の後に癌増殖が著しく加速し短期間で再発することがある。薬剤抵抗性の癌幹細胞

とその高い血管新生誘導能が、癌組織の急速な拡大をもたらすと考えられているが、未だその制御法は見出されていない。

近年動物医療においても、ヒトと同様に癌

症例が増加している。発見が遅れがちな動物症例は、ヒトにおける進行癌や再発癌の病態モデルとも考えられる。特に肥満細胞腫などの固形癌で、診断の遅延や不十分な外科処置などにより、手術後に急激に癌が再発し、病理学的動態が著しく悪化することは高頻度に遭遇する事象であるが、その原因は不明であった。近年、幹細胞研究が進み、骨髄のみならず癌組織にも自己複製能を有する『癌幹細胞』と呼ばれる極めて未分化な細胞が存在し、それが癌組織階層 (Hierarchy) の根源となつて何度でも癌を再発させること、再発時の増殖動態は加速度的に悪化することが固形癌でも解明されつつある (Singh SK, et al. Nature Vol. 432, 2004; Ricci-Vitiani L, et al. Nature Vol. 445, 2007)。癌幹細胞は、手術侵襲後に産生される炎症性サイトカインや低酸素環境への暴露に対し、正常な細胞より鋭敏に反応し、一気に増殖や血管新生を開始し、既存の化学療法剤や放射線療法に極めて感受性が乏しいと考えられているが、その存在も含め、解明されていないことはあまりにも多い。したがって、癌幹細胞の性質や特徴を解析し、薬物への反応性を調べることは、癌の制御を考える上できわめて重要であると考えられていた。

一方で、多くの癌において新生血管を制御することは、癌の拡大を抑制する重要な治療戦略であると考えられており、さまざまな創薬の試みがなされているが、有効性は限定的であった。

そこで本研究では、代表者らが萌芽研究～基盤研究(A)において得たイヌ肥満細胞腫の知見を広く固形癌に適用し、癌幹細胞に特異的な分子標的治療を検討すると共に、血管新生を誘導する低酸素反応性因子関連遺伝子群を標的とするサイレンシング療法や血管新生抑制因子群に対する遺伝子制御療法など、革新的次世代治療法を開発・評価することを目指して研究を遂行した。

2. 研究の目的

(1) 癌幹細胞研究：萌芽研究および基盤研究 (A) で蓄積したサンプルを用いて、臨床的悪性度と癌幹細胞の分布・血管の発達を免疫組織学的に解析する。臨床症例から外科的に摘出した癌組織から癌幹細胞を分離し、特異的に発現する細胞内分子を網羅的に解析する。癌幹細胞を増殖培地で培養し、様々な化学療法剤に対する感受性をハイスループットスクリーニングする。癌幹細胞コロニーを免疫不全マウスに移植し、スクリーニングされた化学療法剤の有効性を評価する生体試験系を研究開発する。

(2) 低酸素反応性遺伝子解析：免疫不全マウスへの移植実験系を用いて、経時的に腫瘍

組織における血流量の変化を調べる。また、免疫不全マウスから様々なタイミングで腫瘍サンプルを採取して低酸素反応性転写因子群 (HIF) やその制御下にある血管内皮増殖因子などの発現動態を検索するとともに、HIF に対する特異的サイレンシング治療法を様々な手法で評価する。

(3) 血管新生抑制遺伝子解析と操作：癌幹細胞を移植した免疫不全マウスを用いて、CT スキャン画像を基にして癌の増殖と血管新生を検索する。経時的に血流量や HIF の発現および HIF 抑制遺伝子群 (ING や Int) の発現動態を調べ、遺伝子操作試験を *in vitro* と *in vivo* で実施、新規の癌増殖抑制治療戦略の評価・検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 癌幹細胞の分離・同定・培養
研究代表者は、萌芽研究および基盤研究 (A) の中でイヌ肥満細胞腫の研究を行い、数種のイヌ肥満細胞腫細胞株を樹立、免疫不全マウスへの移植や継代培養可能な腫瘍株も保有・維持している。そこでまずイヌ肥満細胞腫における癌幹細胞の分離・同定・培養を試みる。具体的には、以下の計画に沿って研究を実施した。

①磁気ビーズ分離法を用いた表面マーカーによる癌幹細胞の分離

②免疫不全マウスへのフラクション別細胞移植と増殖曲線の作成

③形成された腫瘍の病理組織学的 (組織染色法) および分子生物学的 (フローサイトメトリー法・ウエスタンブロット法など) 評価

④癌幹細胞スフェアの維持・培養・免疫不全マウスにおける腫瘍形成試験

⑤本学動物医療センターにて、臨床症例から外科的に摘出した固形癌組織から癌幹細胞を分離し、特異的に発現する細胞内分子をプロテインアレイ法やジーンチップ法、リアルタイム RT-PCR 法、ウエスタンブロット法などを用いて網羅的に解析した。

⑥癌幹細胞は無血清培地で培養することによりスフェアとして維持するが、その維持には何らかの成長因子が必要とされる。イヌ肥満細胞腫・悪性黒色腫・乳癌などの多発する固形癌について、癌幹細胞スフェアの維持培地に必要な成長因子を検討・検索した。

⑦癌幹細胞スフェアは、血清入りの増殖培地に移して培養すると、分化と増殖を開始するが、そのときの分化マーカーの発現動態をフローサイトメトリー法やウエスタンブロット法などで解析した。

⑧スフェアの分化と増殖が開始するときをターゲットとした、様々な化学療法剤に対する薬物感受性検査法を検討した。

⑨癌幹細胞スフェアを免疫不全マウスに移

植し、担癌マウスモデルを作成すると共に、*in vitro* スクリーニングされた化学療法剤の有効性を評価する生体試験系を開発した。

(2) 低酸素反応性遺伝子解析

研究代表者は、イヌ肥満細胞腫のみならず、乳癌・骨肉腫・悪性黒色腫についても、臨床症例組織から樹立した細胞株や免疫不全マウスでの継代・維持系を保有している。これらの固形癌について、移植実験系とレーザードップラー血流画像化装置を用いて、経時的に移植した癌組織における血流量の変化を調べる。また、移植マウスから様々なタイミングで腫瘍サンプルを採取して低酸素反応性転写因子群 (HIF) やその制御下にある血管増殖因子などの発現動態を検索した。

①移植細胞数と移植後の腫瘍の増殖曲線の作成

②レーザードップラーによる移植後の経時的血流量変化の測定

③経時的な腫瘍サンプルの採取とリアルタイム PCR 法やジーンチップ・プロテインチップ法による低酸素反応性因子群発現動態の網羅的解析

④免疫不全マウスへの移植実験系を用いて、経時的に癌組織における血流量の変化や浸潤・拡大動態をレーザードップラーや Macro-Imaging System を用いて経時的に調べた。

⑤免疫不全マウスから様々なタイミングで腫瘍サンプルを採取して低酸素反応性転写因子群 (HIF) やその制御下にある血管内皮増殖因子などの発現動態をクロマチン免疫沈降法やリアルタイム RT-PCR 法などで検索した。

⑥研究協力者である株アルファジェンの協力を得て、HIF に対する特異的 siRNA を作成し、その抑制効果をまず *in vitro* 実験系で評価し、有効な siRNA 配列を選択した。

⑦*In vitro* で有効性の認められた siRNA を、*in vivo* マウスモデル (腫瘍移植系) に接種し、Macro-Imaging System を用いて癌増殖・転移抑制効果を評価した。

4. 研究成果

(1) 癌幹細胞の分離・同定・培養

研究代表者が保有する数種のイヌ肥満細胞腫組織および細胞株における癌幹細胞の分離・同定・培養を試みた。次いで、乳癌や中皮腫の細胞を用いて、癌幹細胞の培養や薬物感受性を検討した。

①肥満細胞に発現する特異的表面マーカーとして、高親和性 IgE レセプターおよび c-kit レセプターにより、癌組織を移植したマウスの末梢血中循環癌細胞を検出できることを明らかにした。

②上記の表面マーカーを指標として、肥満細胞腫症例犬の末梢血から循環癌細胞を検出し、その検出と肥満細胞腫の再発について検討したところ、再発した症例においてそれに先駆けて循環癌細胞が検出されていることが明らかとなり、抹消循環癌細胞を検出することで、肥満細胞腫の再発を早期に発見できることが示唆された。

③肥満細胞腫の細胞株において、薬剤排出ポンプ (ABC トランスポーター) の発現を指標として癌幹細胞の分離を試みたが、検出することが出来なかった。このことは、肥満細胞腫における癌幹細胞が多く、癌幹細胞の検出に使用されている方法では分離できないことを示し、今後の検討が必要である。

④乳癌や中皮腫の細胞を、無血清培地で培養することにより、癌幹細胞スフェアの維持・培養法を確立した。

⑤本学動物医療センターにて、臨床症例から外科的に摘出した上皮系固形癌組織から無血清培養によって癌幹細胞を分離し、特異的に発現する細胞内分子をプロテインアレイ法やジーンチップ法、リアルタイム RT-PCR 法、ウエスタンブロット法などを用いて網羅的に解析したところ、転写因子 NF-kappaB の活性が高いことを明らかにした。転写因子 NF-kappaB は、自動的に活性化されており、核内移行が高頻度に認められた。

⑥乳癌や中皮腫の細胞を無血清培地で培養することによりスフェアを形成させ、さまざまな抗癌剤に対する薬物感受性を調べたところ、各癌に対して一般的に使用される化学療法剤ではほとんど細胞の生存を抑制しなかった。一方、これらの化学療法剤を NF-kappaB 阻害剤と共に使用すると、癌幹細胞の生存や増殖が抑制された。

⑦癌幹細胞スフェアを、血清入りの増殖培地に移して培養すると、分化と増殖を開始するが、そのとき発現が更新する因子を解析したところ、細胞周期を進行させる D 型サイクリンやサイクリン E の発現が更新することが分かった。

⑧癌幹細胞が増殖期に入るとき、転写因子 NF-kappaB の発現を抑制することで、細胞周期調節因子の発現が抑制され、癌細胞の増殖が停止した。

⑨癌幹細胞スフェアを免疫不全マウスに移植し、担癌マウスモデルを作成し、NF-kappaB 阻害薬の有効性を検証した。

(2) 低酸素反応性遺伝子解析

固形癌について、免疫不全マウス移植実験系とレーザードップラー血流画像化装置を用いて、経時的に移植した癌組織における血流量の変化を調べた。また、移植マウスから様々なタイミングで腫瘍サンプルを採取して低酸素反応性転写因子群 (HIF) やその制御下にある血管増殖因子などの発現動態を

検索した。

- ①乳癌を免疫不全マウスの乳腺に移植し、マイクロ CT を用いて、癌血管の分布を造影し解析した。
- ②レトロウイルスベクターを用いて緑色の蛍光色素を遺伝子導入した中皮腫細胞を胸腔内に移植した免疫不全マウスを用いて、マクロイメージングシステムにより、癌細胞の拡大状況を解析した。
- ③レーザードップラーによる移植後の経時的血流量変化を測定し基礎データとした。
- ③経時的な腫瘍サンプルの採取とリアルタイム PCR 法やジーンチップ・プロテインチップ法による低酸素反応性因子群発現動態を解析し、初期病変では低酸素反応性因子や VEGF の発現が亢進すること、中期より bFGF や HGF の発現が誘導されることを突き止めた。
- ④免疫不全マウスへの移植実験系を用いて、経時的に癌組織における血流量の変化や浸潤・拡大動態をレーザードップラーを用いて経時的に調べる。
- ⑥研究協力者である株アルファジェンの協力を得て、HIF を制御する *Int6* 遺伝子に対する特異的 siRNA を作成し、その抑制効果をまず in vitro 実験系でラットの L6 細胞を用いて評価し、有効な siRNA 配列を選択した。
- ⑦In vitro で有効性の認められた siRNA を、in vivo マウスモデル (虚血モデル) に接種し、HIF への制御作用を確認した。

(3) 研究成果を、第 146、148、150 回日本獣医学会、第 40、41 回日本比較臨床医学会、第 48 回日本癌治療学会 (以上は国内学会)、および第 29 回欧州アレルギー臨床免疫学会、第 9 回国際獣医免疫シンポジウム、第 14 回国際免疫学会議 (以上は国際学会) で発表した。また、血管申請に関する研究成果は Cardiovascular Research に論文投稿し、minor revision のステージに入っている。癌幹細胞に関する研究成果は、Veterinary Immunology Immunopathology および Cancer Research に論文投稿中である。

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 7 件)

- ①Furusaka T, Tanaka A, Matsuda H, Ikeda M: Consecutive daily low-dose S-1 adjuvant chemotherapy after radical treatment for squamous cell carcinoma in head and neck cancer. *Acta Oto-Laryngologica*, In press.
- ②Jung K, Tanaka A, Fujita H, Matsuda A, Oida K, Karasawa K, Okamoto N, Ohmori K, Jee Y, Shin T, Matsuda H: PPARgamma-mediated suppression of

- dendritic cell function prevents the onset of atopic dermatitis in NC/NgaTnd mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127:420-429, 2011.
- ③Karasawa K, Tanaka A, Jung K, Matsuda A, Okamoto N, Oida K, Ebihara N, Ohmori K, Matsuda H: Retinal degeneration and rd1 mutation in NC/NgaTnd mice, a human atopic dermatitis model. *Curr. Eye Res.* In press.
 - ④Karasawa K, Tanaka A, Jung K, Matsuda A, Okamoto N, Oida K, Ohmori K, Matsuda H: Patterns of aquaporin expression in the canine eye. *Vet. J.*, In press.
 - ⑤Jin W, Tanaka A, Watanabe G, Matsuda H, Taya K: Effect of NGF on the motility and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa in vitro. *J. Reprod. Develop.* 56: 437-443, 2010.
 - ⑥Matsuda A, Tanaka A, Muto S, Ohmori K, Furusaka T, Jung K, Karasawa K, Okamoto N, Oida K, Itai A, Matsuda H: A novel NF- κ B inhibitor improves glucocorticoid sensitivity of canine neoplastic lymphoid cells by up-regulating expression of glucocorticoid receptors. *Res. Vet. Sci.* 89:378-382, 2010.
 - ⑦Ohmori K, Tanaka A, Makita Y, Takai M, Yoshinari Y, Matsuda H: Pilot evaluation of the efficacy of shampoo treatment with ultra-pure soft water for canine pruritus. *Vet. Dermatol.* 21-477-483, 2010.

[学会発表] (計 10 件)

- ①Matsuda A, Tanaka A, Ohmori K, Matsuda H. 急性リンパ性白血病細胞におけるグルココルチコイド耐性獲得機構と転写因子 NF- κ B の関連性 第 48 回日本癌治療学会 (2010 年 10 月 30 日)
- ②Nishikawa S, Tanaka A, Ohmori K, Matsuda H. ヒト中皮腫細胞における腫瘍性増殖制御分子としての転写因子 NF- κ B の役割 第 150 日本獣医学会 (2010 年 9 月 16 日)
- ③Matsuda A, Tanaka A, Ohmori K, Matsuda H. Inhibition of nuclear factor- κ B activity restored glucocorticoid sensitivity in lymphocytes and mast cells. 第 14 回国際免疫学会議 (2010 年 8 月 27 日)
- ④Matsuda A, Tanaka A, Ohmori K, Matsuda H. Inhibition of NF- κ B activity restored glucocorticoid sensitivity in lymphocytes and mast cells. 第 9 回国際獣医免疫シンポジウム (2010 年 8 月 18 日)
- ⑤Matsuda A, Tanaka A, Ohmori K, Matsuda H. Inhibition of nuclear factor- κ B activity restored glucocorticoid sensitivity in lymphocytes and mast cells. 第 29 回欧州アレルギー臨床免疫学会 (2010 年 6 月 7 日)

⑥Hiroshi Matsuda. ガン治療の基礎と最前線 —特に分子標的治療法について— 第40回日本比較臨床医学会（平成21年11月29日）招待講演

⑦Hiroshi Matsuda. Update of NC/NgaTnd mice as an atopic dermatitis model. International Workshop for the Study of Itch（平成21年10月27日）招待講演

⑧Matsuda A, Tanaka A, Ohmori K, Matsuda H. リンパ腫／白血病細胞におけるグルココルチコイド耐性獲得機構における転写因子NF- κ Bの関与 第148回日本獣医学会学術集会（平成21年9月26日）

⑨Oida K, Tanaka A, Ohmori K, Matsuda H. ヒト乳がん細胞株における腫瘍化抑制標的分子の検討 第146回日本獣医学会学術集会（平成20年9月25日）

⑩Okamoto N, Tanaka A, Ohmori K, Matsuda H. Int6 遺伝子サイレンシングによる後肢虚血モデルにおける末梢血管の誘導と歩行機能の改善 第146回日本獣医学会学術集会（平成20年9月25日）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：移植用細胞シートの製造方法、移植用細胞シート、および移植用細胞シートを用いる治療方法

発明者：田中あかね、松田浩珍

権利者：田中あかね、松田浩珍

種類：特許

番号：特願2010-192683

出願年月日：2010年8月30日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

獣医分子病態治療学研究室ホームページ

http://www.tuat.ac.jp/~mol_path/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 浩珍 (MATSUDA HIROSHI)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：80145820

(2) 研究分担者

田中 あかね (TANAKA AKANE)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：80418673

大森 啓太郎 (OHMORI KEITARO)

東京農工大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：20466915