

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659363

研究課題名(和文) 癌幹細胞特異的マーカーの同定と癌幹細胞特異的治療法の開発

研究課題名(英文) Identification of specific markers for cancer stem cells and anti-cancer therapy targeting cancer stem cells

研究代表者

千葉 勉 (Chiba, Tsutomu)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30188487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞マーカーHes1, Dcamk11を標的とする癌幹細胞治療を検討した。ヒト大腸癌細胞株にHes1-siRNAを投与し増殖抑制を確認した。次にApcMinマウスにHes1、Dcamk11-siRNAベクターを投与し核酸医薬治療の可能性と、Dck11抗体を用いた抗体療法の可能性を検討した。マウス正常腸組織、腫瘍からDcamk11陽性細胞をFACSで単離し、Dcamk11細胞特異的発現因子を同定し、腫瘍幹細胞特異的に発現する因子を検討した。それらに対するsiRNAを大腸癌細胞株へ投与した結果、Hes1, Dcamk11を標的とする「正常幹細胞を障害しない癌幹細胞治療法」の基礎的知見を得た。

研究成果の概要(英文)：We examined effects of targeting Hes1 and Dcamk11, possible cancer stem cell markers, on colonic cancer cells. Hes1-specific siRNAs significantly reduced growth of human colonic cancer cells. In addition, we also examined the effect of Hes1-siRNA to ApcMin mice. Finally, we obtained Dck11-positive cells from both normal intestine and polyps of ApcMin mice by FACS sorting, and found several transcripts specifically expressed in Dcamk11-positive tumor cells. The siRNAs or inhibitors specific for the molecules exclusively expressed in Dcamk11-positive tumor cells inhibited tumor cell growth without affecting normal epithelial cells. These data suggested possible anti-cancer strategy targeting cancer stem cells without affecting normal tissue stem cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：癌幹細胞 組織幹細胞 Hes1 Dck11 大腸ポリープ 癌幹細胞治療

1. 研究開始当初の背景

近年、癌には「癌幹細胞」が存在し、そこから癌細胞が供給され増殖するモデルが提唱されている。このため「癌幹細胞」は癌治療の重要な標的と考えられ、「癌幹細胞マーカー」を見いだして、それを標的とした治療法を開発しようとする研究が盛んに行われている。しかし現在報告されている「癌幹細胞マーカー」の大半は、正常幹細胞や、他臓器の分化した細胞にも発現しているため、「癌幹細胞マーカー」を標的とした場合、正常幹細胞や分化した細胞も障害されて、重大な副作用が生じる可能性が高い。事実、LGR5は大腸癌の良い幹細胞マーカーと考えられるが、同時に代表的な正常腸上皮幹細胞マーカーでもある。また肝癌の幹細胞マーカーのCD13は胆管細胞にも発現している。こうした問題を解決するためには、組織幹細胞には発現していない、「癌幹細胞」に特異的なマーカーを見いだすことが重要である。そこで研究代表者らは、様々な検討を行った結果、Hes1及びDcamk11が「癌幹細胞」の特異的なマーカーである可能性を見いだした。

- (1) Hes1は腫瘍特異的に細胞分化を決定する：Notchとその下流因子Hesは腸細胞の未分化性を保つ因子であると同時に、腸腫瘍細胞にはHes1が高発現し、腫瘍の未分化性維持に重要な役割を果たしている。これを利用し、Notch/Hesシグナルを遮断して腫瘍を分化誘導させる「抗腫瘍治療」が試みられた。しかし、正常腸上皮も杯細胞に分化するため下痢などの副作用が出現し、NOTCH/HESシグナルを標的とした治療は困難と考えられた。研究代表者らは、腸腫瘍でHes1が高発現していることに着目し、Hes1のみを標的とする癌治療の可能性を探るために、腸管特異的Hes1ノックアウト(KO)マウスならびHes1; Hes3; Hes5トリプルKOマウス、ApcMin; Hes1-KOマウスを作成した。その結果、Hes1は正常腸幹細胞の維持には必須ではないが、腸腫瘍幹細胞の維持には必須の因子であることが判明した。以上のことから、Hes1を標的とすることにより、正常腸管を障害することなく腸腫瘍を選択的に治療出来る可能性が考えられた。
- (2) Dcamk11は腫瘍特異的幹細胞をマークする：Dcamk11は消化管の幹細胞マーカー候補

と報告されている。研究代表者らはApcMinマウス; Dcamk11-CreERT2ノックインマウスを作成し、lineage tracingを行った。その結果、ApcMinマウスの腸腫瘍ではDcamk11陽性細胞から腫瘍細胞が供給され、腫瘍全体がDcamk11陽性細胞のprogenyで埋め尽くされた。重要なことに、正常腸組織ではDcamk11は一部の分化した細胞にのみ発現していた。この結果は、Dcamk11陽性細胞の選択的障害が、正常腸管を障害せずに、腫瘍のみを退縮させる可能性を示唆している。以上、研究代表者らは、Hes1とDcamk11が「癌幹細胞特異的なマーカー」であることを示唆する成績を得た。

2. 研究の目的

本研究では、(1)上記のHes1とDcamk11の「癌幹細胞特異的なマーカー」としての意義を追求するとともに、これら二つの因子を利用して、(2)癌幹細胞と正常組織幹細胞との遺伝子発現プロファイルを比較して、さらに新たな癌幹細胞マーカーを同定し、(3)「癌幹細胞特異的な治療法」開発の基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) Hes1・Dcamk11を標的とする「癌幹細胞特異的な治療法」開発への基礎的検討
Hes1・Dcamk11を標的とした遺伝子改変マウスの作出と解析
大腸癌の治療を視野に入れた場合、一旦発育した腸腫瘍がHes1, Dcamk11を標的とすることによって退縮するか否かを検証することが重要である。そのためにナフトフラボン投与によってHes1を任意のタイミングで欠失させることが出来る薬剤誘導性Hes1ノックアウト・ApcMinマウスの作成を開始する。また、Dcamk11陽性細胞特異的にジフテリア毒素受容体を発現するDcamk11陽性細胞選択的アブレーション・ApcMinマウスの作出を開始する。同マウスにジフテリア毒素を投与すると、一旦腸腫瘍が発育したマウスにおいて、Dcamk11陽性細胞のみを選択的にアブレーションすることが出来る。
Hes1・Dcamk11の機能解析
Hes1, Dcamk11が癌幹細胞の幹細胞性維持にどのように機能しているかは、十分に明

らかになっていない。とくに Dcamk11 については、研究代表者らの過去のマウス実験でも、Dcamk11 を「マーカー」として用いることを主眼としてきた。そのため、Hes1, Dcamk11 に対するノックダウン、および強制発現によって、ヒト大腸癌細胞株を用いた機能解析を予定する。そこで、Hes1, Dcamk11 に対する siRNA と、両者の cDNA を組み込んだ発現ベクターの構築を行う。

Hes1・Dcamk11 を標的とする新規分子標的医療の開発

転写因子である Hes1 を標的とした遺伝子治療としては、Hes1 のノックダウンが現実的なストラテジーと思われる。したがって、上記 で構築する Hes1 に対する siRNA は、治療へも応用できる。一方、Dcamk11 蛋白については、血中に分泌されず、その C 末端を細胞外に露出している点を利用する。すなわち、既に他の分子で確立している抗体医薬の方法論を応用し、Dcamk11 を標的とした抗体治療を検討する。細胞表面の Dcamk11 が一定期間細胞表面にとどまる場合は、補体依存細胞傷害反応 (CDC) や抗体依存性細胞傷害反応 (ADCC) を利用した Dcamk11 陽性細胞の排除を期待する。短期間での検証は困難であるが、ADCC 活性の増強技術は日進月歩であり、本機序を応用した治療へ向けての基礎的知見の集積は将来的に有用な可能性がある。細胞表面の Dcamk11 が短期間で細胞内に取り込まれる場合は、抗 Dcamk11 抗体に殺細胞化合物やラジオアイソトープを標識することで、Dcamk11 に結合した抗体が細胞内に取り込まれて Dcamk11 陽性細胞を特異的に障害する治療戦略が可能である。

(2) FACS および cDNA アレイによる、新規「癌幹細胞特異的マーカー」同定の試み

癌幹細胞と正常腸管幹細胞における遺伝子発現プロファイルの解析
マウス腸腫瘍・正常腸組織を単細胞に分離し、それぞれから Dcamk11 高発現画分を FACS により収集する。抽出した cDNA をマイクロアレイにより網羅的に比較検討し、癌幹細胞特異的に発現する候補因子を絞り込む。Hes1 と Dcamk11 の双方を高発現する癌細胞を対象とすることにより、「癌幹細胞特異的マーカー」発現細胞を正確に絞り込み、より精度の高い

解析を目指す。

ヒト癌治療を視野に入れた「癌幹細胞特異的マーカー」候補の検証

上記 で同定した候補因子のうち Notch・Hes シグナリング関連因子については、ヒト大腸癌臨床検体において発現および局在を検証する。これにより、次年度以降の検証へ向けた基礎的知見を集積する。

4. 研究成果

(1) Hes1・Dcamk11 を標的とする「癌幹細胞特異的治療法」開発への基礎的検討

Hes1・Dcamk11 を標的とした遺伝子改変マウスの作出と解析

ナフトフラボン投与によって Hes1 を任意のタイミングで欠失させる薬剤誘導性 Hes1 ノックアウト・ApcMin マウスを作成した。同マウスを用いて、成体で Hes1 を欠失させると、正常腸管には明らかな変化は認めなかったが、腸腫瘍細胞は Cre が発現した箇所では Hes1 が欠失し、腸腫瘍細胞に粘液の貯留を認め、細胞増殖が減少していた。したがって、マウス生体でも Hes1 を標的とする腫瘍分化誘導療法の有効性が示唆された。また、Dcamk11 陽性細胞特異的にジフテリア毒素受容体を発現する Dcamk11 陽性細胞選択的アブレーション・ApcMin マウスを作成した。同マウスでは、ジフテリア毒素の投与によって、正常腸管には明らかな傷害を認めなかったが、腸腫瘍は有意に退縮した。このことにより、Dcamk11 陽性腫瘍細胞を標的とする細胞標的療法の有効性が示唆された。

Hes1・Dcamk11 の機能解析

Hes1, Dcamk11 の機能を解析するために、それぞれに対する siRNA 等を作成し、その効果を検討した。まず Hes1 に関しては、Hes1 を他の 6 つの Hes ホモログと区別する特異的な siRNA を作成した。同 siRNA をヒト大腸癌や膵癌の細胞株に投与すると、幹細胞マーカーの減少と分化マーカーの増加を認めた。一方 Dcamk11 の機能解析のために、Dcamk11 に対する siRNA を作製し、大腸癌細胞株を用いたノックダウン実験を行った。しかし、Dcamk11 siRNA の投与では、ヒト大腸癌や膵癌の細胞株には、細胞増殖には著変を認めず、幹細胞マーカーや分化マーカーには明らかな変化を認めなかった。そこ

で Dcamk11 の cDNA を組み込んだ強制発現ベクター等を複数のヒト大腸癌細胞株に対しトランスフェクションした。しかしやはり siRNA 投与の場合と同様に、細胞増殖には著変を認めず、幹細胞マーカーや分化マーカーには明らかな変化を認めなかった。したがって、Dcamk11 陽性腫瘍幹細胞の維持には、Dcamk11 そのものは主要な役割を果たしていないことが示唆された。

Hes1・Dcamk11 を標的とする新規分子標的医療の開発

上記のデータに基づいて、核酸医薬や小分子化合物を用いた腸腫瘍治療の可能性を検証するためには、Hes1 などに対する siRNA を用いた、効率的なドラッグデリバリー・システムの検討が必要と考え、ゼラチン含有 siRNA のマウス腸管への投与効率を検討した。一方、Dcamk11 については、その機能を利用した治療法ではなく、別の戦略が必要と考えた。そのために、Dcamk11 が血中に分泌されず、その C 末端を細胞外に露出している点を利用しようと考えた。すなわち、既に他の分子で確立している抗体医薬の方法論を応用し、Dcamk11 を標的とした抗体治療を検討した。ヒト大腸癌への臨床応用を視野に入れ、抗 Dcamk11 抗体の作出を開始した。マウスを Dcamk11 タンパクの C 末端で免疫し、抗 Dcamk11 モノクローナル抗体を作製した。これらの抗体を種々の薬剤で標識して、同抗体を用いた癌幹細胞へのミサイル抗体療法が可能か否かの検討を進めた。

(2) FACS および cDNA アレイによる、新規「癌幹細胞特異的マーカー」同定の試み

癌幹細胞と正常腸管幹細胞における遺伝子発現プロファイルの解析

マウス腸腫瘍・正常腸組織を単細胞に分離し、それぞれから Dcamk11 高発現画分を FACS により収集した。それらの Dcamk11 高発現画分から抽出した cDNA をマイクロアレイにより網羅的に比較検討した。その結果、癌幹細胞特異的に発現する候補因子を複数同定することが出来た。それら候補因子のうち、特異的な阻害物質が知られている因子に関しては、阻害小分子化合物を投与して、幹細胞因子や細胞機能に与える影響の解析を行った。すると、複数の候補因子に

関して、細胞増殖が有意に抑制され、いくつかの因子については、細胞増殖の抑制のみならず、高率にアポトーシスを誘導して、コロニーが死滅することが示された。

ヒト癌治療を視野に入れた「癌幹細胞特異的マーカー」候補の検証

上記で同定した候補因子のうちすでに抗体が存在するものについては、マウス腸腫瘍のみならず、ヒト大腸癌臨床検体においても発現および局在を検証した。いくつかの因子については、ヒト大腸癌の一部で高発現していることが示された。

以上の実験により、Hes1, Dcamk11 を手掛かりとする、「正常幹細胞を障害しない癌幹細胞特異的治療法」を開発するための基礎的知見を得るとともに、将来的な臨床応用を視野に入れたた実地的展開を果たした。

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 10 件)

1. Ishizu-Higashi S, Seno H, Nishi E, Matsumoto Y, Ikuta K, Tsuda M, Kimura Y, Takada Y, Kimura Y, Nakanishi Y, Kanda K, Komekado H, Chiba T. Deletion of nardilysin prevents tieh development of steatohepatitis and liver fibrotic changes. PLoS One (in press). doi: 10.1371/journal.pone.0098017. eCollection 2014. 査読有
2. Murase K, Tabara Y, Takahashi Y, Muro S, Yamada R, Setoh K, Kawaguchi M, Kadotani H, Kosugi S, Sekine A, Nakayama T, Mishima M, Chiba T, Chin K, Matsuda F: Gastroesophageal reflux disease symptoms and dietary behaviors are significant correlates of short sleep duration in the general population: The Nagahama Study. Sleep (in press) <http://www.journalsleep.org/AcceptedPapers/SP-854-13.pdf> 査読有
3. Kim SK, Nasu A, Komori J, Shimizu T, Matsumoto Y, Minaki Y, Kohno K, Shimizu

- K, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: A model of liver carcinogenesis originating from hepatic progenitor cells with accumulation of genetic alterations. *Int J Cancer* 134:1067-1076:2014. doi: 10.1002/ijc.28445. 査読有
4. Fukuda A, Chiba T: Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming is critical for neoplasia formation. *Gastroenterology (Selected Summary)* 145:904-907:2013. doi: 10.1053/j.gastro.2013.08.028. 査読無
 5. Yamamoto S, Nakase H, Matsuura M, Honzawa Y, Matsumura K, Uza N, Yamaguchi Y, Mizoguchi E, Chiba T: Heparan sulfate on intestinal epithelial cells plays a critical role in intestinal crypt homeostasis via Wnt/ β -catenin signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305:G241-G249:2013. doi: 10.1152/ajpgi.00480.2012. 査読有
 6. Akitake-Kawano R, Seno H, Nakatsuji M, Kimura Y, Nakanishi Y, Yoshioka T, Kanda K, Kawada M, Kawada K, Sakai Y, Chiba T: Inhibitory role of Gas6 in intestinal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 34:1567-1574:2013. doi: 10.1093/carcin/bgt069. 査読有
 7. Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, Ueo T, Yamaga Y, Maruno T, Nakanishi N, Kanda K, Komekado H, Kawada M, Isomura A, Kawada K, Sakai Y, Yanagita M, Kageyama R, Kawaguchi Y, Taketo MM, Yonehara S, Chiba T: Dcl1k1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. *Nature Genet* 45:98-103:2013. doi: 10.1038/ng.2481. 査読有
 8. Fukuda A, Morris JP 4th, Hebrok M. Bmi1 is required for regeneration of the exocrine pancreas in mice. *Gastroenterology* 143:821-831:2012. doi: 10.1053/j.gastro.2012.05.009. 査読有
 9. Ueo T, Imayoshi T, Kobayashi T, Ohtsuka T, Seno H, Nakae H, Chiba T, Kageyama R: The role of Hes genes in intestinal development, homeostasis and tumor formation. *Development* 139:1071-1082:2012. doi: 10.1242/dev.069070. 査読有
 10. Kanda K, Komekado H, Sawabu T, Ishizu S, Nakanishi U, Nakatsuji M, Akitake-Kawano R, Ohono M, Hiraoka Y, Kawada M, Kawada K, Sakai Y, Matsumoto K, Kunichika M, Kimura T, Seno H, Nishi E, Chiba T: Nardilysin and ADAM proteases promote gastric cancer cell growth by activating intrinsic cytokine signaling via enhanced ectodomain shedding of TNF. *EMBO Mol Med* 4:396-411:2012. doi: 10.1002/emmm.201200216. 査読有
- [学会発表](計8件)
1. 妹尾浩、中西祐貴、千葉勉: Dcl1k1 discriminates between tumor and normal stem cells in the intestine. シンポジウム がん幹細胞研究に基づく新たながん治療戦略 第36回日本分子生物学会年会 2013.12.04 神戸 神戸国際会議場
 2. 中西祐貴、上尾太郎、妹尾浩: 腸腫瘍幹細胞特異的マーカーDcl1k1の同定. International Sessions がん幹細胞 第72回日本癌学会総会 2013.10.04 横浜 パシフィコ横浜
 3. Nakanishi Y, Seno H, Chiba T: Intestinal tumors are continuously renewed by Dcl1k1-positive tumor stem cells. American Association of Cancer Research, Annual Meeting 2013, Apr 10, 2013, Washington DC, USA, Walter E. Washington Convention Center
 4. 中西祐貴、妹尾浩、上尾太郎: 正常腸管および腸腫瘍におけるDcl1k1/Lgr5陽性細胞の役割. 第99回日本消化器病学会総会 2013.03.23 鹿児島 かがしま県民交流センター
 5. Nakanishi Y, Seno H, Ueo T, Chiba T: The role of Dcl1k1-positive cells in the intestinal homeostasis. 2012 James W. Freston Single Topic Conference: Gastrointestinal Stem Cell Biology and Pathobiology. August 27-28, 2012,

Chicago, USA, Intercontinental Hotel
Chicago

6. Seno H: Dclk1 discriminates between tumor and normal stem cells in the intestine. GI Research Academy 2012, June 15, 2012, Tokyo, Japan, Keidanren Hall
7. 中西祐貴、上尾太郎、妹尾浩: 腸腫瘍幹細胞特異的マーカーDcamk11 の同定. 第98回日本消化器病学会総会 2012.04.20 東京 京王プラザホテル
8. 上尾太郎、妹尾浩、仲瀬裕志: Hes1 は大腸上皮細胞の位置を規定し、ニッチ由来の Wnt や BMP シグナルによる分化制御に関与する. 第98回日本消化器病学会総会 2012.04.19 東京 京王プラザホテル

〔図書〕・〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

1. JSPS ホームページ
科研費 NEWS2013 年度 VOL1
http://www.jsps.go.jp/j-grantsinaid/22_letter/data/news_2013_vol1/p17.pdf
2. 京都大学ホームページ
癌幹細胞を特定するマーカー同定に成功
～新世代の癌治療法開発に期待～
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2012/121203_1.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 勉 (CHIBA, Tsutomu)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号: 30188487

(2) 研究分担者

妹尾 浩 (SENO, Hiroshi)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号: 90335266

(3) 連携研究者

該当なし