

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26670023

研究課題名(和文) がん幹細胞発生の可視化とこれを駆動する微小環境の探索

研究課題名(英文) Development of cancer stem cells driven by microenvironment

研究代表者

入村 達郎 (IRIMURA, Tatsuro)

順天堂大学・医学部・特任教授

研究者番号：80092146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：がん幹細胞はがんの治療抵抗性や潜伏と再発を理解し治療を改善する上で重要な対象であるが、その同定法、発生のメカニズムの理解は遅れていた。最近遺伝子解析により発見したがん幹細胞表面マーカー候補であるZnT1に対するモノクローナル抗体を作成し、がん幹細胞の発生状態を可視化することを企図したが、その結合する細胞集団は他の方法による検出結果と合致せず、またこの分子の発現状態はがんの治療抵抗性と相関しなかった。開発したモノクローナル抗体はZnT1解析ツールとして有用であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells are important subjects to understand the treatment resistance, latency and recurrence of cancer and to improve therapy. However, it was not easy to identify them in histological and cytological context. The mechanism how they give rise should be investigated with appropriate surface markers, which was not available. We have recently prepared a monoclonal antibody against ZnT1, a cancer stem cell surface marker candidate discovered by genetic analysis. Our specific aim was to visualize the developmental state of cancer stem cells by the use of the antibody. However, after careful investigations conducted under the present project, we concluded that the anti-ZnT1 antibody positive cell population was not identical to cancer stem cell populations identified by other methods. The expression status of this molecule did not correlate with the treatment resistance of cancer. However, we found that the developed monoclonal antibody is useful as a tool to analyze ZnT1.

研究分野：腫瘍学、免疫学、生化学

キーワード：がん幹細胞 ZnT1 モノクローナル抗体 大腸がん 乳がん フローサイトメトリー

## 1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は、概念としてはがんの生物学的挙動を理解し、効果的で副作用の少ないがん治療薬を開発する上で非常に重要である。さらに、がん幹細胞に特有な分子はがん治療における重要な標的となる。しかしがん幹細胞を同定し定義づけるのに有用な分子は非常に限られていた。また、個々の細胞レベルでがん幹細胞を見つけ出し、その性質を調べ、さらにがん幹細胞の発生を可視化するためには、表面に露出した分子マーカーを使用する必要があるが、そのような分子はほとんど見出されていなかった。したがって、がん幹細胞であることを示すことのできるマーカーとなりうる細胞表面分子を見出すことは、生物学的にも、がん治療学の上からも極めて重要である。しかし、実際にはそのような分子を発見することは非常に難しく、研究は遅れていた。私どもは先行研究でヒト大腸がん細胞に由来するがん幹細胞とそれ以外のがん細胞との間で発現する遺伝子を網羅的に解析比較して、高発現する遺伝子をリストし、その中からがん細胞表面に露出して存在する可能性の高い糖タンパク質として亜鉛イオン輸送体である ZnT1 に注目した。この糖蛋白分子に対するモノクローナル抗体を作製することに成功した。KLH コンジュゲート ZnT1 合成ペプチドを最初の免疫原とし、さらに強制発現細胞を用いて二次免疫を行い、免疫原とは別の背景を持つ強制発現細胞を用いてスクリーニングを行うことによって発現細胞に結合する抗体、リコンビナントタンパク質を用いたウェスタンブロットを加えることによって変性糖蛋白に結合する抗体の作製を試み、既に二種類のハイブリドーマを確立していた。しかし、それらのハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を用いてがん細胞に発現する ZnT1 を検出することには成功していなかった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、以下を目的とした。(1) 二つの抗 ZnT1 モノクローナル抗体の特性を明らかにする。(2) 抗 ZnT1 モノクローナル抗体を用いて ZnT1 の細胞表面における発現を実際に検出し、抗体が結合するがん細胞集団が他の方法で検出できるがん幹細胞と一致するかどうかを検証する。(3) ZnT1 のがん細胞表面における分布を解析し、分裂中の細胞における分布を明らかに

する。(4) ZnT1 発現のがん細胞の振る舞いにおける役割を検証する。(5) がん幹細胞マーカーとしての ZnT1 のがん細胞における発現が微小環境因子によって制御される可能性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

先ず、二種類のハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体の特性解析を行った。免疫沈降、ウエスタンブロットティング、フローサイトメーターにおける解析への利用、細胞組織染色、などを試みた。なおこの過程で、一種類のハイブリドーマ 2D11 の生育状態が悪かったために、その産生する抗体はウエスタンブロットティングに使用できる可能性が期待されたが、その後の追求を断念した。開発に成功したフローサイトメトリーに有用であることが判明した抗 ZnT1 モノクローナル抗体である 2G1 を用いて次に、MCF7 ヒト乳がん細胞と SW480 ヒト大腸がん細胞を主な対象に、がん幹細胞分画と考えられる蛍光色素排出能を持つ細胞 (サイドポピュレーション) と ZnT1 が高発現している細胞との関係を追及した。ZnT1 の発現を mRNA レベルで測定した場合と、細胞表面から定量できる ZnT1 の発現レベルとが相関するかどうかを解明することとした。一方、表面における 2G1 モノクローナル抗体の結合性と、蛍光色素排出能の両方を指標にセルソータにより細胞を分取しこれらの細胞における ZnT1 の mRNA レベルを定量した。

さらに、培養細胞を固定し、細胞膜の透過性を高める処理を加えた場合と加えない場合とを対象にモノクローナル抗体で細胞染色を行い ZnT1 の分布状態を追及した。

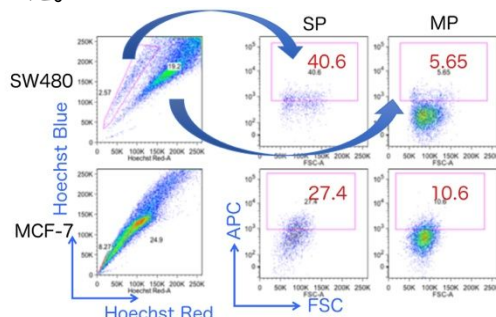
ZnT1 とがん細胞の挙動との関連を特に臨床的な観点から明らかにするため、公開データに基づいてこの分子の発現と患者生存率の関係を複数のがん種において追及した。

一方、作製した抗体がこの分子の発現解析や機能解析に使用できる可能性をさらに追求するため、ZnT1 の発現と細胞の亜鉛抵抗性、それに対する抗 ZnT1 モノクローナル抗体の作用について、がん細胞培養培地に種々の濃度の亜鉛を添加することにより追及した。さらに、ZnT1 強制発現細胞を用いて、この分子が細胞の亜鉛の毒性に対する抵抗性を獲得するかどうか、またモノクローナル抗体の結合が、この効果に影響するかどうかを検証した。

#### 4. 研究成果

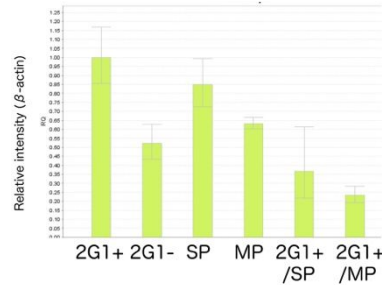
抗 ZnT1 モノクローナル抗体を産生する二種類のハイブリドーマ 2G1 と 2D11 はいずれも免疫開始時に用いたオリゴペプチドに対する結合性が極めて低かった。2G1 はフローサイトメトリーにおいて、ZnT1 の検出に適していることが明らかになった。一方 2D11 はウエスタンブロッティングに有用であったが、ハイブリドーマが不安定であり、さらなる追求ができなかった。

引き続き、ヒト乳がん細胞株とヒト大腸がん細胞株を用いて、抗 ZnT1 モノクローナル抗体 2G1 の結合性を指標に ZnT1 を検出することで、がん幹細胞におけるこの分子の不均一な分布を検出できるかどうかを解明する事を目指した。抗 ZnT1 モノクローナル抗体 2G1 は、解析に用いた 10 種以上の通常の条件下で増殖させたすべてのヒトがん細胞に低度の不均一性を持って結合性を示した。他の乳がん細胞、大腸がん細胞と同様に通常の条件下で増殖させた MCF7 細胞と SW480 細胞に対しても結合性を有することを明らかにした。MCF7 細胞を用いて、抗 ZnT1 抗体 2G1 の結合レベルを指標にセルソーターにより分取した細胞において、ZnT1 結合性の画分では、ZnT1 の mRNA の発現レベルが高いことを定量 PCR 法で明らかにした。SW480 細胞ではこのような差は見られなかった。一方、蛍光色素の排出能によってフローサイトメーターで分画できるサイドポピュレーションにおいて、ZnT1 の mRNA が高レベルで含まれていた。しかし、2G1 モノクローナル抗体の結合する亜集団とサイドポピュレーションが一致するわけではなかった。したがって、抗 ZnT1 モノクローナル抗体 2G1 の結合性だけを指標にがん幹細胞を同定できるかどうかについては、慎重に検討する必要があることがわかった。



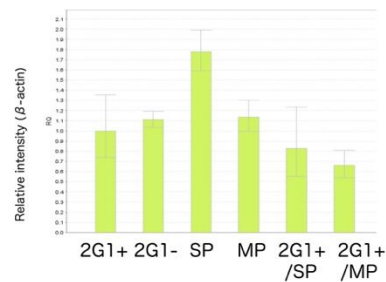
- サイドポピュレーション (SP) にはメインポピュレーション (MP) と比べて 2G1 抗体が結合する細胞がエンリッチされているが、集団が完全に一致するわけではなかった。

図 1：サイドポピュレーションには 2G1 抗体が結合する細胞がエンリッチされているか？



- MCF-7 (乳がん) 細胞において、SPはMPよりも ZnT1 遺伝子の発現量レベルが高かった。
- 2G1 抗体の結合性と ZnT1 遺伝子の発現レベルは相関した。

図 2：2G1 抗体結合性で選別した乳がん細胞、およびサイドポピュレーションであることによって選別した乳がん幹細胞では ZnT1 mRNA 発現レベルが高いか？



- SW480 (大腸がん) 細胞においては、SPはMPよりも ZnT1 遺伝子の発現量レベルが高かった。
- 2G1 抗体の結合性と ZnT1 遺伝子の発現レベルは、SW480 (大腸がん) 細胞では相関しなかった。

図 3：2G1 抗体結合性で選別した細胞、およびサイドポピュレーションであることによって選別した幹細胞では ZnT1 mRNA 発現レベルが高いか？

二次元培養における細胞染色法において、細胞周期の異なる位置の細胞における 2G1 抗体結合部位の細胞内外における分布の違いを検出することを試みた。固定法などの詳細な検討を行ったが、抗 ZnT1 モノクローナル抗体 2G1 は固定後の ZnT1 を検出することができず、非対称な分布を検出することはできなかった。また、2G1 抗体はウエスタンブロッティングに使用できないことがわかった。結論として、今回の研究でこれまで ZnT1 遺伝子強制発現細胞においてのみ検出されていた ZnT1 が、解析の対象とした全てのがん細胞においてフローサイトメトリーによって検出できたことは大きな進歩である。本研究によって、開発途上にあった抗 ZnT1 モノクローナル抗体の有効性が初めて明らかとなり、今後の利用が多いに期待される。

続いて、がん細胞における ZnT1 発現と悪性挙動との関係を追及した。研究開始時点では公開されていなかったヒト臓器ごとの遺伝子発現データが公開され、それによれば ZnT1 の発現は極めてユビキタスであった。がん組織内における発現は、乳がん、

肝細胞がん、子宮体がん比較的高い症例があり、大腸がん、非小細胞肺がん、前立腺がんでは比較的低かった。しかし腫瘍組織内における不均一性はいずれのがんでもみとめられなかった。そこで、乳がん、肝細胞がん、子宮体がんにおける発現レベルと生存率の関係に興味を持たれた。乳がんでは ZnT1 発現レベルが高い症例（約 30%）では生存率が高いが統計的有意差はなかった（ $p=0.1$ ）肝細胞がんでも発現レベルの高い症例（約 37%）で生存率が高く、その差は統計的に有意であった。子宮体癌の解析データは今の所公開されていない。大腸がんでも発現レベルの高い症例（約 78%）で生存率が高かった（ $p=0.07$ ）。一方、非小細胞肺がんでは ZnT1 高発現グループ（約 53%）で生存率が低く（ $p=0.002$ ）前立腺がんでも ZnT1 発現の高い症例（約 68%）で生存率が低かった（ $p=0.05$ ）。別のデータベースに基づく解析では、胃がんでは高発現群で生存率が高く、卵巣がんでは高発現群と低発現群との間に生存率に差がなかった。これらの結果からも、ZnT1 を治療抵抗性に関係するがん幹細胞のマーカーとして解析を進めることは有効でないと判断した。

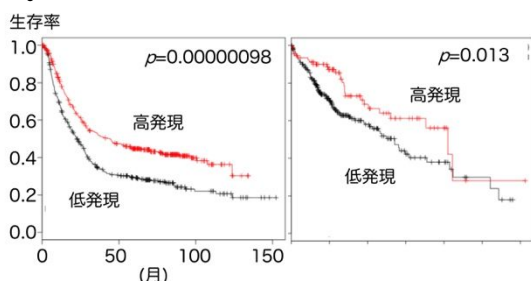


図4：腫瘍内におけるZnT1 mRNAの発現レベルは胃がん（左パネル）と肝がん（右パネル）においては無再発生存率と有意に逆相関した。

ZnT1 の発現と細胞の亜鉛抵抗性に関しては、HEK293 細胞に ZnT1 を強制発現させると亜鉛に対する抵抗性を生じることが明らかになった。また、HEK293 細胞において、亜鉛存在下で培養を行うと ZnT1 発現レベルが上昇することを示す予備的な知見を得ることができた。一方、抗 ZnT1 モノクローナル抗体 2G1 培養細胞に作用させることによって、細胞の亜鉛に対する抵抗性に変化が生じかどうかを調べたが、明確な結果を得ることはできなかった。

以上のように、本研究では新規に作製したモノクローナル抗体 2G1 が、亜鉛トランスポータータンパク質である ZnT1 を解析するためのツールとして有用であるが、その使用範囲には限界があることを明確に示すことができた。このモノクローナル抗体

をがん幹細胞解析に利用する可能性は完全になくなったわけではないが、高いハードルが存在すると判断している。

## 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 16 件全て査読あり)

1. Sue M, Higashi N, Shida H, Kogane Y, Nishimura Y, Adachi H, Kolaczowska E, Kepka M, Nakajima M, Irimura T. An iminosugar-based heparanase inhibitor heparastatin (SF4) suppresses infiltration of neutrophils and monocytes into inflamed dorsal air pouches. *Int Immunopharmacol*. 2016 Jun;35:15-21. doi: 10.1016/j.intimp.2016.03.017. Epub 2016 Mar 22. PMID: 27015605
2. Hayakawa Y, Kawada M, Nishikawa H, Ochiya T, Saya H, Seimiya H, Yao R, Hayashi M, Kai C, Matsuda A, Naoe T, Ohtsu A, Okazaki T, Saji H, Sata M, Sugimura H, Sugiyama Y, Toi M, Irimura T. Report on the use of non-clinical studies in the regulatory evaluation of oncology drugs. *Cancer Sci*. 2016 Feb;107(2):189-202. doi: 10.1111/cas.12857. Review. PMID: 26919617
3. Tsunekawa N, Higashi N, Kogane Y, Waki M, Shida H, Nishimura Y, Adachi H, Nakajima M, Irimura T. Heparanase augments inflammatory chemokine production from colorectal carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jan 22;469(4):878-83. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.074. Epub 2015 Dec 20. PMID: 26713365
4. Wu H, Tao A, Martin JD, Quader S, Liu X, Takahashi K, Hespel L, Miura Y, Hayakawa Y, Irimura T, Cabral H, Kataoka K. Proteasome inhibitor loaded micelles enhance antitumor activity through macrophage reprogramming by NF- $\kappa$ B inhibition. *106(9): 2438-2446*, 2017, doi: 10.1016/j.xphs.2017.03.031.
5. Fujihira H, Usami K, Matsuno K, Takeuchi H, Denda-Nagai K, Furukawa JI, Shinohara Y, Takada A, Kawaoka Y, Irimura T. Critical Domain of Ebolavirus Envelope Glycoprotein Determines Glycoform and Infectivity. *Sci Rep*. 8(1): 5495, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-23357-8.

〔学会発表〕(国際学会のみを抜粋計6件)

1. Irimura T. Public private partnership in Japanese pharmaceutical affairs. Aug 31-Sep 4, 2014. FIP Congress, Bangkok, Thailand (Invited lecture)
2. Denda-Nagai K, Noji M, Saba K, Kurashina R, Hisai T, Usami K, Fujihira H, Namba A, Hara H, Shinohara Y, Irimura T. MGL (CD301) in infection and immunity. Mucins in Health and Disease, 13th International Mucin Workshop. Cambridge, UK. July 18-22, 2015 (Invited lecture).
3. Irimura T. C-type lectins on dendritic cells and macrophages regulate infection and immunity. LMU-UT Symposium, Munich, Germany. October 28-29, 2015 (Invited lecture).
4. Irimura T. Future of glycobiotics. Frontiers 2016 Symposium, Lausanne, Switzerland. Dec 5, 2016 (invited lecture).
5. Denda-Nagai K, Namba A, Noji M, Irimura T. Comparison on immune response after immunization with glycosylated MUC1 between C57BL/6 mice and MUC1 transgenic mice. Mucins in Health and Diseases, 14th International Workshop on Carcinoma-Associated Mucins. Cambridge, UK, July 24-28, 2017.
6. Matsuzawa M, Horimoto Y, Okazaki M, Suzuki M, Fujihira H, Noji M, Denda-Nagai K, Mogushi K, Nakai K, Saito M, Irimura T. Evaluation of Mucin 1 glycoprotein expression in estrogen receptor-positive primary breast cancer as a predictive marker of neoadjuvant chemotherapy effects and patient outcomes. Mucins in Health and Diseases, 14th International Workshop on Carcinoma-Associated Mucins. Cambridge, UK, July 24-28, 2017.

〔図書〕(計1件)

入村達郎・伝田香里監訳 プレイフェア「感染と免疫 第4版」264ページ 東京化学同人

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

入村 達郎 (IRIMURA, Tatsuro)  
順天堂大学・医学研究科・特任教授  
研究者番号：80092146