

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860883

研究課題名(和文)メラノーマ幹細胞をプロモートする新たな内皮細胞由来因子の同定

研究課題名(英文) Identification and characterization of endothelium-derived factors that promote melanoma stem cells

研究代表者

白石 研 (Shiraiahi, Ken)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80710863

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)：共培養実験によりリンパ管内皮細胞がメラノーマ幹細胞の自己複製能を強力にサポートすることが分かった。124個の遺伝子プライマーを用いたスクリーニングで、メラノーマ幹細胞との共培養によりリンパ管内皮細胞におけるCXCL9、10、11の発現が著しく亢進した。リコンビナントのCXCL10、CXCL11蛋白はメラノーマ幹細胞の自己複製能を有意に亢進させ、CXCR3の中和抗体は自己複製能を著しく抑制させた。メラノーマ幹細胞にはCXCR3が強く発現しており、リンパ管内皮細胞から分泌されるCXCL10、CXCL11が、CXCR3を介してメラノーマ幹細胞を強力にサポートすることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Co-culture of lymphatic endothelial cells (LECs) with melanoma stem cells revealed that LECs promoted the self-renewal of melanoma stem cells, as evidenced by increased sphere formation capacity. Using RT-PCR-based transcriptional profiling, we found that the chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11 were strongly expressed by LECs when co-cultured with CSCs. Addition of recombinant CXCL10 or CXCL11 promoted sphere formation of melanoma stem cells, and sphere formation was significantly inhibited by a CXCR3 neutralizing antibody. The expression of CXCR3 was strongly increased in sphere-forming melanoma cells compared to melanoma cells in adherent cultures and that CXCR3 is also expressed by a subpopulation of tumor cells in human malignant melanomas of the skin. Together, these findings indicate an important role of CXCR3 activation in the maintenance of CSCs and suggest that CXCR3 blockade might represent a novel therapeutic strategy to specifically target melanoma stem cells.

研究分野：皮膚悪性腫瘍

キーワード：メラノーマ 癌幹細胞 リンパ管内皮 ニッチ

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌幹細胞について

近年、幹細胞生物学と新たな免疫不全マウスモデルの開発に伴い、癌幹細胞説を支持する報告が急速に増加している。癌幹細胞とは自己複製能と多分化能を併せ持つ、腫瘍の中の稀な細胞の小集団である。癌幹細胞の最初の発見は1997年にBonnetとDickらが白血病細胞の中からCD34+CD38-の細胞小集団を分離したことに始まる。彼らは、このマーカーを持つ細胞小集団がNOD/SCIDマウスにおいて腫瘍を形成する能力があることを示した。(Nature Medicine 3; 730-737, 1997) 固形腫瘍においては2003年、乳癌においてCD44+CD24-細胞が乳癌幹細胞マーカーとして初めて報告された。(Proc Natl Acad Sci U S A 100; 3983-8, 2003) その後、メラノーマを含む多くの固形腫瘍(脳腫瘍、肝腫瘍、膵臓癌、肺腫瘍、大腸癌、前立腺癌など)で癌幹細胞が同定されている。

(2) 癌幹細胞と化学療法抵抗性

癌幹細胞は腫瘍形成能力を持つだけでなく化学療法抵抗性を持つ。そのため従来の化学療法ではそれらを完全に抑えることができず、腫瘍の転移と再発を引き起こす。癌幹細胞が化学療法抵抗性を持つ理由には次の2つが考えられている。一つは、それらが非常に高い薬剤排出能力を有していること。もう一つは、それらがニッチと呼ばれる腫瘍微小環境により保護され、細胞周期を休止期に維持されていることが挙げられる。では、化学療法抵抗性を持つこれらの癌幹細胞を、正常の幹細胞を傷付けることなく特異的に標的にするにはどうすればよいか？

(3) 癌幹細胞とニッチの相互作用

ニッチは、免疫細胞、線維芽細胞、脂肪細胞、内皮細胞、細胞外マトリックスなど様々な物質により構成されている。近年、これらのニッチが癌幹細胞の自己複製能(self-renewal)や幹細胞性(stemness)の維持に非常に重要であることが明らかになっている。しかし、癌幹細胞とニッチの相互作用については未だ不明な点が多い。もし、これらの相互作用が癌幹細胞の維持に重要であるならば、それを媒介する物質を特定し、それをブロックすることで、癌に対する新たな治療アプローチを構築できるのではないかと考えられた。

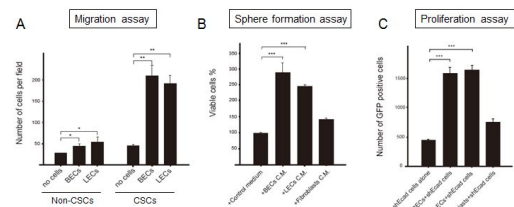
(4) 癌幹細胞と血管・リンパ管内皮細胞

本研究はニッチの中でも特に血管・リンパ管内皮細胞に焦点を当てた。その理由は一つに、血管・リンパ管内皮細胞は癌の転移に非常に重要な役割を持つことから、同細胞由来の特異的因子を同定することは癌の転移メカニズム解明の上で非常に必要な意義がある。そして、もう一つは、これまで血管・リンパ管内皮細胞がいかに癌幹細胞

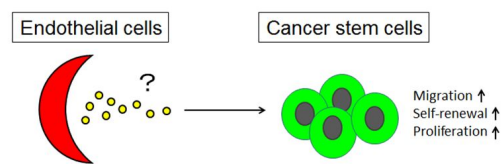
のニッチとして機能しているかはほとんど解明されていない。過去の報告では、VEGF (Nature 478; 399-403, 2011)、nitric oxide(Cell Stem Cell 6:141-52, 2010)が血管内皮細胞から遊離し、癌幹細胞をサポートする因子として同定されている。しかし、これらの物質以外にも、より強力に癌幹細胞の機能をサポートする物質が存在するのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、メラノーマ幹細胞と血管・リンパ管内皮細胞との相互作用を調べ、幹細胞の維持に重要な新たな特異的因子を同定し、それを標的とすることでメラノーマに対する新規の治療アプローチを開発することである。以前より既に、研究代表者は乳癌幹細胞と血管・リンパ管内皮細胞との共培養システムを構築し、内皮細胞のコンディショニングメディウム中に乳癌幹細胞の遊走能、自己複製能、増殖能を著しく亢進・サポートする物質が存在するというデータを得ている。(下図)



更に、コンディショニングメディウム中のいかなる物質が乳癌幹細胞をサポートしているのかを調べるために、共培養と定量PCRを用いたスクリーニング法を確立。それにより、内皮細胞が分泌するある特定因子が乳癌幹細胞を強力にプロモートすることを明らかにした。(未発表データ)今回は、同じシステムを用いて、メラノーマ幹細胞を制御する新たな内皮細胞由来因子の同定を試みる。



3. 研究の方法

(1) 内皮細胞のメラノーマ幹細胞に対する影響

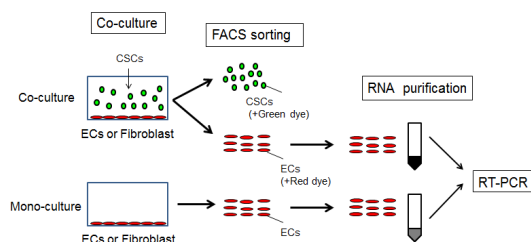
内皮細胞のメラノーマ幹細胞に対する影響を調べるために次の3つの実験を行う。

Boyden Chamberを用いた共培養遊走アッセイ 内皮細胞の培養上清を用いた sphere formation assay. コントロールには通常の stem cell medium 及び Fibroblast の培養上清を用いる。同じディッシュ内で両細胞を直接共培養させた場合におけるメラノーマ幹細胞の形態学的変化、生理的变化、

増殖能などを調べる。これらの実験から、内皮細胞が、自身が分泌する何らかの物質を介してメラノーマ幹細胞の遊走能、自己複製能、増殖能等を促進できるかどうかが明らかとなる。

## (2) 共培養と定量 RT-PCR を用いたスクリーニング

内皮細胞由来のいかなる因子がメラノーマ幹細胞に影響するのかを調べるために共培養と定量 RT-PCR を用いたスクリーニングを行う。



上図のように、2つのディッシュを用意する。1つは、同じディッシュ内に内皮細胞(ECs)とメラノーマ幹細胞(CSCs)を共培養したディッシュ。もう一つは、内皮細胞のみを単独培養したディッシュ。そして、共培養48時間後に、FACSを用いて、メラノーマ幹細胞と内皮細胞を分離・収集する。[共培養前にメラノーマ幹細胞には Green dye(Cell Tracker Green CMFDA Molecular Probes® invitrogen)を、内皮細胞には Red dye(Cell Tracker Red CMTPX Molecular Probes® invitrogen)をラベルしておく。] 次いで、共培養から分離した内皮細胞と単独培養した内皮細胞から RNA 抽出を行い定量 RT-PCR を行う。(注:ここで、より内皮細胞特異的な分泌因子を見つけるために内皮細胞の代わりにコントロールとして Fibroblast でも同様に行う。以前の我々の乳癌幹細胞を用いた実験では Fibroblast は内皮細胞ほど幹細胞に影響を与えなかった。よって、定量 PCR 後の解析時に Fibroblast のデータも利用して比較検討する。)スクリーニングに用いる遺伝子プライマーは独自に選択した計124個のプライマーを用いる。これらの遺伝子は、ケモカイン、インターロイキン、Growth factor など、cell-cell communication や immuno response に重要な分泌因子である。同プライマーは研究代表者によりすでに設計・注文済みであり研究代表者が保管している。

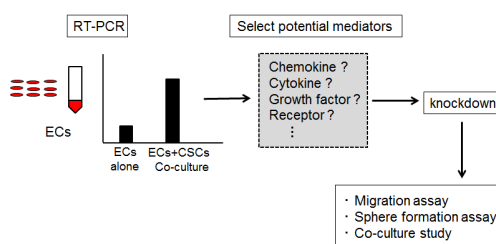
Chemokine Ligands(C-C motif)	CCL1 CCL15	CCL2 CCL16	CCL3 CCL19	CCL4 CCL20	CCL5 CCL21	CCL8 CCL22	CCL11 CCL23	CCL13 CCL24
Chemokine Ligands(C-X-C motif)	CXCL1 CXCL10	CXCL2 CXCL11	CXCL3 CXCL12	CXCL4 CXCL13	CXCL5 CXCL16	CXCL6 CXCL16	CXCL7 PPBP	CXCL9 XCL1
Interleukins	IL1A IL7 IL15 IL24	IL1B IL8 IL16 IL27	IL1RN IL9 IL17A IL27	IL2 IL10 IL11 IL17F	IL3 IL18	IL4 IL5 IL12A IL21	IL6 IL12B IL22	IL8 IL13 IL23A
Interferons	IFNA1	IFNA2	IFNA4	IFNA5	IFNA8	IFNB1	IFNG	IFNK
Growth Factors	VEGFA PDGFB NT4 LIF	VEGFB PDGFC CNTF MSTN	VEGFC PDGFD HGF NODAL	VEGFD IGF1 SCF OSM	bFGF IGF2 CSF1 THPO	FGF1 NGF CSF2 PTN	FGF12 BDNF CSF3 PLGF	PDGFA NT3 GPI KGF
TGFβ	TGFB1	TGFB2	TGFB3					
BMP	BMP1	BMP2	BMP3	BMP4	BMP5	BMP6	BMP7	
Hedgehog Family Members	DHH	IHH	SHH					
Wnt	WNT1 WNT7A	WNT2 WNT7B	WNT3B WNT8A	WNT3 WNT10A	WNT3 WNT16	WNT4	WNT5A	WNT6

## (3) スクリーニングの解析

メラノーマ幹細胞と共培養することで5倍(あるいは10倍)以上発現の上昇が見られた遺伝子をリストアップする。候補遺伝子の数が多すぎて絞りきれない場合には fibroblast をコントロールに用いた解析を参考にし、より内皮細胞特異的な因子の候補を見つける。

## (4) 目的とする遺伝子の同定

過去の文献などあらゆる情報を収集し、リストの中から可能性の高い候補遺伝子を絞り込む。次いで同因子に対するブロッキング抗体やレセプターに対する中和抗体、shRNA等を用いてノックダウンさせ、メラノーマ幹細胞に対する抑制効果(遊走能、sphere formation、増殖能)を確認する。



もし同因子がリガンド蛋白であれば、メラノーマ幹細胞におけるレセプターの発現を免疫プロット法および免疫組織染色等により確認する。

## (5) Vivo における抑制効果の検討

Vitro での抑制効果が vivo でも同様に見られるかを確認するため、NOD/SCID マウスを用いて、同因子を阻害した状況下でのメラノーマ幹細胞の腫瘍形成能および転移能の抑制効果を明らかにする。例えば、同定した因子が何らかのリガンド蛋白であれば、そのレセプターをターゲットとする shRNA (およびコントロール shRNA) をレンチウィルスを用いてメラノーマ幹細胞に導入し stable の cell line を構築する。次いで、両細胞を同じ数、マウスに注入し、腫瘍の抑制効果、転移抑制効果、浸潤能などを比較検討する。両者に明らかな差が見られれば、同因子に対するインヒビターの開発を学外の組織と協力して推進させ、実際にヒトに対して応用可能かどうか、副作用等を十分検討した上で、治療が可能な方向にプロジェクトを進めていく。

## 4. 研究成果

### (1) 内皮細胞のメラノーマ幹細胞に対する影響

前述の共培養システムを用いて、内皮細胞のメラノーマ幹細胞に対する影響を調べたところ、下図のようにリンパ管内皮細胞(LECs)がメラノーマ幹細胞の自己複製能を強力にサポートする結果が得られた。

**LECs promote the self-renewal of melanoma stem cells**

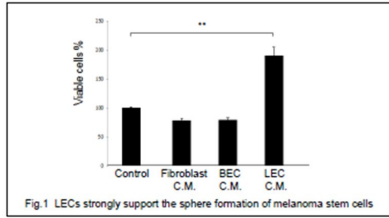
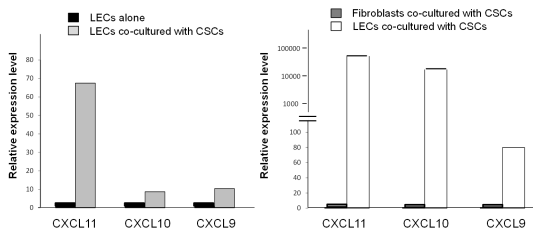


Fig. 1 LECs strongly support the sphere formation of melanoma stem cells

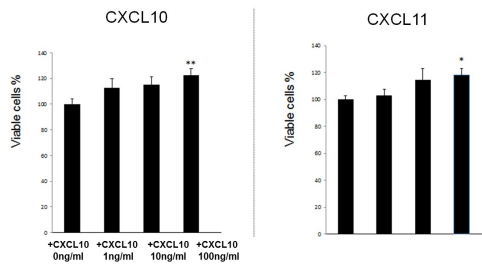
**(2) 共培養と定量 RT-PCR を用いたスクリーニングと解析**

124 個の遺伝子プライマーを用いて共培養による遺伝子発現プロファイリングを行った結果、メラノーマ幹細胞と共培養することで、リンパ管内皮細胞における CXCL9、10、11 の発現が著しく亢進することが分かった。Fibroblasts と比較しても、これらの遺伝子の発現は亢進しており、リンパ管内皮細胞特異的な分泌因子であることが分かった。(下図)

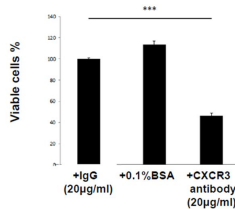


**(3) 目的とする遺伝子の同定**

実際に、リコンビナントの CXCL10、CXCL11 蛋白をメラノーマ幹細胞の培地に添加して sphere formation assay を行うと、両者ともにメラノーマ幹細胞の自己複製能を有意に亢進させることが分かった。

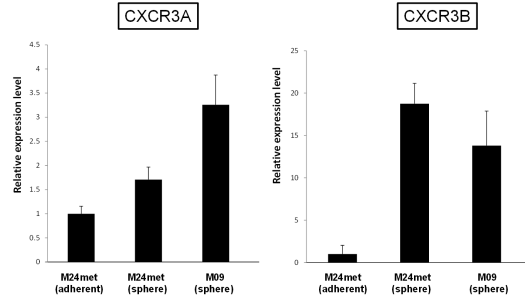


また、CXCL9、CXCL10、CXCL11 のレセプターである CXCR3 の中和抗体を用いて、sphere formation assay を行うと、メラノーマ幹細胞の自己複製能が著しく抑制することが明らかとなった。

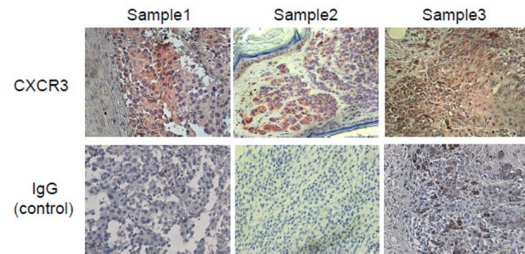


Sphere formation by melanoma stem cells with CXCR3 neutralizing antibody

次に、メラノーマ幹細胞における CXCR3 の発現を real time RT-PCR で調べた。メラノーマ幹細胞 (sphere) における CXCR3 の発現は、通常の接着培養時 (adherent) と比較して明らかに増強していることが分かった。

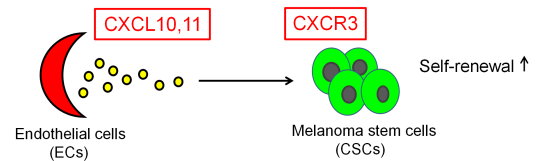


更に、メラノーマの組織における CXCR3 の発現を CXCR3 抗体を用いて免疫組織学的に検討した結果、メラノーマでは CXCR3 が強発現しており、その染色は一部の細胞集団でより強く認められた。



現在、我々は CXCR3 を stable にノックダウンしたメラノーマ幹細胞を作成し、同細胞を NOD/SCID マウスの皮下に注射し、形成される腫瘍の形成能や転移能の抑制効果を検討中である。

本研究により、リンパ管内皮細胞から分泌される CXCL10、CXCL11 が、CXCR3 を介してメラノーマ幹細胞の自己複製能を強力にサポートすることが明らかとなった。(下図)



血管・リンパ管内皮細胞と癌幹細胞の相互作用に関する研究はこれまで癌の転移メカニズムを解明する上で非常に重要なテーマであり今後大きく発展する領域である。現在までに癌幹細胞を制御する物質として同定された因子は非常に限られ、更に実際に治療として用いられ効果を得ている物質はほとんど存在しない。特に、リンパ管内皮細胞は癌の転移に非常に重要な役割を持つことから、同細胞由来の特異的因子を同定することは癌の転移メカニズム解明の上で非常に意義がある。また、共培養システムを確立し、FACS 分離により 2 種類の細胞の遺伝子発現

を比較、スクリーニングする方法は、多くの時間と労力を要したが、目的とする因子を特定する上で最も確実な方法であった。本研究により、メラノーマ幹細胞を制御するリンパ管内皮細胞由来の分泌因子が特定できた。従来の抗癌剤に加えて、メラノーマ幹細胞とリンパ管内皮細胞の相互作用を特異的に遮断する薬剤 (CXCR3 阻害剤) を併用することにより、再発、転移のないメラノーマの完全消滅が得られる可能性が示唆された。今回は、メラノーマ幹細胞を用いて遂行したが、本研究は、癌幹細胞が同定されている他の多くの癌 (白血病、脳腫瘍、肝腫瘍、膵臓癌、肺腫瘍、大腸癌、前立腺癌など) にも応用できる可能性が高い。このように、ニッチとの相互作用をブロックすることによりメラノーマ幹細胞の自己複製能を特異的に抑制する薬剤は、一度転移してしまうと全く手をつけられなかった進行性のメラノーマ患者に対して新たな治療戦略となり得ると期待される。

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5件)

1. Nanba D, Toki F, Tate S, Imai M, Matsushita N, Shiraishi K, Sayama K, Toki H, Higashiyama S, and Barrandon Y.

Cell motion predicts human epidermal stemness  
The Journal of Cell Biology(JCB); 209: 305-315, 2015. 査読有り

2. Murakami M, Masuda K, Utsunomiya R, Oda F, Namba C, and Sayama K.

Cefcapene pivoxil hydrochloride is a potentially new treatment for palmoplantar pustulosis with pustulotic arthro-osteitis  
Dermatology; 231: 304-311, 2015 査読有り

3. Murakami M, Kaneko T, Nakatsuji T, Kameda K, Okazaki H, Dai X, Hanakawa Y, Tohyama M, Ishida-Yamamoto A, and Sayama K.

Vesicular LL-37 contributes to inflammation of the lesional skin of palmoplantar pustulosis  
PLOS ONE; 9: e110677, 2014. 査読有り

4. Murakami M, Kaneko T, Nakatsuji T, Kameda K, Okazaki H, Dai X, Hanakawa Y, Tohyama M, Ishida-Yamamoto A, and Sayama K.

Vesicular LL-37 contributes to inflammation of the lesional skin of palmoplantar pustulosis  
PLOS ONE; 9: e110677, 2014. 査読有り

5. Shiraishi K, Sasaki S, Sadamoto Y.

Cutaneous mucormycosis in a patient with acute lymphocytic leukemia  
Eur J Dermatol. 24(1):116-117, 2014. 査読有り

[学会発表](計6件)

1. 白石 研, 佐山浩二 「表皮角化細胞における Smurf の機能解析」  
第 67 回日本皮膚科学会西部支部大会  
2015 年 10 月 17 日、長崎新聞文化ホール、長崎市

2. Shiraishi K, Dai X, Murakami M, Tohyama M, Matsushita N, Imamura T, and Sayama K. Smurfs E3 ubiquitin ligases negatively regulate TGF-beta signaling in keratinocytes  
Society for Investigative Dermatology 2015 Annual meeting, Atlanta GA, 5/6-9, 2015.

3. Oda F, Murakami M, Hanakawa Y, Tohyama M, Nakano N, and Sayama K.  
A case of blau syndrome/ Early onset sarcoidosis  
23th World congress of dermatology, Vancouver, Canada, 6/8-13, 2015.

4. 白石 研 「癌幹細胞をプロモートする新たなリンパ管内皮細胞由来因子の同定」  
第 38 回日本リンパ学会総会  
2014 年 6 月 20 日、北里大学白金キャンパス 薬学部コンベンションホール、東京都港区

5. Dai X, Okazaki H, Hanakawa Y, Murakami M, Tohyama M, Shirakata Y, and Sayama K. Eccrine sweat contains IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-31 and activates epidermal keratinocytes as a danger signal  
Society for Investigative Dermatology, New Mexico, 5/6-10, 2014.

6. Murakami M, Masuda K, Utsunomiya R, Oda F, Namba C, and Sayama K.  
The possible treatment with cefcapene pivoxil hydrochloride for palmoplantar pustulosis with pustuloarthro-osteitis  
German-Japanese Society of Dermatology, Hyidelberg, Germany, 6/11-14, 2014.

6. 研究組織

(1)研究代表者

白石 研 (Shiraishi, Ken)  
愛媛大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：80710863

(3)連携研究者

村上 正基 (Murakami, Masamoto)  
愛媛大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：20278302

花川 靖 (Hanakawa, Yasushi)  
愛媛大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：90284398