

201136003A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

固形がん幹細胞を標的とした革新的治療法の開発に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 正樹

平成 24 (2012) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告

固形がん幹細胞を標的とした革新的治療法の開発に関する研究	1
森正樹(大阪大学)	

II. 分担研究報告

1. 固形癌幹細胞を標的とした高分子ミセル型 DDS の開発	8
片岡一則(東京大学大学院工学系研究科)	
2. iPS 細胞技術を利用した難治性消化器癌に対する新規免疫再生療法の開発	14
中内啓光(東京大学大学院医学系研究科)	
3. 難治性消化器癌幹細胞の代謝特性を標的とした治療戦略の開発	16
佐谷秀行(慶應義塾大学医学部先端医科学研究所)	
4. 癌幹細胞のマイクロ RNA 制御とエクソソーム DDS による治療応用	19
落谷孝広(国立がん研究センター)	
5. 細胞初期化技術を用いた癌幹細胞の分化転換および 分化誘導方法の開発と、その癌治療への応用	22
山田泰広(京都大学 iPS 細胞研究所)	
6. 固形がん幹細胞を標的とした革新的治療法の開発に関する研究	24
石井秀始(大阪大学)	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	28
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	35
-----------------	----

固形がん幹細胞を標的とした革新的治療法の開発に関する研究

研究代表者 森 正樹 大阪大学大学院 消化器外科 教授

研究要旨

癌は我が国の死亡原因の第1位である。消化器癌はその大半を占め、その根治は国民的喫緊の課題である。癌医療改善の加速施策に資するために、固形癌幹細胞を標的とする革新的な治療技術の研究開発を提案する。固形癌幹細胞は周囲の微小環境(ニッチ)中に半休眠状態で生存し、そこから大量の娘癌細胞が発生する。現行の治療法では娘癌細胞のみを殺して副作用が増強し、残存する微量癌幹細胞から再発・転移が発生する点が問題である。近年、新しい再プログラム化技術の開発等により、細胞の性質を根本から大きく変換させることが実現可能となってきた。この技術を用いて二方面からアプローチした。

第一は固形癌幹細胞の治療感受性を格段に増感させる。

第二に宿主細胞に細胞リプログラミング技術で操作を加えて癌幹細胞を標的とする細胞を作成する。これら革新的な新技術を応用し、画期的な癌治療研究開発を促進し近未来における実現に向けて基盤を構築する。倫理面では行政および施設内規則の定めるところを遵守し、円滑かつ効果的な厚生行政の推進に貢献できると期待する。

A. 研究背景、目的
(背景)

実験腫瘍学の祖、吉田富三はすでに1952年に、実験的ラット肉腫が、各腫瘍特異的な「stem cell」(癌幹細胞)に由来するという仮説を提唱している(JNCI, 1952)。腫瘍組織に少数存在する癌幹細胞のみが腫瘍を構築できるという考え方であった。ヒト悪性腫瘍においてこの仮説を証明することは困難を極めたが、1990年代になって効率の良い異種移植モデルが開発され、さらにフローサイトメリーによる細胞分離技術の進歩により白血病の癌幹細胞候補分画が報告され(Dick et al, Nat Med, 1997)、癌幹細胞研究の基礎が築かれた。本領域内の各研究者は、この領域の進歩に大きな役割を果たしてきた。森らは、消化器癌の癌幹細胞を初めて報告し(Stem Cell 2006)、その後、消化器癌幹細胞では酸化ストレス応答が異常であり、このことが抗癌剤耐性

の重要な原因となっていること(JCI 2010)、消化器癌細胞も正常細胞と類似の方法でリプログラミング可能であることを(PNAS 2010)などを報告した。山田らは、iPS細胞の山中因子の発見より以前の段階で、高度な核移植技術により癌細胞もリプログラミング可能であることを初めて報告し(Gene Development 2004)、胚性幹細胞で未分化性を維持する因子と誘導する因子を初めて区別し、高精度のリプログラミングに向けて基盤を構築した(Cell Stem Cell 2010)。これらは本申請の前身の厚生労働科研費で一部補助された(代表者:森正樹)。中内らは、造血幹細胞の自己複製機構の全容解明、さらには誘導型多能性幹細胞の作出技術の確立を通じて、世界トップレベルの業績を得て研究拠点の構築に発展させた(Nature 2009; Cell Stem Cell 2010; Cell 2010 他)。固形癌においては、森・山田・石井らは消化器癌(JCI 2010、Carcinogenesis

2008)、落谷らは乳癌(Nat Med., 2008)の癌幹細胞集団分画を同定した(Stem Cell 2005)。癌幹細胞集団には、細胞分裂を停止した G0 期にある休眠癌幹細胞が濃縮されており、これが癌幹細胞の放射線および薬剤耐性機構のひとつであると考えられた。中内ら(Cell Stem Cell 2010; Blood 2009) は、世界をリードして幹細胞における生物学的特徴を究明し、これらは癌幹細胞の自己複製にも使用されている。佐谷(Cancer Cell 2011)らは、癌幹細胞の治療抵抗性に酸化ストレス回避機能が関与していることを、消化器癌モデルを用いて見出している。癌幹細胞化メカニズムに関して、佐谷・落谷・中内らは癌幹細胞化過程を癌関連遺伝子の導入により人為的に再構築することに成功した。逆に森・佐谷らは、癌幹細胞は可塑性を保持し、正常幹細胞へのリプログラミングも可能であることを報告した(PNAS 2010)。本申請で最も重要となる中長期計画として臨床への橋渡し研究に於ける DDS で、片岡・落谷らは、膵癌の微小環境(ニッチ)に集積する高分子ミセル型 DDS の開発(Cancer Res. 2010)や乳癌に於けるマイクロ RNA の DDS に向けた基盤整備を完了しており(Nature Med 2008; JBC 2009; JBC 2011)、準備万端である。例えば、「癌幹細胞の特徴である細胞周期の静止期性をいかに破るか」という課題は、片岡・落谷らの DDS により癌幹細胞(森・佐谷・山田・石井)とニッチ(片岡・中内・森)のいずれかの機能を障害することで達成される。以上のように、消化器癌幹細胞を特異的に排除するためには、消化器癌幹細胞とそれを育む宿主要因の成り立ちと役割を同時に研究することが必要不可欠であり、中長期計画での臨床応用に向けて着実な進歩が期待できる。

(目的)

造血器腫瘍等の化学療法に高感受性を示す腫瘍に対する治療では、治療により腫瘍の縮小を含む顕著な縮小効果が期待できて治癒を目指した治療戦略となるが、それとは対照的に、消化器癌等の固形癌では一般に化学療法に低感受性であり、手術不適応の進行癌は極めて難治性であり、その克服は国民の喫緊の課題である。その克服のために、癌幹細胞と呼ばれる治療抵抗性細胞の生物学的弱点を先端的基礎研究によって明らかにし、それらの所見を強力な共同研究体制によって融合、増幅することによりトランスレーショナル研究を推進し、最終的には革新的治療法の開発とその実施を達成することを目的とする。その目標達成のために、新しいリプログラミング技術を用いて癌幹細胞の性状を大きく変換させ、また同技術を用いて宿主免疫細胞(リンパ球・ニッチ)に対しては、リンパ球等免疫担当細胞の大幅な賦活化を図り、ニッチ制御による兵糧攻めを加えて、固形癌治療効果を最大限に高める。

B. 研究方法

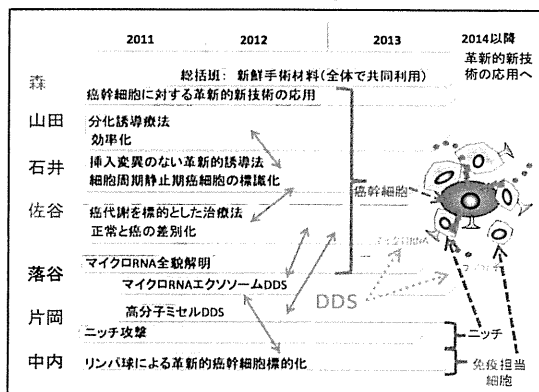
固形癌幹細胞は周囲の微小環境(ニッチ)中に半休眠状態で生存し、そこから大量の娘癌細胞が発生する。現行の治療法では娘癌細胞のみを殺して副作用が増強し、残存する微量癌幹細胞から再発・転移が発生する点が問題である。近年、新しいリプログラミング(RP)技術の開発等により、細胞の性質を根本から大きく変換させることが実現可能となってきたため、これら革新的新技術を応用し、画期的な癌治療研究開発を促進し近未来における実現に向けて基盤の構築に努めた。

具体的計画として、

●直接『固形癌幹細胞』に対して、新技術を応用し治療感受性を格段に増感させ細胞死を誘導する(分担者山田・石井らと共同)。癌幹細胞をより高精度に標的化するために表面抗原分子や代謝特性の解析を進める(分担者佐谷らと共同)

●『宿主細胞』に新技術で操作を加えて、癌幹細胞に対して間接攻撃する方法を開発し悪性細胞を根絶する。この宿主細胞の操作に際しては二次的癌化の回避等を配慮した新しい技術の開発が望まれる(分担者中内らと共同)。具体的なツールとしてマイクロ RNA(分担者落谷らと共同)およびナノ分子(分担者片岡らと共同)の基盤整備を進める。

●実現化に向けたプラットフォームとして、臨床・研究部門の一体型施設(大阪大学消化器外科)として豊富な新鮮臨床材料の迅速なトランスレーショナル研究推進の優位性を担保して研究計画を推進する。



新鮮臨床材料を用いた研究を開始し、全体計画の完成時期に於ける前臨床研究から臨床応用への橋渡しのための基盤を構築する(総括班)。

本申請の代表者、分担者が一丸となって、オールジャパンの目的を達成できるように効果

的・円滑な運営に努める。

(倫理面への配慮)

●実験動物使用を含む研究計画:

動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示第88号)、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年文部科学省告示第71号)、大阪大学動物実験規則を遵守する。

●ヒトゲノム・遺伝子解析研究を含む研究計画:

平成16年度に改正された文部科学省、厚生労働省、経済産業省によるヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき研究を遂行する。ヘルシンキ条約に則りインフォームドコンセントを行い、同意の得られた検体のみを使用し、個人情報の匿名化と守秘は厚生労働省および大阪大学の既定に則って行う。

●遺伝子組換え実験を含む研究計画:

遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律(「バイオセーフティに関するカルタヘナ議定書」に基づくカルタヘナ法)の定める細則と、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の定める細則、ならびに施設内の組み換え DNA 実験指針の基準に従って、定められた基準に適合することを確認し、指針に従って DNA 組み換え実験委員会等の倫理審査委員会の審査を経る手続きを適切に行う。

●臨床研究に関する倫理指針:

厚生労働省(臨床研究に関する倫理指針)お

よび大阪大学の既定の指針および細則、規則に則って、円滑に臨床研究を行うために研究者等が遵守すべき事項に従う。

●疫学研究に関する倫理指針：

厚生労働省（臨床研究に関する倫理指針）および大阪大学の既定の指針および細則、規則に則って、円滑に臨床研究を行うために研究者等が遵守すべき事項に従う。

●ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針：

厚生労働省（臨床研究に関する倫理指針）および大阪大学の既定の指針および細則、規則に則って、円滑に臨床研究を行うために研究者等が遵守すべき事項に従う。

●被験者の安全性の確保

被験者の安全性を確保するために、責任者及び分担者は、以下の基本的事項を遵守する。

1)責任者又は分担者は、被験者の選択基準及び除外基準を遵守する。

2)被験者が本研究の責任者と分担者以外の医師の治療を受ける場合には、本研究に参加していること及び本研究の内容を文書にて当該医師に通知する。

3)本研究終了後も出来る限り長期にわたって診察を行い、有害事象の発現の有無について注意を払う。

4)被験者が健康状態の異常を感じた場合には直ちに責任者又は分担者に連絡するよう指導する。

5)責任者又は分担者は、被験者に有害事象が生じ、治療が必要であると認めるときは、その旨を当該患者に伝え、適切な医療を提供

する。

●有害事象発現時の対応

有害事象の発現に際しては、適切な救急処置を施し、被験者の安全の確保に留意し、必要に応じて専門医師による診断を受けることにより原因究明に努める。被験者の臨床研究参加中及びその後を通じて、臨床上問題となる有害事象に対して十分な医療措置を講じる。

責任者は症例報告書に種類、発現日、程度、重篤か否か、経過及び臨床研究との因果関係等を記載する。また、発生した有害事象、特に本研究との因果関係が否定できない事象については、可能な限り追跡調査を行う。

C. 研究結果

本申請代表者（森）は、第3次対がん総合戦略研究事業で培った様々な実績を生かし、また東日本を含むオールジャパン体制でわが国の叡智を結集し、難病やがん等の疾病の原因究明や診断法・治療法・予防法の開発、再生医療技術の臨床実用化のための研究等を推進した。

(1) 世界で初めて、消化器癌幹細胞を同定、機能解析

自己複製細胞に特異的な染色法（Hoechst33342）により、SP（side population）から消化器癌幹細胞を同定した（*Stem Cell*, 2006他）。消化器癌幹細胞はCD13を表面抗原として発現し、同分子のアミノペプチダーゼN 酵素活性が活性酸素（ROS）スカベンジャー機能を介して還元型グルタチオン生合成を促進し、抗癌剤・放射線療法に対する抵抗性を示すことを解明した。CD13阻害剤を従来の

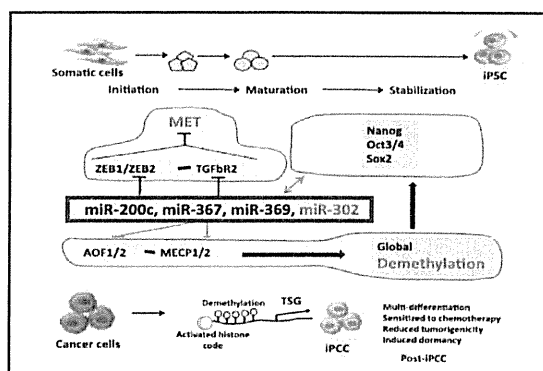
抗癌剤 (5FU) に併用すると抗腫瘍効果が格段に亢進し、癌幹細胞を標的とした革新的な医療に向けて基盤を構築した。

(2) 癌細胞のリプログラミング

高度なリプログラミングを簡便に行うために、万能 (iPS) 細胞の山中因子 (転写因子 Sox2, Oct3, Klf4, Myc) を用いて研究し、内胚葉系の消化器癌幹細胞は外胚葉系に容易に異分化しビタミン A, D や抗癌剤への感受性が格段に亢進、免疫不全マウスでの造腫瘍性が低下することを解明した。

(3) 人工合成リボ核酸によるリプログラミング

山中転写因子とは異なり、ウイルスベクターを使用しないでゲノム挿入変異を来さないリプログラミング方法を開発するために、人工合成マイクロ RNA のみによるリプログラミング技術を世界で初めて完成させた (*Cell Stem Cell*, 2011 他)。用いるマイクロ RNA は試行錯誤の末に同定した3種 (mir-200c, 302, 369) である。メカニズム解析からマイクロ RNA・リプログラミングに関わる重要な pathway を解明した



(*Cancer Sci.*, 2012 の Highlights として選抜掲載された; 図)。

D. 考察

本邦の国民の2人に一人が癌で死亡し、その

過半数が消化器癌である。初期の消化器癌は手術療法で完治できるが、30%を占める進行癌は難治である。難治性腫瘍組織の中に数%程度の癌幹細胞が含まれ、これが治療抵抗性・再発・転移の原因となる。本研究では、CD13 消化器癌幹細胞を同定し、その生物学的特徴を解明、分子標的化による革新的新治療を開発した。癌幹細胞は酸化ストレスに抵抗性を示し抗癌剤暴露から守られているので、この癌幹細胞を分子標的化することにより、腫瘍組織全体を崩壊に導くことが可能となる。

山中転写因子で消化器癌幹細胞をリプログラミングすると、p16INK4A等の癌抑制遺伝子プロモーターが脱メチル化により再活性化する。その結果、epigenetic に分化誘導剤・抗癌剤への感受性や細胞死が誘導され、従来の方法以上の高度な治療効果を実現する基盤を構築した。

3種の完全人工合成リボ核酸分子 (mir-200c, 302, 369) のみにより、脂肪幹細胞から出発して ES/iPS 細胞に類似の多能性を誘導することが出来た (epigenetic リプログラミング)。マウスでキメラマウス、生殖細胞系列への移行を認め、マウス・ヒトでテラトマを形成した。さらに癌細胞でこれらマイクロ RNA を導入すると、細胞の系譜を根本から変革させ、新たな治療策定に向けて基盤を構築した。

E. 結論

わが国の英知を結集して革新的な医療を創出し、国民病としての消化器癌の治療成績を大きく改善することが最終目標であり、このために確固たる基盤を構築し臨床へ橋渡しするために展開した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomimaru Y. Wada H., Marubashi S., Kobayashi S., Eguchi H., Takeda Y., Tanemura M., Noda T., Umeshita K., Doki Y., Mori M., Nagano H. Fresh frozen plasma transfusion does not affect outcomes following hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 16(44):5603 - 5610, 2010
- 2) Miyoshi N. Ishii H., Nagano H., Haraguchi N., Dyah LD., Kano Y., Nishikawa S., Tanemura H., Mimori K., Tanaka F., Saito T., Nishimura J., Takemasa I., Mizushima T., Ikeda M., Yamamoto H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. Reprogramming of Mouse and Human Cells to Pluripotency Using Mature MicroRNAs. *Cell Stem Cell* 8(6):633-638, 2011
- 3) Dyah Laksmi Dewi. Ishii H., Kano Y., Nishikawa S., Haraguchi N., Sakai D., Satoh T., Doki Y., Mori M. Cancer stem cell theory in gastrointestinal malignancies: recent progress and challenges. *J Gastroenterol* 24(10):1145-1157, 2011
- 4) Hirose H. Ishii H., Mimori K., Tanaka F., Takemasa I., Mizushima T., Ikeda M., Yamamoto H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. The Significance of PITX2 Overexpression in Colorectal Cancer. *Surg Oncol* 18(10):3005-3012, 2011
- 5) Dyah LD. Ishii H., Haraguchi N., Nishikawa S., Kano Y., Fukusumi T., Ohta K., Miyazaki S., Ozaki M., Sakai D., Satoh T., Nagano H., Doki Y., Mori M. Reprogramming of gastrointestinal cancer. *Cancer Sci*, 2011(in press)
- 6) Kim HM. Haraguchi N., Ishii H., Ohkuma M., Okano M., Mimori K., Eguchi H., Yamamoto H., Nagano H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. Increased CD13 Expression Reduces Reactive Oxygen Species, Promoting Survival of Liver Cancer Stem Cells via an Epithelial-Mesenchymal Transition-like Phenomenon. *Ann Surg Oncol*, 2011(in press)
- 7) Ohkuma M. Haraguchi N., Ishii H., Mimori K., Tanaka F., Kim HM., Shimomura M., Hirose H., Yanaga K., Mori M. Absence of CD71 Transferrin Receptor Characterizes Human Gastric Adenosquamous Carcinoma Stem Cells. *Ann Surg Oncol*, 2011(in press)
- 8) Tanemura K. Ohmura Y., Deguchi T., Machida T., Tsukamoto R., Wada H., Kobayashi S., Marubashi S., Eguchi H., Ito T., Nagano H., Mori M., Doki Y. Rapamycin Causes Upregulation of Autophagy and Impairs Islets Function Both In Vitro and In Vivo. *Am J Transplant*, 12(1):102-104, 2012
- 9) Hoshino H. Nagano H., Haraguchi N., Nishikawa S., Tomokuni A., Kano Y., Fukusumi T., Saito T., Ozaki M., Sakai D., Satoh T., Eguchi H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M., Ishii H. Hypoxia and TP53 Deficiency for induced pluripotent stem cell-like properties in gastrointestinal cancer. *Int J Oncol* (in press).

2. 学会発表

- 1) 森正樹: Cancer stem cell、第15回 日本がん分子標的治療学会 2011年6月22日～6月24日 東京
- 2) 田中文明、他: 20才以下の巨大線維腺腫3例の治療経験、第19回 日本乳癌学会、2011年9月2日～9月4日 仙台
- 3) 森正樹: Reduced Port Surgery の利点、欠点(3)(大腸-1)、第24回 日本内視鏡外科学会 2011年12月7日～12月9日 大阪
- 4) 森正樹: 消化器外科領域における癌診療の展望、第28回 日本医学会総会 2011年4月8日～2011年4月10日 東京
- 5) 森正樹: がん幹細胞研究の進展と治療展開、第49回 日本癌治療学会 2011年10月27日～10月29日 名古屋
- 6) 森正樹: Analysis of My Initial Laparoscopic Colectomy Experience: HALS Is the Best Option Including Ultra-Low Rectal Resection with TME. 第66回 大腸肛門病学会、2011年11月25日～11月26日 東京
- 7) Cancer stem cells in digestive organs: basic research and clinical application、

第 9 回 日本臨床腫瘍学会 2011 年 7 月 21 日～2011 年 7 月 23 日 横浜

- 8) 森正樹: 固形癌における癌幹細胞、Luminex テクノロジーセミナーPart.2、2011 年 11 月 4 日 大阪
- 9) 森正樹: 固形癌の癌幹細胞、再生医療研究会、2011 年 1 月 28 日 長崎
- 10) 森正樹: 再生医療と癌幹細胞、大阪府立急性期・総合医療センター 病診連携研修会 -がん治療ネットワーク-、2011 年 2 月 3 日
- 11) 森正樹: 進行再発胃癌に対する個別化化学療法、第 33 回 日本癌局所療法研究会、2011 年 6 月 11 日 大阪
- 12) 森正樹: 癌幹細胞と多能性幹細胞、第 8 回 日本免疫治療学研究会、2011 年 5 月 26 日 東京
- 13) 森正樹: 癌幹細胞と iPS、筑豊消化器病学会、2011 年 1 月 18 日 福岡

G. 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称: 誘導多能性幹細胞の製造方法

出願人: 国立大学法人大阪大学:
K20090215(平成21年10月20日)

出願日: 平成 22 年 2 月 18 日

出願番号: 特願 2010-34008

届出日: 平成 21 年 10 月 14 日

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

固形癌幹細胞を標的とした高分子ミセル型 DDS の開発

研究分担者 片岡一則 東京大学大学院工学系研究科/医学系研究科 教授

研究要旨

本研究では、固形がん幹細胞(CSC)の有効な治療法の確立に向けて、CSC が存在する微小環境(ニッチ)に集積し、さらに CSC の治療抵抗性を克服できる高分子ミセルの開発と CSC に対して優れた治療効果を示す薬剤を内包した高分子ミセルの開発を行なっている。本年度は、血管密度が低く、間質が豊富ながんに対して、50nm 以下の高分子ミセルががん組織の深部にまで到達できることを明らかにした。この結果より、CSC の存在するニッチに高分子ミセルを到達させるためには、ミセルの粒径を 50nm 以下に設計することが重要であるものと考えられる。一方、がん組織から抽出した SP(Side Population)細胞には CSC が含まれていると考えられているが、本研究では、様々な薬剤をがん細胞に作用させた後の SP 細胞分画の割合の変化をフローサイトメリーによって評価した。その結果、発生において重要な役割を担っているシグナル伝達経路を阻害する薬剤 X が細胞に対して優れた薬効を示すことが明らかになった。

A. 研究背景、目的 (背景)

これまでに悪性腫瘍(がん)に対する治療法は飛躍的な進歩を遂げてきたが、未だに根治することが困難な理由として、がん幹細胞の存在が示唆されている。がん幹細胞(Cancer Stem Cell, CSC)とは、腫瘍組織中に存在する自己複製能、多分化能を有する未分化な細胞分画であり、再発や転移の起点となるためにCSCを治療することががんの根治につながるものと考えられている。一方、CSCは、抗がん剤などの薬剤や放射線に対して抵抗性を持つことが知られている。この理由として、CSCが存在する微小環境(ニッチ)が血管から離れた低酸素領域(Hypoxia)に存在することやCSC自身が薬剤排出タンパク質や細胞内グルタチオン濃度の上昇により治療抵抗性を有することなどが挙げられている。

一方、研究分担者である片岡は、これまでに精密設計されたブロック共重合の自己会合により形成される高分子ミセル型 DDS(図 1)に関する研究を行ってきた。

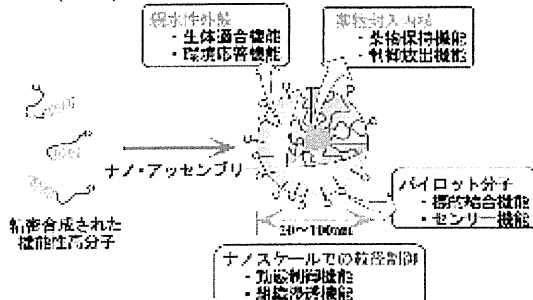


図 1. 高分子ミセル型 DDS の概念図

高分子ミセルは、内核に制がん剤などの疎水性薬剤を内包させることができ、表面が生体適合性の PEG で覆われているために生体内で異物として認識されず血中を長期滞留することができる。さらに、高分子ミセルは、Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果(腫瘍では血管壁の透過性の亢進と未発達なリンパ系の構築によって高分子物質が集積しやすい環境が形成されている効果)によって固形がんを選択的に集積し、優れた制がん活性を示すことが実証されている。現在までに、このような高分子ミセル型 DDS は、パクリタキセル、シスプラチン、SN-38、オキサリプラチンを内包したシステムの臨床治験が国内外で実施されている。

そこで本研究では、CSCの治療に向けて、(i)CSCが存在するニッチに対する高分子ミセルの集積能を評価し、さらに、(ii)CSCの治療抵抗性を担っている種々のバリアを克服するための高分子ミセルの設計と機能評価を行う。一方、(iii)CSCに対して高い治療効果を示す薬剤を選定し、その薬剤を内包した高分子ミセルを開発することにより、固形がんの画期的な治療法を実現することを目指す。

B. 研究方法

1) 高分子ミセルの腫瘍組織浸透性の評価
白金錯体制がん剤オキサリプラチンの中間活性体である (1,2-diaminocyclohexane) platinum(II) (DACHPt)を内包した高分子ミセルのマウス大腸がん C26 とヒト膵臓がん BxPC3 細胞の皮下移植モデルにおけるがん

組織浸透性を評価した。具体的には、蛍光標識された粒径 30、50、70、100nm の DACHPt 内包ミセルを調製し、そのがん組織浸透性を組織切片の蛍光顕微鏡観察ならびに in vivo 共焦点顕微鏡(ニコン A1-R)観察によって評価した。in vivo 共焦点顕微鏡観察では、30nm と 70nm のミセルをそれぞれ異なる蛍光色素で標識し、担がんマウスに同時に投与した後に、蛍光の分布の違いを評価した。

2) 種々の腫瘍モデルにおける SP 細胞の分画と SP 細胞に対して有効な薬剤の選定

SP(Side Population)細胞は、各組織に低率で存在する幹細胞的性質を有する細胞分画であり、がん組織から抽出した SP 細胞には CSC が含まれていると考えられている。そこで本研究では、ヒト悪性中皮腫 MSTO-211H 細胞に含まれる SP 細胞のフローサイトメトリーによる分画を行った。具体的には、Hoechst33342 にて染色した細胞を、縦軸に 424/44nm(青)・横軸に 585/42nm(赤)をプロットした二次元展開を行うことによって、通常の cell cycle アッセイでみられる G0/G1 および S/G2M の分画の他に、G0/G1 よりもさらに暗い部分に Hoechst 陰性の細胞集団を観察することができる(図 2)。本研究では、様々な薬剤を MSTO-211H 細胞に作用させた後に、SP 細胞分画の割合の変化を解析することによって SP 細胞に対して優れた薬効を示す薬剤のスクリーニングを行った。

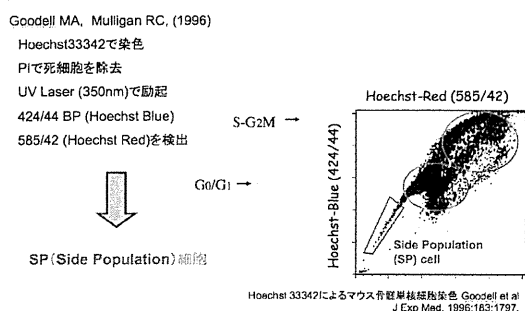


図 2. SP 細胞の分画

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

1) 高分子ミセルの腫瘍組織浸透性の評価

サイズの異なる DACHPt 内包ミセルのがん組織浸透性を評価した。その結果、血管密度

が高く、間質の少ない大腸がん C26 モデルにおいては、サイズの効果は認められず、すべてのミセルががん組織の深部にまで到達できることが明らかになった。一方、血管密度が低く、間質が豊富な膵臓がん BxPC3 モデルにおいては、50nm 以下のミセルはがん組織の深部まで到達したが、50nm 以上のミセルは腫瘍血管の辺縁部に滞留し、がん組織深部にまで到達することができなかった。以上の結果より、血管密度が低く、間質が豊富ながんに対して、がん組織深部に高分子ミセルを到達させるためには、ミセルの粒径を 50nm 以下に設計することが重要であることが示唆された。

2) 種々の腫瘍モデルにおける SP 細胞の分画と SP 細胞に対して有効な薬剤の選定

本研究では、様々な薬剤を MSTO-211H 細胞に作用させた後に、フローサイトメトリーによって SP 細胞分画の割合の変化の解析を行い、SP 細胞に対して優れた薬効を示す薬剤のスクリーニングを行った(図 3)。薬剤としては、シスプラチン等の古典的な制がん剤、CSC に対する有効性が報告されているラパマイシンなどの mTOR シグナル阻害剤、発生において重要な役割を担っているシグナル伝達経路を阻害する薬剤 X を用いた。

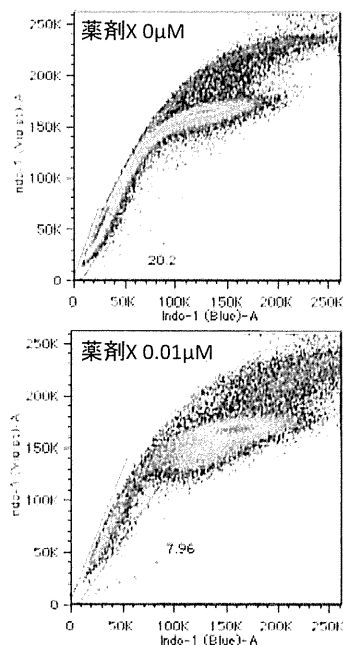


図 3. 薬剤 X 処理後の SP 細胞の割合の評価

その結果、シスプラチンやラパマイシンと比

較して、薬剤 X は SP 細胞の割合を効果的に減少させることが明らかになった(図 4)。また、薬剤排出タンパク質の阻害剤であるレセルピンを作用させることにより、SP 細胞が無くなることも確認され、薬剤 X は SP 細胞に対して優れた薬効を示すことが明らかになった。

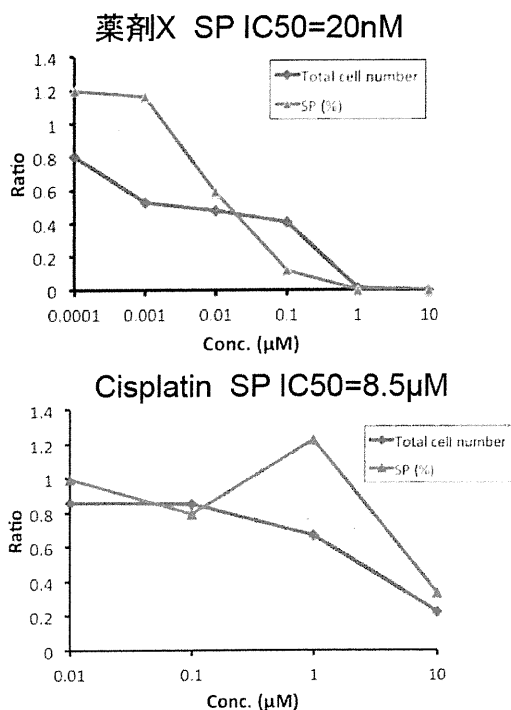


図 4. 異なる薬剤濃度における総細胞数、SP 細胞数の変化

D. 考察

本年度は、サイズの異なる高分子ミセルを調製し、異なる固形がんモデルにおけるがん組織浸透性を評価した。その結果、血管密度が低く、間質が豊富ながんに対して、50nm 以下の高分子ミセルががん組織の深部にまで到達できることが明らかになった。一般的に、CSC が存在する微小環境 (ニッチ) は、血管から離れた低酸素領域 (Hypoxia) に存在することが知られており、この結果より、CSC の存在するニッチに高分子ミセルを到達させるためには、ミセルの粒径を 50nm 以下に設計することが重要であるものと考えられる。今後は、固形がんモデルにおける CSC ニッチへの高分子ミセルの集積性をさらに詳しく解析していきたいと考えている。

一方、本研究では、様々な薬剤をヒト悪性中皮腫細胞 MSTO-211H 細胞に作用させた後の SP 細胞分画の割合の変化をフローサイトメ

トリーによって評価した。このスクリーニング評価の結果、発生において重要な役割を担っているシグナル伝達経路を阻害する薬剤 X が細胞に対して優れた薬効を示すことが明らかになった。今後は、薬剤 X を内包した高分子ミセルを開発し、その in vivo 応用を進めていく予定である。

E. 結論

本年度は、(i) 血管密度が低く、間質が豊富ながんに対して、50nm 以下の高分子ミセルががん組織の深部にまで到達できること、(ii) CSC が含まれると考えられる SP 細胞に対して薬剤 X が優れた薬効を示すことを明らかにした。(i)に関しては、高分子ミセルの CSC ニッチへの集積性をさらに詳しく解析し、(ii)に関しては、薬剤 X を内包した高分子ミセルを開発し、その in vivo 応用を進めていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Rafi, H. Cabral, M. R. Kano, P. Mi, C. Iwata, M. Yashiro, K. Hirakawa, K. Miyazono, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polymeric micelles incorporating (1,2-diaminocyclohexane)platinum (II) suppress the growth of orthotopic scirrhous gastric tumors and their lymph node metastasis. *J. Control. Release* in press
2. M. Baba, Y. Matsumoto, A. Kashio, H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, T. Yamasoba, Micellization of cisplatin (NC-6004) reduces its ototoxicity in guinea pigs. *J. Control. Release* 157 (1) 112-117 (2012)
3. T. Suma, K. Miyata, T. Ishii, S. Uchida, H. Uchida, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced stability and gene silencing ability of siRNA-loaded polyion complexes formulated from polyaspartamide derivatives with a repetitive array of amino groups in the side chain. *Biomaterials* 33 (9) 2770-2779 (2012)
4. H. -J. Kim, M. Oba, F. Pittella, T. Nomoto, H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, PEG-detachable cationic polyaspartamide derivatives bearing stearyl moieties for systemic siRNA delivery toward subcutaneous BxPC3 pancreatic tumor. *J. Drug Target.*

- 20 (1) 33-42 (2011)
5. H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M. R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Accumulation of sub-100nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat. Nanotech.* 6 (12) 815-823 (2011)
 6. R. J. Christie, K. Miyata, Y. Matsumoto, T. Nomoto, D. Menasco, T. -C. Lai, M. Pennisi, K. Osada, S. Fukushima, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Effect of polymer structure on micelles formed between siRNA and cationic block copolymer Comprising thiols and amidines. *Biomacromolecules* 12 (9) 3174-3185 (2011)
 7. F. Pittella, M. Zhang, Y. Lee, H. -J. Kim, T. Tockary, K. Osada, T. Ishii, K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity. *Biomaterials* 32 (11) 3106-3114 (2011)
 8. M. Oba, K. Miyata, K. Osada, R. J. Christie, M. Sanjoh, W. Li, S. Fukushima, T. Ishii, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Kataoka, Polyplex micelles prepared from ω -cholesteryl PEG-polycation block copolymers for systemic gene delivery. *Biomaterials* 32 (2) 652-663 (2011)
 9. M. Murakami, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Wu, M. R. Kano, T. Yamori, N. Nishiyama, K. Kataoka, Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting. *Sci. Transl. Med.* 3 (64) 64ra2 (2011)
 10. Y. Vachutinsky, M. Oba, K. Miyata, S. Hiki, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Miyazono, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified crosslinked polyplex micelles. *J. Control. Release* 149 (1) 51-57 (2011)
2. 学会発表
(国内学会)
1. 片岡一則, ナノテクノロジーが先導するドラッグデリバリーシステムの革新, 第 28 回日本医学会総会, 2011.04.09, 東京国際フォーラム, 東京, 教育講演
 2. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション ~超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー~, 第 38 回東京大学医科学研究所創立記念シンポジウム「最先端医療の現状と展望」, 2011.06.01, 東京大学医科学研究所, 東京, 招待講演
 3. 片岡一則, 超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー, 第 27 回日本 DDS 学会学術集会, 2011.06.09 東京大学本郷キャンパス, 年会長講演
 4. 片岡一則, ナノバイオが先導する未来医療, 北海道大学大学院薬学研究院特別講演, 2011.06.30, 北海道大学大学院薬学研究院, 札幌, 北海道, 招待講演
 5. 片岡一則, 核酸医薬品デリバリーのための超分子ナノキャリア設計, 千里ライフサイエンスセミナー「新しい先端医薬品としての核酸医薬品の戦略」, 2011.07.08, 千里ライフサイエンスセンタービル, 大阪府, セミナー
 6. 片岡一則, 超分子ナノデバイスによる遺伝子・siRNA デリバリー, アンチセンス・遺伝子デリバリーシンポジウム, 2011.09.02, 大阪大学コンベンションセンター, 吹田市, 大阪府, 特別講演
 7. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション ~超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー~, 大阪大学羅針塾, 2011.09.03, セントレジスホテル大阪, 大阪府, 招待講演
 8. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション ~超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー~, 新学術領域研究「バイオアセンブラ」第 1 回シンポジウム, 2011.10.12, トランスシティカンファレンス・丸の内, 東京都, 特別講演
 9. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション ~超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー~, 日本脳神経外科学会第 70 回学術総会, 特別企画「医工学と

- 脳神経外科」, 2011.10.14, パシフィコ横浜, 神奈川県, 特別企画講演
10. 片岡一則, 薬を患部に運ぶナノカプセル～医真菌学領域への応用の展望～, 第55回日本医真菌学会学術集会, 2011.10.21, 椿山荘, 東京都, 特別講演
 11. 片岡一則, “ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー～”, 第16回臨床BRM研究会, 2011.10.27, サイプレスガーデンホテル, 名古屋市, 愛知県, 特別講演
 12. 片岡一則, 高分子が先導するライフ・イノベーション～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～, 東京工業大学 COE 特別授業, 2011.11.10, 東京工業大学大岡山キャンパス, 東京都, 特別授業
 13. 片岡一則, 高分子ミセルによる抗がん剤のピンポイントデリバリー, 第33回日本バイオマテリアル学会, 2011.11.22, 京都テルサ, 京都府, 招待講演
 14. 片岡一則, 高分子ミセルによるドラッグデリバリー～その現状と将来展望～, 東京女子医科大学 櫻井靖久名誉教授追悼シンポジウム「医学・薬学・工学の融合を目指して」, 2011.12.02, 東京女子医科大学弥生記念講堂, 東京都, 招待講演
 15. 片岡一則, 学融合に基づく医療システムイノベーション, 東大病院先端医療開発部局合同シンポジウム「再生医療・細胞医療の早期実用化にむけた開発戦略」, 2011.12.17, 東京大学医学部 教育研究棟鉄門記念講堂, 東京都, 基調講演
 16. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～, 特許庁 先端技術研修会, 2011.12.22, 経済産業省別館, 東京都, 招待講演
- (国際学会)
1. K. Kataoka, Polymer Chemistry in Nanomedicine: Supra-molecular Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, 2011 Spring Meeting, Korean Polymer Society, 2011.04.07, Daejeon, Korea, 基調講演
 2. K. Kataoka, Self-assembled Nanostructures of Block Copolymers as Smart Vehicles for Gene and Drug Delivery, Seminar at Nankai University, 2011.05.06, Nankai University, Tianjin, China, 招待講演
 3. K. Kataoka, Supramolecular Structures of Block Copolymers as Smart Nanodevices for Gene and Drug Delivery, The 2nd FAPS Polymer Congress (FAPS-PC2011), 2011.05.09, China National Convention Center (CNCC), Beijing, China, 基調講演
 4. K. Kataoka, Self-assembled Nanodevices from Smart Block Copolymers for Gene and Drug Delivery, Distinguished Lecture at Waterloo Institute for Nanotechnology, University of Waterloo, 2011.05.19, University of Waterloo, Waterloo, Canada, Distinguished Lecture
 5. K. Kataoka, Smart Supramolecular Structures from Block Copolymer as Nanocarriers in Gene and Drug Delivery, 10th China-Japan-Korea Foresight Joint Symposium on Gene Delivery and International Symposium on Biomaterials 2011, 2011.05.30, Guilin, China, 基調講演
 6. K. Kataoka, Supramolecular Nanomedicines for Targeted Cancer Therapy, 23rd Pezcoller Symposium, 2011.06.17, Trento, Italy, 招待講演
 7. K. Kataoka, Supramolecular Nanodevices from Smart Block Copolymers for Gene and Drug Delivery, 2011 Gordon Research Conference “Cancer Nanotechnology”, 2011.07.17, Colby College, Waterville, ME, USA, 招待講演
 8. K. Kataoka, Can We Manage Penetration Barriers in Tumor Tissue by Tuning the Size of Nanocarriers?, 2011 Gordon Research Conference “Cancer Nanotechnology”, 2011.07.17, Colby College, Waterville, ME, USA, 招待講演
 9. K. Kataoka, Supramolecular Structures of Block Copolymers as Smart Nanodevices for siRNA Delivery, 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2011.07.30, Gaylord National Resort and Convention Center, National Harbor, Maryland, USA, 招待講演

- 10.K. Kataoka, Smart Polymeric Micelles from PEG-based Block Copolymers for Advanced Drug Delivery, 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2011.08.01, Gaylord National Resort and Convention Center, National Harbor, Maryland, USA, 招待講演
- 11.K. Kataoka, Self-Assembled Nanostructures of Block Copolymers as Smart Vehicles for Gene and Drug Delivery, Bayreuth Polymer Symposium 2011, 2011.09.11, Bayreuth, Germany, 基調講演
- 12.K. Kataoka, Self-Assembled Nanostructures of Block Copolymers as Smart Vehicles for Gene and Drug Delivery, Seminar at Friedrich Schiller University Jena, 2011.09.14, Jena, Germany, 招待講演
- 13.K. Kataoka, Supramolecular Nanodevices from Smart Block Copolymers for Gene and Drug Delivery, 3rd Asian Biomaterials Congress, 2011.09.16, BEXCO Busan, Korea, 基調講演
- 14.K. Kataoka, Supramolecular Nanostructures of Block Copolymers as Smart Vehicles for Gene and Drug Delivery, Tateshina Conference on Organic Chemistry, 2011.11.13, Tateshina Forum, Chino, Nagano, Japan, 招待講演
- 15.K. Kataoka, Supramolecular Structures of Block Copolymers as Smart Nanodevices for Gene and Drug Delivery, The 12th Pacific Polymer Conference, 2011.11.15, The Shilla Jeju, MD Jeju-do, Korea, 基調講演
- 16.K. Kataoka, Block Copolymer Micelles for Targeted Cancer Therapy, EMA Webinar, 2011.11.29, Tokyo, Japan, 招待講演
- 17.K. Kataoka, Block Copolymer Micelles and Vesicles as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, 2011.12.02, Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan, 招待講演
- 18.K. Kataoka, Self-Assembled Nanostructures of Block Copolymers as Smart Vehicles for Gene and Drug Delivery, The 19th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, 2011.12.10, Tokyo Station Conference, Tokyo, Japan, 招待講演
- 19.K. Kataoka, Supramolecular Nanodevices from Functionalized Block Copolymers for

Molecular Therapy, "France-Japan Workshop "The Nanotech Revolution from Science to Society: a Time for Passion and a Time for Reason", 2011.12.13, Amphithéâtre, Marie Curie, ENS Cachan, France, 招待講演

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

- 1.特許取得
特になし。
- 2.実用新案登録
特になし。
- 3.その他
特になし。

iPS 細胞技術を利用した難治性消化器癌に対する新規免疫再生療法の開発

研究分担者 中内啓光 東京大学 医科学研究所 教授

研究要旨

難治性癌が根治されないメカニズムとして、癌幹細胞の存在、腫瘍のエスケープ、免疫学的な疲弊現象などが知られる。我々は特に癌抗原を認識している T 細胞の免疫学的疲弊を克服することを目的とした「免疫再生療法」を開発している。難治性癌抗原特異的 T 細胞からリプログラミングにより iPS 細胞を作製し、大量に増幅した後に再分化誘導を行うことで大量の抗原特異的メモリー T 細胞を得られることを明らかにした。抗原特異的 T 細胞の誘導あるいは再誘導において樹状細胞 (DC) が促進的に働くことを期待し、現在は癌 (幹) 細胞由来の iPS 細胞から DC を分化誘導する手法の開発に取り組んでいる。

加えて、ヒト腫瘍細胞に対する治療効果を評価するための実験動物として、ラット iPS 細胞へ遺伝子改変を加え、免疫不全ラットを開発した。ヒト腫瘍の移植が可能であることが分っており、治療評価系として有用である可能性が示唆されている。

**A. 研究背景、目的
(背景)**

悪性腫瘍を長期に亘って効果的に制御するためには、メモリー T 細胞による継続した監視が必要であることが知られる。我々は抗原特異的な末梢血ヒト T 細胞クローンをリプログラミングする手法を確立し、その T 細胞受容体遺伝子配列がソースとなった T 細胞と同一であることを見出した。従って、もし腫瘍抗原特異性を適切に持つ T 細胞を iPS 細胞のソースにし、そこから成熟した T 細胞を誘導することができれば抗腫瘍効果をもつ大量のメモリー T 細胞を駆使した強力な免疫再生療法が実現できる可能性がある。本研究は、この技術を基本に消化器癌 (幹) 細胞を効率よく標的する治療を開発し、動物モデルを用いて有用性を示すことを目的としている。

B. 研究方法

第一に、T-iPS 細胞から抗原特異性を保ったメモリー T 細胞を誘導することが可能であるか否かを検証する。可能であれば、癌 (幹) 細胞のリプログラミングにより得られた癌 (幹) 細胞由来 iPS 細胞を樹状細胞 DC に分化させ、腫瘍抗原特異的 T 細胞を効率よく再分化させる技術を開発する。癌幹細胞から DC を分化誘導し、癌免疫を誘導する試みは、一部の白血病幹細胞を対象に報告されているが、血液腫瘍以外のほとんどの癌幹細胞においては組織種を超えて DC へと分化させることは不可能であるためそのような試みはなされていなかった。近年、森、石井、山田らは腫瘍細胞

のリプログラミングに成功し、その iPS 細胞を介して DC を得ることが理論的に可能になった。確かに消化器癌 (幹) 細胞 iPS 細胞からの安定した DC 分化や癌幹細胞特異的な内在性抗原の提示能については解明しなければならない点が多いが、特異抗原による選択的刺激性の高まった DC を得ることが出来れば、T-iPSC へのリプログラミングと機能性 T 細胞への再分化誘導によって、目的の細胞を誘導できる可能性がある。

また、近年我々はラット ES 細胞、iPS 細胞の樹立に成功し、遺伝子改変ラットを作出することが可能になった (Hamanaka S et al, PLoS One, 2011)。ラットはマウスに比して外科的操作が容易であり、消化器内視鏡を用いた診断・治療アプローチも繰り返し可能である。そこで、ヒト難治性消化器癌細胞が生着する免疫不全ラット、そして免疫担当細胞を含むヒト血液細胞が生着するヒト造血支持ラットを開発する。ヒト由来細胞を用いて難治性消化器癌の維持・解析と腫瘍免疫の解析が可能 *in vivo* の系を確立し、抗原特異的再分化リンパ球による治療の有効性を評価する。

(倫理面への配慮)

実施にあたり倫理委員会の承認を得る。

C. 研究結果

1. ヒト抗原特異的 T 細胞クローンをリプログラミングして得られた T-iPS 細胞をストローマ細胞の上で段階的に培養することによって、造血幹細胞を経て CD8 単独陽性 T 細胞を得ることに成功した。得られた CD8T 細胞はメモリー

一T細胞に相当する特性を呈し、抗原特異的なサイトカイン産生能と細胞障害性を示した。

2. ラット体細胞からiPS細胞を誘導することに成功し、同iPS細胞が生殖系列細胞の再生に寄与することとF1世代へ形質が受け継がれることを確認した。同技術を用いて共通ガンマ鎖をノックアウトしたラットを作出したところ、リンパ球数が著しく低下した免疫不全を呈した。同ラットはヒト由来の腫瘍細胞株を拒絶できず、長期に生着させ得ることを確認した。

D. 考察

抗原特異的T細胞のリプログラミング技術と記憶T細胞への再分化誘導技術を開発し、抗腫瘍免疫再生療法の基礎を確立した。今後は消化器癌を対象に癌(幹)細胞由来のiPS細胞からのDC誘導法の確立を通して、消化器癌抗原特異的なT細胞のリプログラミングと再分化誘導法のさらなる効率化を目指す。

ラットiPS細胞を用いて免疫不全ラットを作出した。今後も開発を進め、消化器癌(幹)細胞の治療法を広く評価し得るプラットフォームとすることを目指す。

E. 結論

リプログラミング技術を用いた抗原特異的なT細胞免疫再生の可能性が示唆された。

免疫不全ラットがヒト腫瘍研究モデルとして有用である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamazaki Y, Ema H, Karisson G, et al. Nonmyelinating Schwann Cells Maintain Hematopoietic Stem Cell Hibernation in the Bone Marrow Niche. *Cell*. 147, 1146-1158, 2011.
2. Hamanaka S, Yamaguchi T, Kobayashi T, et al, Generation of Germline-Competent Rat Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE*, Vol. 6, No. 7 (2011)
3. Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, et al. Development of Defective and Persistent Sendai Virus Vector: A Unique Gene Delivery/Expression System Ideal for Cell Reprograming. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 286, No. 6 (February 11), 2011, 4760-4771
4. Morita Y, Iseki A, Okamura S, et al. Functional characterization of

hematopoietic stem cells in the spleen. *Exp Hematol*. 2011 Mar;39(3):351-359.e3.

2. 学会発表

1. 金子新、ヒト末梢血T細胞由来iPS細胞からのT細胞誘導、第15回日本がん免疫学会総会シンポジウム、2011年7月1日、大阪
2. 金子新、西村聡修、中内啓光、ヒトCD8T細胞由来iPS細胞の樹立と再分化の試み、第3回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、2011年8月21日、別府
3. 金子新、西村聡修、中内啓光、T細胞由来iPS細胞からのT系譜細胞誘導、第70回日本癌学会学術総会、2011年10月4日、名古屋
4. Nishimura T, Kaneko S, Nakauchi H, Genetical basis of novel immunotherapy model using T-cell-derived induced pluripotent stem cells, The 73rd Annual meeting of the Japanese Society of Hematology, Oct 14, 2011, Nagoya
5. 金子新、ヒト末梢血T細胞由来iPS細胞からのT細胞誘導と臨床応用、国立感染症研究所学友会セミナー、2011年11月22日、東京
6. Nishimura T, Kaneko S, Tajima Y, et al. In Vitro Generation of Mature T Lymphocytes From Human iPS Cells and Genetic Analysis of TCR Gene Rearrangements, Dec 11, 2011, San Diego

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

1. Method for Immunological Reconstitution using Pluripotent Stem Cells, 2011年2月出願番号PCT/JP2011/052260
2. 多能性幹細胞からの血液細胞分化に関する培養方法、2011年9月出願番号:PCT/JP2011/070563

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

難治性消化器癌幹細胞の代謝特性を標的とした治療戦略の開発

研究分担者 佐谷秀行 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所 教授

研究要旨

私たちは癌幹細胞マーカーとして広く知られている CD44 分子は、そのスプライスバリエントフォーム(CD44v)が、細胞膜表面のシスチントランスポーターxCT の発現を安定化させることによって、細胞内の還元型グルタチオン量を増加させ、それによって酸化ストレスを減少させる作用があることを見出していたが、更に今回、CD44v の発現は癌細胞のエネルギー産生をミトコンドリアから解糖系にシフトさせることで酸化ストレスの産生を減少させ、抗癌剤をはじめとする治療ストレスに対して抵抗性を高めていることを見出した。

A. 研究目的

私たちはこれまで、ヒトの大腸癌や胃癌の癌幹細胞マーカーとして広く知られている CD44 分子の癌幹細胞における機能解析を行う過程で、悪性度の高い難治性症例で高く発現することが知られているスプライスバリエントフォームの CD44 (CD44v) が、細胞膜表面のシスチントランスポーターxCT と結合しそれを安定化させることによって、細胞内の還元型グルタチオン量を増加させ、酸化ストレスを減少させる作用があることを見出した (Ishimoto et al., *Cancer Cell*, 2011)。

還元型グルタチオンの合成には細胞内のエネルギー代謝が深くかかわっている。私たちは CD44 と細胞内エネルギー代謝の関係について調べ、それが癌幹細胞の機能にいかに関与しているかを観察することを目的に研究を行った。

B. 研究方法

1. *In vitro virus* (IVV)法による CD44 細胞内ドメインの結合タンパク質スクリーニング
2. CD44 を介した細胞内代謝特性のメタボローム解析
3. CD44 発現低下細胞におけるエネルギー代謝特性、酸化ストレス、還元型グルタチオンの変化の解析
4. CD44 発現低下細胞における薬剤感受性の変化の解析

C. 研究結果

1. *In vitro virus* (IVV)法による CD44 細胞内ドメインの結合タンパク質スクリーニング

In vitro virus 法を用いて CD44 の細胞内ドメインと相互作用するタンパク質のスクリーニングを行ったところ、好気性解糖の制御因子である pyruvate kinase M2 (PKM2)と相互作用することを見出した。CD44 と PKM2 の結合は細胞内でも確認でき、その結合によって PKM2 のリン酸化が生じ、活性が抑制されることにより(図1)、細胞内の代謝を解糖系にシフトさせる機能があることが分かった。

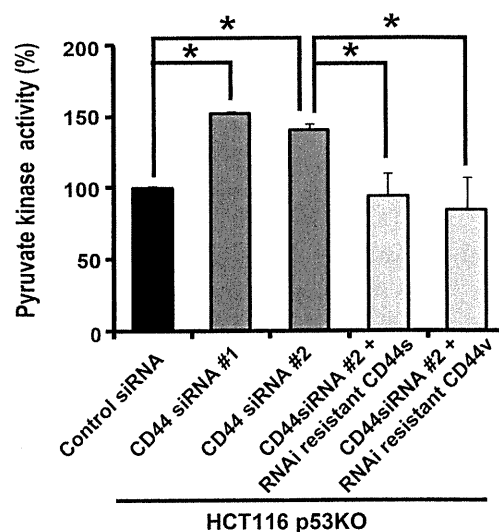


図1 CD44 によるピルビン酸キナーゼの活性調整。CD44 を siRNA によって減少させることによりキナーゼ活性は上昇し、siRNA 抵抗性 CD44 を再発現することで活性は下降する(文献 3 より引用)

2. CD44 を介した細胞内代謝特性のメタボローム解析

CD44 の発現抑制は、解糖系からミトコンドリア呼吸への代謝流動を誘導することが分かった。また主たる ATP 産生がミトコンドリアにシフトすると、グルコーストランスポーターの発現に抑制がかかり、グルコース取り込みが低下することが分かった。更に、グルコースの取り込みが下がることで、結果的にペントースリン酸経路への流動が抑制されることを見出した。

3. CD44 発現低下細胞におけるエネルギー代謝特性、酸化ストレス、還元型グルタチオンの変化の解析

CD44 発現抑制によるペントースリン酸経路への流動抑制は NADPH の産生低下につながる。NADPH は酸化型グルタチオンを還元型グルタチオン (GSH) に転換するために必要であることから、CD44 発現抑制によって GSH のレベルが低下することが分かった。つまり CD44v は、シスチントランスポーターを介してシスチンの取り込みを上げることでグルタチオンの合成を増加させるとともに、NADPH の産生を上げることで、グルタチオンをより還元型に変換する役割を果たしていることが明らかになった (図2)。

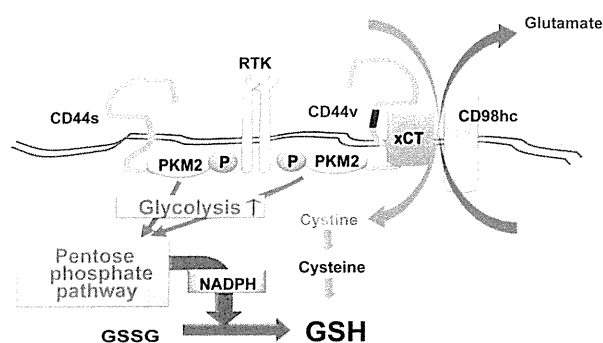


図2 CD44 による還元型グルタチオン合成促進機構。CD44v と xCT シスチントランスポーターの結合により細胞外からシスチンが取り込まれ、それによってグルタチオンの合成が高まる。更に CD44 は PKM2 のリン酸化を促進し、それによって活性が抑制されることでペントースリン酸経路が活性化し、NADPH が作られ、酸化型グルタチオンは還元型に転換される。(文献3より引用)

4. CD44 発現低下細胞における薬剤感受性の変化の解析

CD44 は細胞内の酸化ストレスの上昇を防ぐことで、治療などのストレスに対する抵抗性を維持していると考えられる。そこで CD44 の発現を抑制することで、治療に対する感受性が変化するかについて観察した。その結果、p53 変異がある癌細胞や低酸素状態の癌細胞では、CD44 の発現を低下させることで、抗癌剤に対する感受性が有意に高まること分かった。

D. 考察

癌細胞は酸素の有無に関係なくエネルギー産生に解糖系を使用し、この特徴的代謝はワーブルグ効果と呼ばれている。ワーブルグ効果は癌の重要な特性であるが、なぜ癌が効率の悪い解糖系をわざわざ使用するのかについて、いまだ完全には理解されていない。原因の一つとして、ヒトの癌の約半数で認める p53 の機能障害が報告されている。p53 はエネルギー産生のためにミトコンドリア呼吸を促進しており、p53 の機能障害をもつ癌細胞ではミトコンドリア呼吸が抑制され、解糖系が優位になると考えられている。更に最近の研究で、p53 は CD44 の発現を抑制することで癌細胞の増殖を制御することが報告された。

私たちは今年度の研究で、p53 が変異している癌細胞、あるいは低酸素状態にある癌細胞では CD44 がその解糖系優位の性質の維持に重要な役割を果たしていることを見出した。近年、PKM2 がワーブルグ効果に重要な働きを果たしていることが報告され、PKM2 のリン酸化による活性抑制が、解糖系優位のエネルギー代謝とペントースリン酸経路の活性化に働くことを見出された。私たちは CD44 の細胞内ドメインと相互作用するタンパク質を網羅的に解析する過程で、PKM2 が結合することを見出し、その活性制御に CD44 の発現が重要であることを明らかにした。

CD44 は上皮系腫瘍の癌幹細胞マーカーとして広く知られているが、機能的にも癌幹細胞の治療抵抗性を規定する分子であることが今回の研究で示唆された。これらの結果に基づいて考察すると、癌幹細胞はエネルギー代謝という観点で、非癌幹細胞や正常細胞と性質上一線を画する可能性がある。つまり、そのエネルギー代謝のメカニズムの特性を標的にすることで、より選択的に癌幹細胞を抑制する戦略を構築することができる可能性がある。

E. 結論

CD44 によるエネルギー代謝制御機構が、癌におけるワーブルグ効果や薬剤耐性機構の一端を説明することができた。今年度の研究成果は、癌幹細胞の代謝特性が新たな治療標的となることを示唆するものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arima Y, Hayashi N, Hayashi H, Sasaki M, Kai K, Sugihara E, Abe E, Yoshida A, Mikami S, Nakamura S and Saya H: Loss of p16 expression is associated with the stem cell characteristics of surface markers and therapeutic resistance in estrogen receptor-negative breast cancer. *Int J Cancer* 2012 (in press)
- 2) Shimizu T, Ishikawa T, Iwai S, Ueki A, Sugihara E, Onishi N, Kuninaka S, Miyamoto T, Toyama Y, Ijiri H, Mori H, Matsuzaki Y, Yaguchi T, Nishio H, Kawakami Y, Ikeda Y and Saya H: Fibroblast growth factor-2 (Fgf2) is an important factor that maintains cellular immaturity and contributes to aggressiveness of osteosarcoma. *Mol Cancer Res* 2012 (in press)
- 3) Tamada M, Nagano O, Tateyama S, Ohmura M, Yae T, Ishimoto T, Sugihara E, Onishi N, Yamamoto T, Yanagawa H, Suematsu M and Saya H: Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells. *Cancer Res* 2012 (in press)

2. 学会発表

- 1) 佐谷秀行:がん幹細胞マーカーCD44 による代謝制御。シンポジウム 4S1a「がんの代謝制御」。第84回日本生化学会大会。9/24/2011、京都国際会館、京都
- 2) 佐谷秀行:がん幹細胞の治療抵抗性メカニズム。シンポジウム S5「がん幹細胞研究の最前線」。第70回日本癌学会学術総会。10/3/2011、名古屋国際会議場、名古屋

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得

特になし。

2.実用新案登録

特になし。

3.その他

特になし。