

201209015A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業
(政策創薬探索研究事業)

「人工スーパー癌細胞を用いた
生体内“脱癌化”誘導療法の開発」

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 幸谷 愛

平成25 (2013) 年3月

目次

I 研究代表者報告

人工スーパー癌細胞を用いた生体内“脱癌化”誘導療法の開発

幸谷 愛、 高松昌子、 黒崎なつみ3

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

.....26

III. 研究成果の代表的論文

.....28

I. 研究代表者報告

I 研究代表者報告

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（政策創薬探索研究事業）

研究代表者報告書

人工スーパー癌細胞を用いた生体内“脱癌化”誘導療法の開発

（H23 - 若手 - 15）

幸谷 愛

東海大学医学部基盤診療系再生医療科学造血腫瘍分野 准教授

高松昌子

東海大学医学部基盤診療系再生医療科学造血腫瘍分野 技術員

黒崎なつみ

東海大学医学部基盤診療系再生医療科学造血腫瘍分野 技術補佐員

研究要旨

高度先進医療が発達した現在でも尚、がんは最大の悪性疾患である。現在癌の治療法は、手術療法、化学療法、放射線治療など、がんを生体内から取り去る、もしくは殺しきる治療法である。有効な治療法のない若年性再発癌に対して革新的な根治療法、それが不可能なら、高いQOLを維持しながら生存期間を延長する治療法の開発が急務である。2種類の肺癌クローンを異なる比率で混ぜてマウスに接種した場合、割合に関わらず常に一方のクローンが優位になる、“Clonal dominance”の存在を示した古い研究がある。それをヒントに癌細胞のクローン間での生存競争を治療に応用することを狙い、人工的に悪性度の高い“スーパー癌細胞”を作成し、“普通癌細胞”と生存競争させることによって後者の増殖を抑制することに成功した。そこで、生存期間を延長させること、そのメカニズムを明らかにすることを本研究では目指す。

- 研究目的

再発癌、初発時に大規模な転移を認める癌については、有効な治療が極めて少ない。このようながんに対しては革新的な治療法の開発が急務である。がん細胞がクローン間で生存競争する現象に着目し、人工的に悪性度の高い“スーパー白血病細胞” (bcr-abl BaF3) を樹立し、白血病細胞 (Stat5-BaF3) と生存競争させることによって後者の増殖を抑制させる試みを行い、その分子メカニズムを明らかにし、新規治療法開発を目指した。K-Rasを過剰発現した細胞と、Schribbをロックアウトした細胞、二つのクローンが協力して癌化を引き起こすモデルがショウジョウバエで報告された (Nature. 2010 ; 463 (7280) :545-8) 。この報告は、それぞれ単独細胞では癌化しない細胞が、両方のクローンが同一生体内に存在する場合には、癌化がおこるというものである。癌における全く性質の異なるクローンの相互作用が癌化をひき起こすことを初めて示した画期的な報告である。癌化を促進するクローンの組み合わせがあるのであるから、”腫瘍抑制”を引き起こす組み合わせもあると考える。そこで、2つの腫瘍クローン間の腫瘍増殖を抑制するメカニズムを明らかにすることを本研究の目的とする。局所的に肺がんの異なるクローンをマウスに接種した実験では、ひとつのクローンが優位となった (EurJ Cancer, 1999 Vol. 31A, No. 2, pp. 222-229) 。古いこの研究から本研究のヒントを得たが異なる腫瘍クローンを全身的に投与する試みは全く新しいものである。

- 研究方法

上記の考えを検証するため、2010年の予備実験を踏まえ、本実験のためのモデル系を構築した。“スーパー癌細胞”としては強力な白血病遺伝子“bcr-abl”をマウスB細胞株BaF3細胞に導入した安定株、“普通癌細胞”としては、bcr-ablの下流に存在し、bcr-ablほどは形質転換能の強くない遺伝子“Stat5”をBaF3細胞に導入した安定株を作成した。BaF3細胞はIL-3を培養に必要とするが、両安定株は形質転換したため、IL-3非依存となった。

これらの癌細胞を共培養、単独培養した時の、細胞増殖を調べた。単独培養では増殖速度には差がなかった。bcr-ablを導入した細胞株にはGFPを同時に導入しており、両細胞株を共培養した場合、両者を識別できる。“スーパー癌細胞”と“普通癌細胞”を、それぞれ、 1×10^4 個と 1×10^5 個を混ぜたもの(Mix)と、“普通癌細胞”単独 1×10^5 個を5mlの液体培地でそれぞれ培養し、5日目と8日目にGFPの割合、細胞数を測定した。結果、sub confluentな条件で、単独で培養した場合より、“スーパー癌細胞”と共培養した場合、“普通癌細胞”の増殖が著しく抑制された (Fig1)。

この間、GFP (+) 細胞が10%から60%まで増加し、“スーパー癌細胞”が細胞集団の中で優位性を獲得したことが示された (Fig1)。

全体の細胞数は、両培養系で大きな差を認めなかった。(Fig1)

この結果は、増殖能力が同じであっても、より悪性度の高いがん遺伝子を発現している“スーパー癌細胞”が、“普通癌細胞”の増殖を抑制していることを示している。

そこで、一匹のマウスに単独、両者Mixを接種し、in vitroで得た実験結果が再現できるか否かを検討した。“普通癌細胞”単独を 1×10^6 個接種したマウスと、“普通癌細胞”

と“スーパー癌細胞”をそれぞれ 1×10^6 個ずつ、計 2×10^6 個接種したマウスでの、“普通癌細胞”の増殖を接種から3週間後体外イメージングシステムを用いて測定した。その結果3回の実験すべてにおいて、“普通癌細胞”単独を接種したマウスでの“普通癌細胞”の増殖に比べ、Mixで接種したマウスでの“普通癌細胞”の増殖が、著しく、抑制されているという結果を得た。 (Fig2)

上記の結果より、この現象の分子メカニズムを明らかにするために、生体内のスーパー癌細胞と普通癌細胞を精製度高く分離するためのシステムの構築を行った。

まず、腫瘍組織内のスーパー癌細胞と普通癌細胞の局在を明らかにするために、両腫瘍を接種したマウスから脾臓を採取して、HE染色および、GFPに対する染色を行った。腫瘍は通常の脾臓細胞より大型であるため、その形状より判別可能と考えられたが、実際、HE染色では正常細胞とは大きさ、核網の構造が著しく異なった。(Fig3, 4, 5)

腫瘍はクラスターを形成している箇所とびまん性に増殖している箇所が認められた。

(Fig3) 次にスーパー癌細胞と普通癌細胞との局在を比較するためにGFPに対する染色を試みたが、特異性に欠くため条件設定、抗体の選定に時間を要した。

最終的に得た至適条件においては、GFP陽性スーパー癌細胞は脾臓組織の比較的内側にクラスターを形成し、GFP陰性普通癌細胞は比較的外側にびまん性に存在することが明らかとなった。(Fig6, 7, 8)

次にスーパー癌細胞と普通癌細胞とをソーターを用いて分離する試みを行った。組織像から細胞の大きさにより、正常細胞とがん細胞を分離することは比較的容易に可能と考えられたが、得られたFACS像においてGFP陽性細胞が極めて少なく、また、FSC, SSCなどの細胞の大きさ、細胞構造の複雑さをパラメーターを用いて、正常細胞とがん細胞を分離する

ことが困難であることが明らかではなかった。

そこで、蛍光物質によるスーパー癌細胞と普通癌細胞の分離を行うために、2つの蛍光物質 mCherry と mOrange をレトロウィルスを用いて普通癌細胞に導入して、新たな細胞株を樹立した。

これらの癌細胞を共培養、あるいは単独培養したときの細胞増殖を調べた。

bcr-ablを導入した細胞株にはGFPを同時に導入してあり、STAT5を導入した細胞株にはmCherryを同時に導入してあるので、両者を識別することができる。

“スーパー癌細胞”と“普通癌細胞”をそれぞれ 1×10^6 個ずつ混ぜたもの(Mix)と、“普通癌細胞”だけを 1×10^6 個、2mlの液体培地で培養し、4日目に細胞の割合をFACSで確認した。その結果、両培養系で、全体の細胞数には大きな差は見られなかったが、Mixでは、“スーパー癌細胞”の割合が増え、“普通癌細胞”の増殖を抑制していた。よって、以前の実験を試験管内では再現できた。

そこでbalbc/nuマウスを使って、“普通癌細胞”単独と“スーパー癌細胞”とのMixを接種し、in vitroで得た実験結果が再現できるか否かを調べた。

今回、単独細胞は、両者の親細胞であるマウスB細胞株BaF3とSTAT5のmixとし、それぞれ 1×10^6 個ずつ、計 2×10^6 個を、マウス3匹ずつに接種した。

Bcr-ablの細胞株にはgaruccia-luciferase (G-Luc) が共導入してあり、STAT5の細胞株にはd-luciferase (D-Luc) が導入してあるので、その発光強度を体外イメージングシステムを用いて測定した。

まず、12日目にbcr-ablを接種したマウスについて、腫瘍細胞の存在をマウス生体内で確認するため、G-lucを腹腔内投与したところ、発光が確認された。(Fig9) Stat5を単独で

接種した普通癌担癌マウスで発光は認められなかった。(Fig10)

次に、14日目にD-lucを腹腔内投与したところ、スーパー癌細胞と普通癌細胞をMIXで接種したマウスにおいて普通癌細胞単独を接種したマウスより強い発光が確認された。

(Fig11, 12)

更に、これらの結果がBaF3細胞を導入したことに起因するの否か、

また、mCherryを導入細胞を選択するために用いていた抗生剤の毒性によるものかを検討するために、一週間抗生剤を無添加の状態に培養したBaF3-Stat5a-firefly luc-mCherry細胞を単独で、 1×10^6 個ずつマウス2個体接種し、BaF3-Bcr-abl-Gaussia luc 細胞とBaF3-Stat5a-firefly luc-mCherry細胞をそれぞれ 1×10^6 個ずつmixした計 2×10^6 個を、それぞれマウス2個体に接種した。

接種後1週目の結果は、BaF3-Stat5a-firefly luc-mCherry細胞と増大が両群で差を認めない。(Fig13)

以上の結果は、これまでの結果と矛盾し、その原因を更に究明することが今後の課題となった。

今後の具体的な展望について

まず、これまでの結果と反対の結果を得た上記結果について、その原因を明らかにする。これまでの実験と大きく異なるのは、コントロール細胞としてIL-3依存性BaF3細胞をBaF3-Stat5細胞（普通癌細胞）と一緒にマウスに導入したことであった。よって、このIL-3依存性BaF3細胞の有無が、今回の結果とこれ間の結果の差を検討するにあたって重要と思われるため、IL-3依存性BaF3細胞を加えないで、これまでと同様の条件でBaF3-Stat5-mCherry細胞（普通癌細胞）を単独で打つ条件で、これまでの結果が再現できるかをまず検討する。そののち、癌が clonal dominance を好む理由、“癌が一人勝ちを望む”分子メカニズムを明らかにし、究極的には、人工スーパー癌細胞ではなく、その分子を標的にした薬剤で、普通癌細胞の増殖を副作用なく抑制させることを目的とする。更には、スーパー癌細胞の腫瘍量を制御するためのシステム構築に取り組む。ヘルペスウイルスにコードされる自殺遺伝子であるチミジンキナーゼを細胞に導入し、抗ウイルス薬であるガンシクロビルによって自殺遺伝子を発現させ細胞を殺す方法はヒトの造血幹細胞移植後ドナーリンパ球輸注において、臨床応用されている。すでに、試験管内ではBcr-abl-BaF3細胞（スーパー癌細胞）にチミジンキナーゼ遺伝子を導入し、ガンシクロビル100 μ g/mlを添加したところ、24時間後、ほぼ、100%Bcr-abl-BaF3細胞が死滅することを確認したので、自殺遺伝子を導入した“スーパー癌細胞”と“普通癌細胞”を共培養し、“スーパー癌細胞”の腫瘍量を一定に保った時の“普通癌細胞”の増殖抑制効果を検討したうえで、マウス生体内で、同様の効果を検討し、生存曲線の延長をはかれる条件を決定したいと考えている。これまでの結果、および、チミジンキナーゼによる細胞の自殺誘導が確立されたシステムであること踏まえると、条件を詳細に検討すれば、生存曲線を延長できる可能性が極めて高いと考えている。

具体的には

1. スーパー癌細胞の腫瘍量を制御するためのシステム構築

ヘルペスウィルスにコードされる自殺遺伝子であるチミジンキナーゼを細胞に導入し、抗ウィルス薬であるガンシクロビルによって自殺遺伝子を発現させ細胞を殺す方法はヒトの造血幹細胞移植後ドナーリンパ球輸注において、既に臨床治験が行われている。すでに、試験管内ではBcr-abl-BaF3 細胞（スーパー癌細胞）にチミジンキナーゼ遺伝子を導入し、ガンシクロビル100 $\mu\text{g/ml}$ を添加したところ、24 時間後、ほぼ、100%スーパー癌細胞が死滅することを確認した。

従って、自殺遺伝子を導入した“スーパー癌細胞”と“普通癌細胞”を共培養し、“スーパー癌細胞”の腫瘍量を一定に保った時の“普通癌細胞”の増殖抑制効果を検討したうえで、マウス生体内で、同様の効果を検討し、生存曲線の延長をはかれる条件を決定する。しかしながら、予備実験の結果、肺腫瘍に対してガンシクロビルの効果が極めて乏しいことも見出している。そこで、チミジンキナーゼだけではなく、bcr-abl 阻害剤であるイマチニブによる生体内腫瘍量コントロールシステムも同時並行的に確立を試みる。BaF3 細胞は単独ではマウス生体内で不死化しない。イ

マチニブによってBcr-abl が阻害されるとマウス生体内においてはbcr-abl-BaF3 細胞（スーパー癌細胞）は生存できない。(European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Vol. 33, No. 5, May 2006)

これまでの結果、および、チミジンキナーゼによる細胞の自殺誘導が確立されていること踏まえると、条件を詳細に検討すれば、生存曲線を延長できる可能性が極めて高いと考え

ている。

2. 癌がclonal dominance を好む理由、“癌が一人勝ちを望む”分子メカニズムの解析

スーパー癌細胞にはGFP が導入されているため、癌組織において普通癌細胞との区別ができる。

普通癌細胞を単独で導入したマウス、Mix を導入したマウスに発生した腫瘍に対して、GFP 染色、細胞増殖を示すKi67 染色を行いGFP 陰性普通癌細胞の性質を比較し、両者に差があるか検討する。更には、セルソーターを用いてGFP 陰性細胞を分離し、両マウスに発生した腫瘍でのGFP 陰性普通癌細胞の遺伝子プロファイルをcDNA アレイを用いて解析する。以上より、癌が一人勝ちを好むメカニズムを明らかにして、その分子標的薬を用いた新規治療開発に結び付けていきたい。

Figure1. 試験管内でスーパー癌細胞は普通癌細胞の増殖を抑制

左：総数は同じだが Mix では StatBaF（普通癌細胞）の増殖が抑制されている

右 Mix 中での StatBaF（普通癌細胞）の割合は減少する。

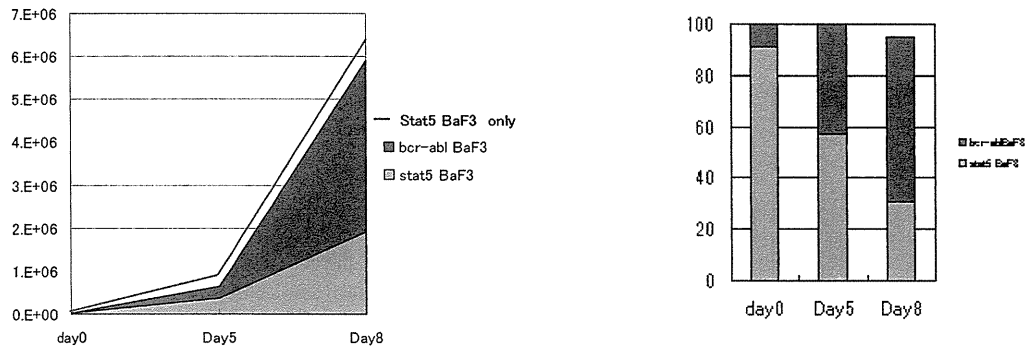


Figure 2 普通癌の腫瘍量

左:スーパー癌細胞とのmix
中央:単独
右:量の比較



Figure 3 Mixを接種したマウスの脾臓組織像 (X4 低倍率)

上 Mix
下 正常脾臓

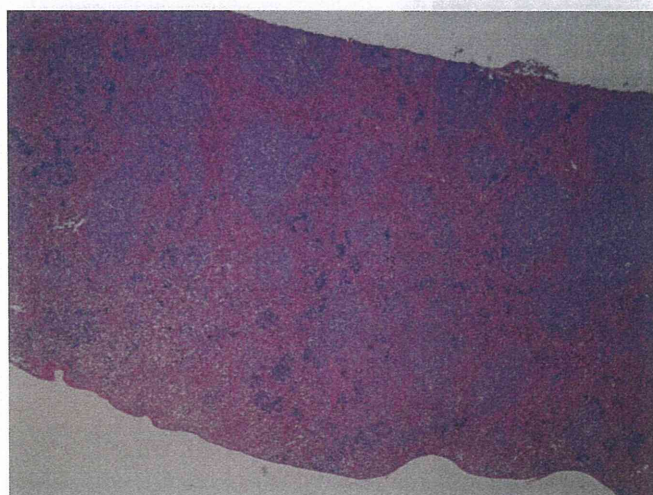
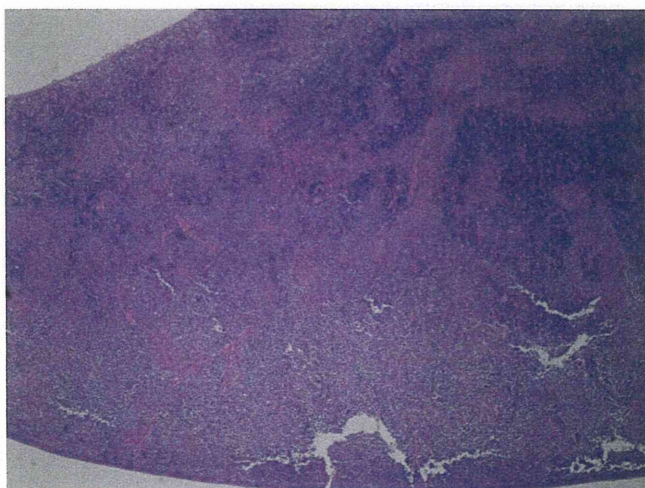


Figure 4 Mixを接種したマウスの脾臓組織像 (X20 中程度倍率)
上 Mix (矢印は腫瘍細胞増殖が認められるところを示す)
下 正常脾臓

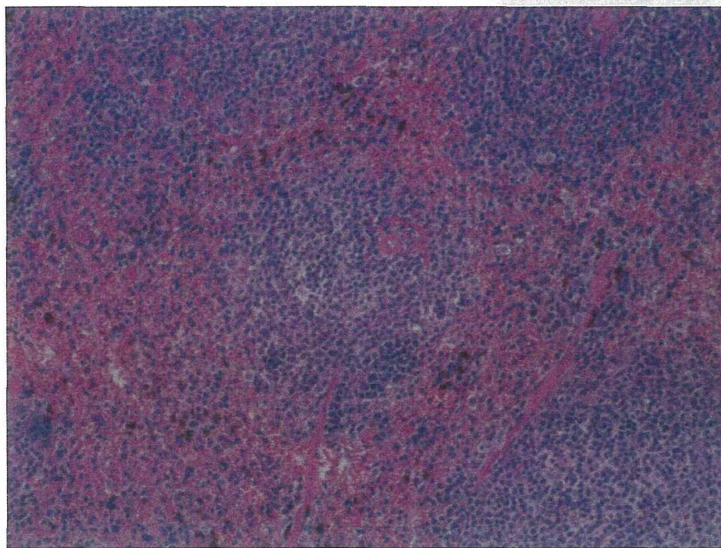
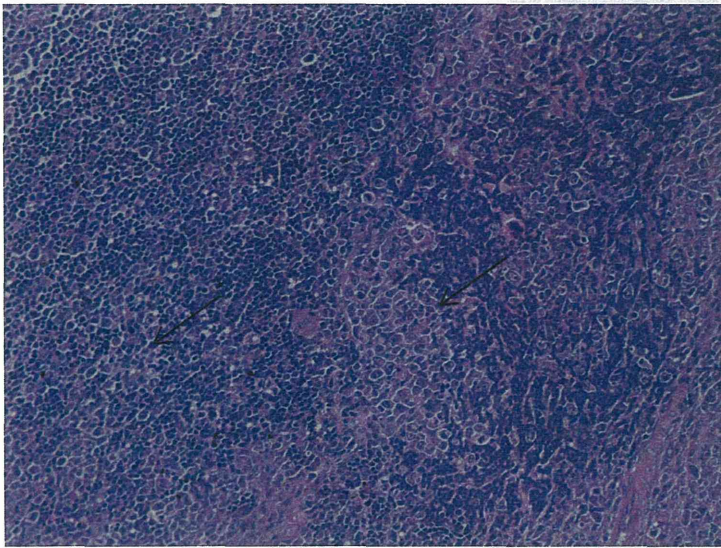


Figure 5 Mixを接種したマウスの脾臓組織像 (X40 高倍率)

上 Mix

下 正常脾臓

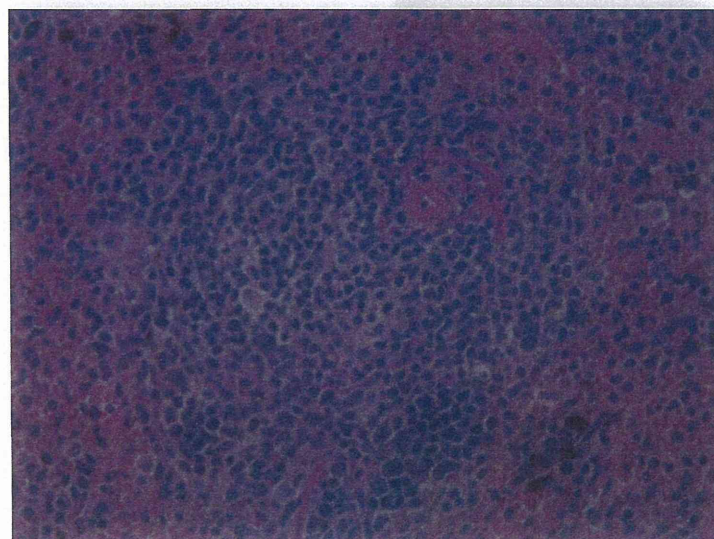
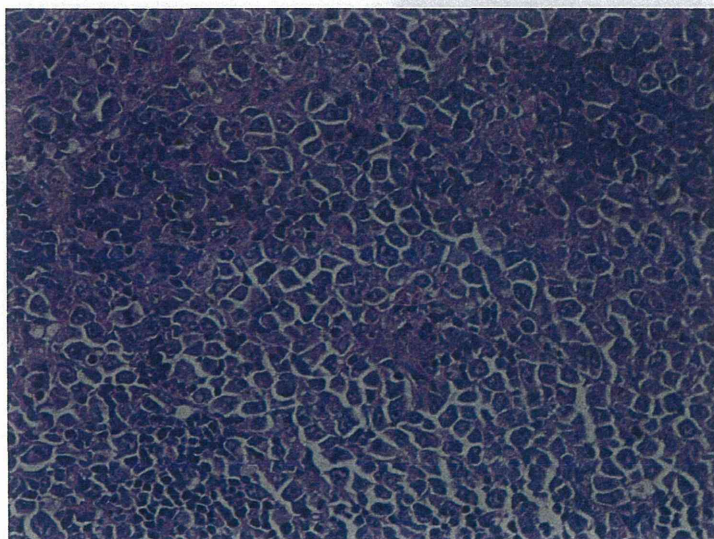


Figure 6 Mixを接種したマウスの脾臓組織像 (X4 低倍率) GFP染色

上 Mix
下 Mix

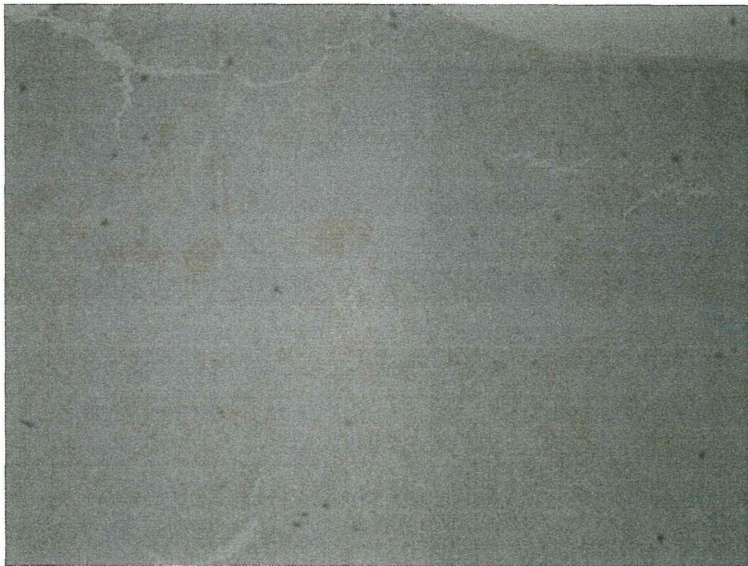


Figure 7 Mixを接種したマウスの脾臓組織像 (X20中程度倍率)

