

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23～24年度 総合研究報告書

研究代表者

幸谷 愛

平成25年(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 .....2

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

.....29

## III. 研究成果の代表的論文

.....31

# 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、” Clonaldominance ” 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。

全体の研究ロードマップを次ページに示す。

# 生体内脱癌化治療開発のロードマップ

2012

2013

2014

## モデルのマウス個体内で検証 (病理学的検討)

(bcr-abl BaF 3 cell) が再発がん細胞 (Stat5 BaF 3 cell) の増殖を抑制し生存期間を延長する。

## 人工スーパーがん細胞の安全正確なコントロール

### ・遺伝子導入

サイミジンキナーゼ導入人工スーパーがん細胞におけるガンシクロビルによるアポトーシス効果の判定

cDNA アレイによる腫瘍細胞における遺伝子発現のプロファイルの作成  
生体内脱癌化に関わる遺伝子 5-6 個の選出

抗体アレイによる血清における蛋白発現のプロファイルの作成  
悪疫質に関わるたんぱく質 5-6 個の選出

候補遺伝子  
候補蛋白の  
機能解析  
(試験管内  
生体内)

有効な治療のない再発がんに対して革新的治療法の開発を目指す

- 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” (bc-

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 をノ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お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、 $1 \times 10^4$  個と  $1 \times 10^5$  個を混ぜたもの(Mix)と、“普通癌細胞”単独  $1 \times 10^5$  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  $1 \times 10^6$  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  $1 \times 10^6$  個ずつ、計  $2 \times 10^6$  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)

研究代表者は公募の新規申請提出後、平成 23 年 1 月 1 日に新たに東海大学へ転籍したため新たにマウス体外イメージングシステムを東海大学で構築することが必要となった。その際に 3 月 11 日の東日本大震災が発生し、上記研究遂行のため必要不可欠なマウス体外イメージング装置の搬入が大幅に遅延した。その後も震災の影響による計画停電の実施により、マウスの飼育に障害が生じた。更にはこの間に、前所属東京大学医科学研究所で使用した試薬を製造する会社が倒産し異なる製造メーカーの試薬を使用せざる得なくなった。このような条件下で、前所属東京大学医科学研究所で得た予備実験を再現するために、機器、マウス試薬の各々の設定条件を検討することが必要になるという不測の事態が生じ、そのために多大な時間を必要とした。

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 をレトロウイ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  $1 \times 10^6$  個ずつ混ぜたもの (Mix) と、“普通癌細胞”だけを  $1 \times 10^6$  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  $1 \times 10^6$  個ずつ、計  $2 \times 10^6$  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か否か、

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では培養した BaF3-Stat5a-firefly luc-mCherry 細胞を単独で、 $1 \times 10^6$  個ずつマウス 2 個体接種し、BaF3-Bcr-abl-Gussia luc 細胞と BaF3-Stat5a-firefly luc-mCherry 細胞をそれぞれ  $1 \times 10^6$  個ずつ mix した計  $2 \times 10^6$  個を、それぞれマウス 2 個体に接種した。

その結果は、BaF3-Stat5a-firefly luc-mCherry 細胞と増大が両群で差を認めなかった。

BaF3-Stat5a-firefly luc-mCherry 細胞(普通癌細胞)は導入遺伝子陽性細胞を選択するために、puromycin などの抗生物質 3 種類を添加して試験管内培養している。

これまでの実験と異なるのは、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り重要と

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。更に、マウス生体内への静注 1 週間前に、抗生物質を除去した条件で BaF3-Stat5a-firefly luc-mCherry 細胞(普通癌細胞)を投与するとの条件に変更した。

その結果、生着は、スーパー癌細胞と普通癌細胞を MIX で静注したマウスの方普通癌細胞単独を静注したマウスより高く、腫瘍増殖は普通癌細胞単独において早いとの結果を再現できた。(Fig13)

そこで、GFP、mCherry をマーカーにマウス脾臓、骨髄、リンパ節、肝臓より、スーパー癌細胞と普通癌細胞の分離を試みた。

その結果両者は明確に分離され、更に普通細胞のコンタミネーションもなかった。

(Fig14)

今後の具体的な展望について

上記で分離回収した細胞に対して cDNA アレイを行い、発現に差のある遺伝子を同定

し、その機能解析を行い、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。

また、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、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、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 $\mu$ 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。

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。

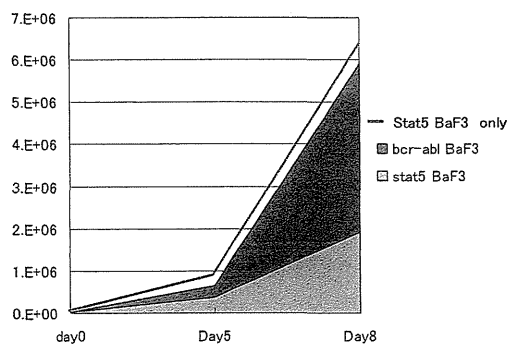
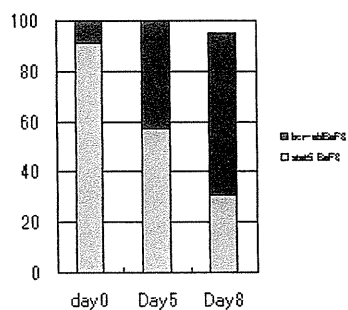




Figure 2 普通癌の腫瘍量

左:スーパー癌細胞との mix

中央:単独

右:量の比較

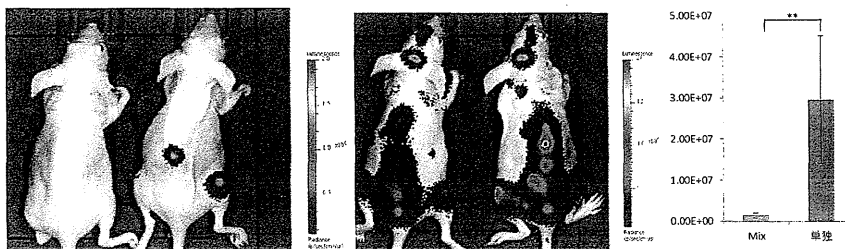


Figure 3 Mix を接種したマウスの脾臓組織像 (X4 低倍率)

上 Mix

下 正常脾臓

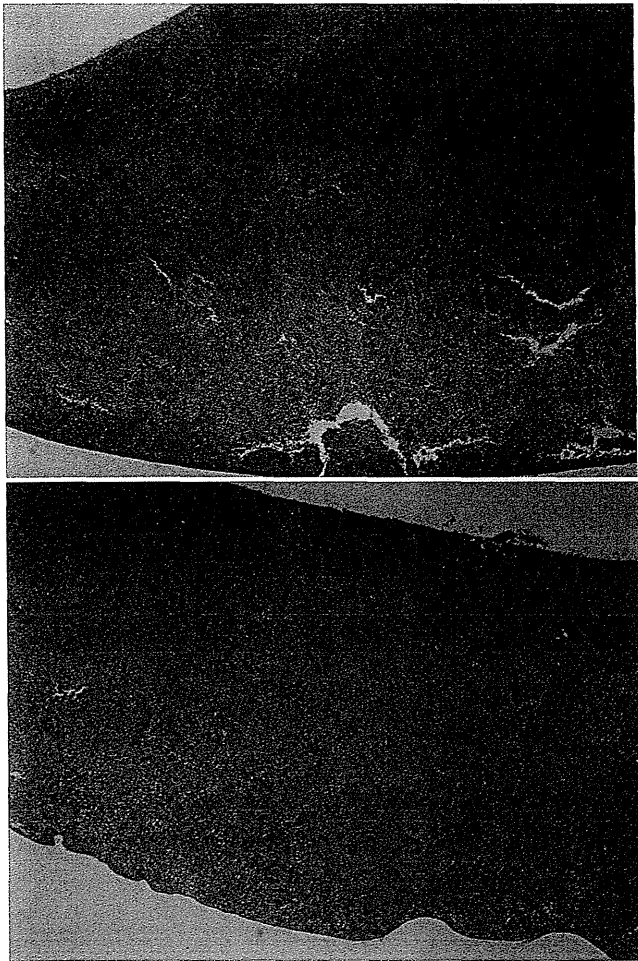


Figure 4 Mix を接種したマウスの脾臓組織像 (X20 中程度倍率)

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

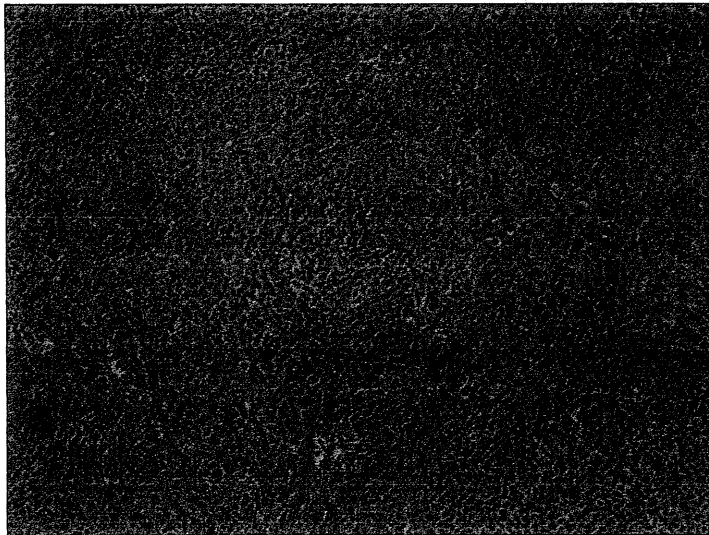
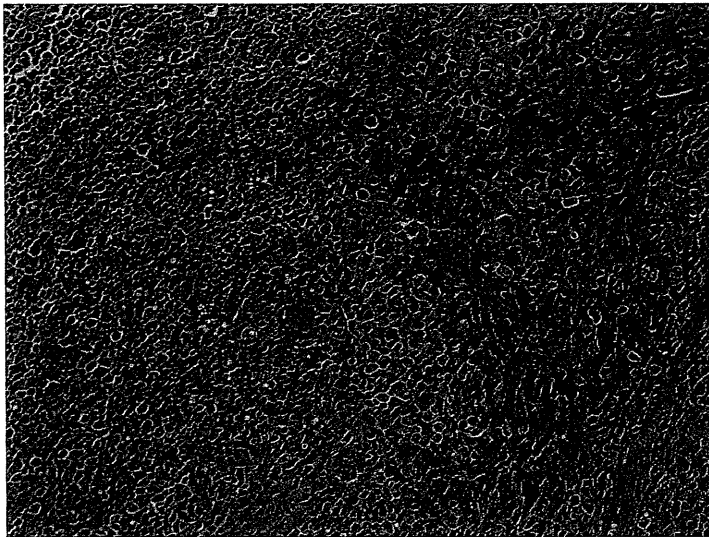


Figure 5 Mix を接種したマウスの脾臓組織像 (X40 高倍率)

上 Mix

下 正常脾臓

