

201239003A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 正樹

平成 25 年 (2013) 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. 固形癌幹細胞の代謝特性を標的とした高分子ミセル型 DDS の開発 _____	11
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 _____	17
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 _____	20
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 _____	23
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 _____	26
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 _____	28
石井秀始(大阪大学)	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____	35
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 _____	43
-----------------------	----

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。平成24年度は研究計画の2年目にあたり、特に即効性のある創薬の出口戦略(短期計画)を着実に実現化しながら、トランスレーショナル研究(中長期計画)を具現化する為に、難治性癌で重要な癌幹細胞分子 CD44バリエントに軸足を据えながら事業を展開した。CD44バリエント(v)が癌幹細胞の酸化ストレス応答を介して、化学放射線療法への抵抗性の要を成すことから、以下の両面から革新技術を新構築した。

第一、固形癌幹細胞の CD44v を阻害し、リプログラミング (エピゲノム、代謝性)により治療感受性を格段に増感させる。

第二、宿主細胞に細胞リプログラミング技術で操作を加えてCD44v 癌幹細胞を標的とする細胞を作成する。

これらの各点を踏まえて、安全で有効な医療技術を実現化するために、ミセル化創薬等、最新技術を整備した。偉業技術ことを目指した。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する。

A. 研究背景、目的

平成24年度は研究計画の2年目にあたり、初年度で構築した基盤成果に立脚して、特に即効性のある創薬の出口戦略(短期計画)を着実に実現化しながら、また同時にトランスレーショナル研究(中長期計画)を着実に具現化していく為に、具体的に難治性癌で重要な癌幹細胞分子 CD44バリエントに軸足を据えながら事業を展開した。

(全体計画の背景)

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ト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、膀胱癌の微小環境(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。

(本年度計画の背景)

未曾有の少子高齢化社会を迎えたわが国の難病・癌等の疾患の厚生衛生動向と、最新の内外の先端医科学の進歩を踏まえて、特に即効性のある創薬の出口戦略(短期計画)を着実に実現化しながら、また同時にトランスレーショナル研究(中長期計画)を着実に具現化していく為に、具体的に難治性癌で重要な癌幹細胞分子 CD44バリエントに軸足を据えながら事業を展開した。CD44バリエント分子は、難治癌を含む過半数の癌で病態的重要性が示されている。私達の研究成果により、細胞膜表面の CD44バリエントがシスチン輸送蛋白質である xCT と直接結合して、細胞内の還元型グルタチオン産生を誘導し、癌細胞の生存に寄与する。また CD44バリエントの細胞質内部分がピルビン酸キナーゼと直接結合して、嫌気性代謝に関わる。これら2つの経路が協調的に働き、細胞のリプログラミング(エピゲノム、代謝性)に共通した分子基盤と

して重要な役割を果たす。このため、癌細胞の悪性度を人為的に大きく変革するためには、リプログラミングは有用な革新技術であり、その実現性は2012年度ノーベル生理学医学賞に輝いた京都大学山中教授の iPS 細胞技術と共通することから、わが国にとり産業上、医学上極めて重要な位置付けである。

#### (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療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、手術不応性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础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。

私達の研究成果から、CD44バリエントを抑制するための具体的な創薬として、サルファサラジン(xCT を機能阻害)のミセル化による活性型化合物の高濃度デリバリーや、CD44バリエントの細胞内情報伝達経路を短鎖 RNA(非コード RNA)により特異的に阻害する創薬の DDS 化等を進め、革新的な医療技術を具

現化する為の整備を進める。

#### B. 研究方法

前年度に引き続き、直接『固形癌幹細胞』に対して及び『宿主細胞』に対して、新しいリプログラミング技術を応用した医療技術を開発整備する。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、新しいリプログラミング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、これら革新的新技术を応用し、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、新技术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』に新技术で操作を加えて、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。

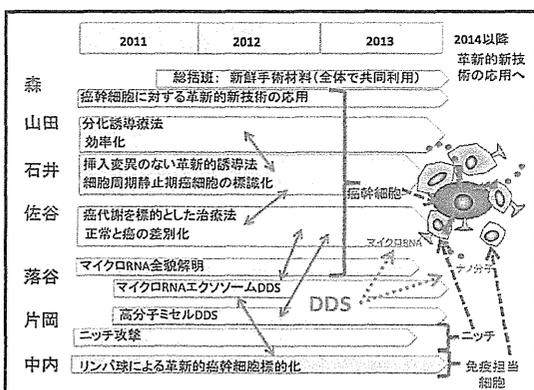
(倫理面への配慮)

●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

前年度に引き続き、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。

【癌幹細胞】に対するリプログラミングとして、①万能性幹細胞を誘導する転写因子(c-myc, Sox2, Oct3/4, Klf4)により消化器癌細胞の悪性形質が大きく変革され、分化誘導剤・抗癌剤への感受性および造腫瘍性が喪失され、そのメカニズムとして生化学的には癌抑制遺伝子(p16INK4A 等)プロモーター領域の脱メチル化により、CD44+癌幹細胞で異常を来していた生理的応答機構の再活性化現象が関わることを明らかにした(iPC 細胞;森・佐谷・石井・山田ら;Proc Natl Acad Sci USA 2010;BBRC 2010;Cancer Sci 2011; Cell Stem Cell 2010; Int J Oncol 2011; Cancer Cell 2012)。②CD44、特にバリエーション CD44v 陽性の細胞は、酸化ストレスに抵抗性であり、その分子基盤は CD44v 分子の細胞膜貫通部分がシスチン輸送蛋白質(xCT)に直接結合し、細胞内グルタチオン還元系を刺激し、抗癌剤・放射線療法後の治療抵抗性及び肺転移の原因となることを明らかにした(佐谷ら、Cancer Cell 2011; Nat Commun 2012)。③xCTの阻害剤 Sulfasalazine により CD44v 治療抵抗性癌細胞を不活性化し、根絶化が可能であることを動物実験で示した(佐谷ら、Cancer Cell 2011)。④CD44v 分子を詳細に検討したところ、細胞質部分が低酸素環境下の解糖系酵素ピルベートキナーゼ(PKM2)と直接結合し、癌遺伝子を含む受容体型チロシンキナーゼ等のリン酸化蛋白質の集積の要となることを明らかにした(佐谷ら、Cancer

Res 2012; Clin Cancer Res 2012)。⑤CD44v 制御が可能なマイクロ RNA を同定し、癌幹細胞の核酸創薬に向けて基盤を構築した(落谷・佐谷ら、Natute Med 2011)。⑥転移性大腸癌では、低酸素環境でスプライシング因子が PKM2 を酸化ストレス応答型にシフトさせることを明らかにした(森・佐谷・落谷・石井ら)。⑦CD44v 分子の機能を阻害する Salfasalazine を癌治療の臨床応用するために、生体内での分解を回避して癌を効率よく攻撃するために、最新鋭の薬剤到達システム(DDS)の開発を推進した(佐谷・落谷・片岡ら)。また、誘導されたリプログラミング癌細胞(iPC 細胞)の性質を詳細に調べたところ、⑧低酸素応答異常等の悪性腫瘍を特徴付ける微小環境においてリプログラミング効率が有意に高く、そのメカニズムとして低酸素応答遺伝子 HIF2a が責任遺伝子・創薬標的の有力候補として同定された(森・石井ら;Int J Oncol 2011)。⑨短期培養では調べ得た消化器癌細胞の約 70%で悪性形質の喪失が観察されたが、長期培養では p53 欠損 K-ras 変異が存在する細胞株(2株)で悪性形質が再獲得され、そのメカニズムとしてゲノム不安定性(genomic instability)の関与が示唆された(森・石井ら;BBRC 2010)。⑩誘導されたリプログラミング癌細胞(iPC 細胞)の表面抗原を細胞生化学的に詳細に検討したところ、細胞内低酸素応答機構・嫌気性解糖系の動的平衡が重要な役割を果たしていることが明らかとなり(森・石井ら;Int J Oncol 2011)、細胞表面抗原として『CD44variant』などの癌細胞の『代謝特性』に関わる癌幹細胞マーカーを新たに同定して究明した(佐谷・森ら;Cancer Cell 2011; Mol Cell 2011; J Clin Inv 2011; Cancer Res 2012 他)。⑪高精度のメカニズム解析として、山田

らは、京都大学 iPS 研究所(山中伸弥所長、2012 年ノーベル賞受賞)の施設拠点を最大限に活用し、軟部組織腫瘍の癌遺伝子 EWS の遺伝子改変マウスを差し新鋭の誘導型 iPS 因子遺伝子改変マウスと掛け合わせて詳細に解析し、細胞リプログラミングと悪性腫瘍の情報伝達経路を解明した。総合的に、分子制御系を人為的に操作すれば革新的なリプログラミング(metabolic)が医療ツールとして実現可能であることが明らかとなり、癌幹細胞の性質を根本から大きく変革して根絶するための革新的新技術基盤を構築した。癌細胞の性質を大きく変えるリプログラミング技術は、転写因子により誘導する epigenetic リプログラミングと、代謝特性を操作する metabolic リプログラミングが含まれる(Hallmarks of Cancer; Cell 2011)。癌克服の目的からは、今後双方を踏まえた形で新治療戦略を構築することが重要である。そこで技術的な側面からは、⑫転写因子に依らない新しい方法としてマイクロ RNA のみでリプログラミング(epigenetic,metabolic)を実現できる基盤技術を構築し(森・石井ら;mi-iPS; 2011 年 5 月読売・毎日・日経新聞掲載: Cell Stem Cell 2011)、癌幹細胞に対しては重要な創薬であることを示した(落谷ら;J Biol Chem 2011 他)。⑬リプログラミングのマイクロ RNA である miR-302 は Bmi1 と Cdk2 制御を介して細胞周期回転を抑制し、また miR200c は上皮間葉系形質転換(EMT)を介して、また miR-369 は CD44v-PKM2 のスプライシングを介して、癌を不活性化する分子機構を究明した(森・佐谷・石井ら)。⑭臨床応用を目指して、リプログラミングのマイクロ RNA に基づく架橋型 RNA 分子の作成とマイクロ RNA のシーズを最適化を推進した。⑮臨床応用を目指して、リプログ

ラミングのマイクロ RNA の効果的な薬剤到達システム(DDS)の開発を推進した(森・片岡・西山・石井ら)。<sup>⑩</sup>更に、DDS の臨床応用を着実に具現化する為に、低酸素に標準を合わせたミセルが難治がんとして知られるスキルス胃癌の治療に有効であることを実証した(片岡・西山・佐谷ら; J. Control. Release 2012)。<sup>⑪</sup>癌幹細胞に結合するペプチドリガンドを搭載したミセルを開発し、固形癌治療における有効性を明らかにした(片岡・西山・森ら; ACS Nano 2012)。<sup>⑫</sup>CD44v 陽性の固形癌(OSC19細胞)に対して高分子ミセルが優れた薬効を示すことを実証した(片岡・西山ら; 未発表データ)。<sup>⑬</sup>Salfasalazine を効率的に内包した高分子ミセルを構築し、ミセルからの薬剤のスロリリースを達成した(片岡・西山・佐谷ら; 未発表データ)。

また、【免疫担当細胞】に対するリプログラミングとして、癌細胞特異的な免疫担当細胞をリプログラミング誘導する基盤技術の整備を進めた(T-iPS 細胞)。平成23-24年度は、癌幹細胞を標的とした革新的治療として、<sup>⑭</sup>ES細胞ならびに健常者由来 iPS 細胞を用いて、効率のよい樹状細胞誘導条件の検討、<sup>⑮</sup>ウイルス抗原ペプチドに反応するT細胞受容体(TCR)を持つヒト T 細胞クローンより T-iPSC を作製。そこから分化させた CD3 陽性細胞の TCR がもとのクローンと同様のウイルス抗原ペプチドを認識できることを確認。<sup>⑯</sup>ラット ES/iPS 細胞を相同組み合わせにより遺伝子改変し共通 γ 鎖ノックアウトラットを作出。同ラットは末梢血リンパ球の大部分を欠くことを確認した(中内ら; JEM 2011; Pros ONE 2011; Cell 2011 他)。これらにより、低酸素に照準を合わせたミセル(片岡・西山ら; Nature Nanotech 2011 他)と融合させて癌幹細胞の

標的分子に照準を合わせてこれを攻撃する見通しが立った。以上の如く、消化器癌の根絶化に向けた新技術の再構築として、腫瘍・宿主の双方から消化器癌の癌幹細胞の性質を根本からリプログラミングする新治療戦略の基盤を構築した。『CD44v が演出する代謝特性』を『橋頭堡(きょうとうほ; bridgehead)』として、結合蛋白質(佐谷・石井・森)、マイクロ RNA(落谷)、阻害剤ミセル(片岡)、免疫担当細胞(中内)、核内リプログラミング事象(山田・石井・森)から班員が一丸となって次年度に向けて展開し、難治癌を克服する。

#### D. 考察

前年度に引き続き、事業を展開した。早期の臨床応用を目指す場合に、研究理念のベクトルに沿った形で創薬を出来上がり次第、臨床応用に向けて順次発射していける骨太の体制が必要である。CD44v の代謝特性に対しては、①【代謝創薬】第一に、CD44v の代謝特性の阻害剤(Salfasalazine)が癌幹細胞の代謝創薬の臨床応用に向けて最も近い状態にある。阻害剤(Salfasalazine)のミセル化が必須である理由は、この化合物の代謝動態にある。Salfasalazine は体内で代謝されて、5-ASA(ペンタサ)と Salfapyridine の2種類に開裂されるが、癌幹細胞創薬として xCT 阻害に使用する場合には前駆体の Salfasalazine のみ有効であり、分解産物である 5-ASA(ペンタサ)と Salfapyridine には活性がない。この点で潰瘍性大腸炎では、Salfasalazine とともに 5-ASA(ペンタサ)も有効成分であることと異なっており、癌幹細胞創薬として応用する場合には、Salfasalazine をミセル保護した製剤が必須である(佐谷・片岡・落谷ら・本班員一同)。

②【抗体創薬】第二に、CD44v の抗体創薬があ

げられる。本研究班(佐谷ら)は CD44variant9 の抗体は現時点で保持しており、本研究班の事業は消化器癌の制圧に重要な役割を担う。一方、CD44variant6 の抗体は米国で開発が進んでいるが主に肝臓や動物ラットで優先的に遺伝子発現しており、消化器癌とはスペクトラムが相違する。この現状を踏まえて、前期(3年)の目標として、CD44v の代謝特性の阻害剤(Sulfasalazine)の臨床応用の基盤構築の完成を目指し、独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)コンサルトまで推進する(佐谷・片岡・西山・森ら)。抗体創薬は並行して準備を重ね、前期(3年)ないし中期(3年)での上呈まで漕ぎ着ける(佐谷ら・本班員一同)。③【核酸創薬】マイクロ RNA による CD44v 制御、および CD44v や PKM2 スプライシングに対する核酸創薬のシーズを最適化し、DDS に搭載させ次世代医療を実現する(落谷・森・片岡・西山・石井ら・本班員一同)。④【免疫創薬】細胞治療として CD44v 等の癌幹細胞を標的化できるためのヒト T 細胞クローンより T-iPSC をリプログラミングできる技術の基盤構築を完成させる(中内・本班員一同)。⑤【創薬と機構解明】次世代に向けた知的財産の構築として、創薬活動の中から新たな原理原則を発見し、本研究班の成果情報を活用できるようにする(山田・石井ら・本班員一同)。

#### E. 結論

研究計画の2年目として、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) Miyagaki H, Yamasaki M., Takahashi T., Kurokawa Y., Miyata H., Nakajima K., Takiguchi S., Fujiwara Y., Mori M., Doki Y. DOK2 as a marker of poor prognosis of patients with gastric adenocarcinoma after curative resection. *Ann Surg Oncol*, 19(5):1560-1567, 2012
- 2) Sugimura K., Miyata H., Tanaka K., Hamano R., Takahashi T., Kurokawa Y., Yamasaki M., Nakajima K., Takiguchi S., Mori M., Doki Y. Let-7 expression is significant determinant of response to chemotherapy through the regulation of IL-6/STAT3 pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 18(18): 5144-5153, 2012
- 3) Yamada D., Kobayashi S., Yamamoto H., Tomimaru Y., Noda T., Uemura M., Wada H., Marubashi S., Eguchi H., Tanemura M., Doki Y., Mori M., Nagano H. Role of the hypoxia-related gene, JMJD1A, in hepatocellular carcinoma: clinical impact on recurrence after hepatic resection. *Ann Surg Oncol*, (3):355-364, 2012
- 4) Hinohara K., Kobayashi S., Kanauchi H., Shimizu S., Nishioka K., Tsuji E., Tada K., Umezawa K., Mori M., Ogawa T., Inoue J., Tojo A., Gotoh N. ErbB receptor tyrosine kinase/NF- $\kappa$ B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer.

- Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(17): 6584-6589,2012
- 5) Tanemura M., 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):102-114, 2012
  - 6) Takiguchi S., Adachi S., Yamamoto K., Morii E., Miyata H., Nakajima K., Yamasaki M., Kangawa K., Mori M., Doki Y. Mapping analysis of ghrelin producing cells in the human stomach associated with chronic gastritis and early cancers. *Dig Dis Sci*, 57(5):1238-1246, 2012
  - 7) Takiguchi S., Yamamoto K., Hirao M., Imamura H., Fujita J., Yano M., Kobayashi K., Kimura Y., Kurokawa Y., Mori M., Doki Y. A comparison of postoperative quality of life and dysfunction after Billroth I and Roux-en-Y reconstruction following distal gastrectomy for gastric cancer: results from a multi-institutional RCT. *Gastric Cancer*, 15(2):198-205, 2012
  - 8) Miyata H., Yano M., Yasuda T., Hamano R., Yamasaki M., Hou E., Motoori M., Shiraishi O., Tanaka K., Mori M., Doki Y. Randomized study of clinical effect of enteral nutrition support during neoadjuvant chemotherapy on chemotherapy-related toxicity in patients with esophageal cancer. *Clin Nutr*, 31(3):330-336, 2012
  - 9) Miyata H., Yamasaki M., Kurokawa Y., Takiguchi S., Nakajima K., Fujiwara Y., Mori M., Doki Y. Clinical relevance of induction triplet chemotherapy for esophageal cancer invading adjacent organs. *J Surg Oncol*, 106(4):441-447, 2012
  - 10) Mizushima T., Ikeda M., Sekimoto M., Yamamoto H., Doki Y., Mori M. Laparoscopic bladder-preserving surgery for enterovesical fistula complicated with benign gastrointestinal disease. *Case Rep Gastroenterol*, 6(2):279-284, 2012
  - 11) Nishida N., Yamashita S., Mimori K., Sudo T., Tanaka F., Shibata K., Yamamoto H., Ishii H., Doki Y., Mori M. MicroRNA-10b is a prognostic indicator in colorectal cancer and confers resistance to the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil in colorectal cancer cells. *Ann Surg Oncol*, 19(9):3065-3071, 2012
  - 12) Kagawa Y., Hata S., Shimizu J., Sekimoto M., Mori M. Transumbilical laparoscopic-assisted appendectomy for children and adults. *Int J Colorectal Dis*, 27(3):411-413, 2012
  - 13) Miyagaki H., Nakajima K., Hara J., Yamasaki M., Kurokawa Y., Miyata H., Takiguchi S., Fujiwara Y., Mori M., Doki Y. Performance comparison of peripherally inserted central venous catheters in gastrointestinal surgery: a randomized controlled trial. *Clin Nutr*, 31(1):48-52, 2012

- 14) Tomimaru Y, Eguchi H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Umeshita K, Kim T, Wakasa K, Doki Y, Mori M, Nagano H. IGFBP7 downregulation is associated with tumor progression and clinical outcome in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 130(2):319-327,2012
- 15) Yamamoto H, Oshiro R, Ohtsuka M, Uemura M, Haraguchi N, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Doki Y, Mori M. Distinct expression of C4.4A in colorectal cancer detected by different antibodies. *Int J Oncol*. Jan;42(1):197-201,2013
2. 学会発表
- 1) 森正樹:the art of reduced port surgery ~新しい体腔内 Anchor System を用いた腹腔鏡下手術~, 第112回 日本外科学会定期学術集会、2012年4月12日 千葉
- 2) 森正樹、他:消化管 stem cell の新たな展開、第98回 日本消化器病学会総会、2012年4月19日~4月21日 東京
- 3) 太田勝也、他:大腸癌幹細胞の維持に關与するエピジェネティクス、第33回 癌免疫外科研究会、2012年5月17日~5月18日 横浜
- 4) 森正樹:分子標的治療薬の臨床薬理、第16回 日本がん分子標的治療学会、2012年6月27日~6月29日 福岡
- 5) 賀川義規:癌の細胞周期蛍光イメージングによる抗腫瘍薬の効果ポイントの可視化、第22回 日本サイトメトリー学会 学術集会、2012年6月29日~6月30日 大阪
- 6) 原口直紹、他:癌発生と進展のメカニズム、第21回 日本癌病態治療研究会、2012年7月6日~7月7日 群馬
- 7) 賀川義規、他:癌の生体イメージング—細胞周期と細胞可動性について—、第67回 日本消化器外科学会総会、2012年7月18日~7月20日 富山
- 8) 森正樹:消化器系腫瘍における癌幹細胞研究の今後の展望、第71回 日本癌学会学術総会、2012年9月19日~9月21日 札幌
- 9) 森正樹、他:大腸癌の悪性度診断と臨床応用、第67回 日本大腸肛門病学会学術集会、2012年11月16日~11月17日 福岡
- 10) 森正樹:さまざまなストレスに対処する為に機能するオートファジー機構、第16回 日本統合医療学会、2012年12月8日~12月9日 大阪
- 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。

## 固形癌幹細胞の代謝特性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、固形癌幹細胞(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、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っている。本年度は、癌幹細胞マーカーCD44v 陽性の癌細胞に対してシスプラチン(CDDP)との併用により優れた治療効果を示すことが確認されているスルファサラジン(スルファサラジン)を全身投与によって固形がんの有効に作用させることを目的としてスルファサラジンを内包した高分子ミセルを開発した。さらに CD44v 陽性のヒト扁平上皮がん(OSC-19)に対して白金錯体抗癌剤(ダハプラチン)を内包した高分子ミセルの治療効果を検証したところ優れた抗癌活性が確認された。

### A. 研究背景、目的 (背景)

これまでに悪性腫瘍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、癌幹細胞の存在が示唆されている。癌幹細胞(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、抗癌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。

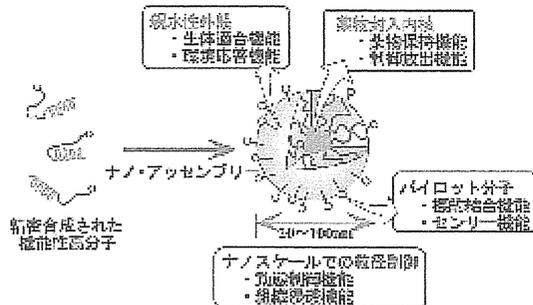


図1. 高分子ミセル型 DDS の概念図

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、優れた抗癌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試験が国内外で実施されている。

本研究では、癌幹細胞マーカーCD44v 陽性の癌細胞に対して優れた効果を示す高分子ミセルの開発を目指して研究を実施した。近年、研究分担者の佐谷らは、CD44v はシスチントランスポーターの安定化に寄与し、細胞内のグルタチオン(GSH)濃度を増大させていることを見出し、シスチントランスポーターを阻害するスルファサラジンはシスプラチン(CDDP)の薬効を高めることを見出した(Cancer Cell 19: 387-400 (2011))。しかしながら、スルファサラジンは経口投与において腸内細菌によって分解を受けることが知られており、大量投与が必要となることが問題であった。そこで本研究では、スルファサラジンを全身投与によって固形がんにも効率的に作用させることを目的としてスルファサラジンを内包した高分子ミセルを開発した。一方、片岡らは、高分子ミセルがナノスケールのトロイの木馬としてがん細胞に作用し、GSH 等による白金抗癌剤の失活を回避できることを明らかにしており(Science Transl. Med. 3: 64ra2(2011))、本研究では同様のメカニズムによって癌幹細胞の治療抵抗性が克服できるかを明らかにす

るために、CV44v 陽性固形がん(ヒト扁平上皮がん OSC-19)に対する白金抗癌剤(ダハプラチン)内包高分子ミセルの有効性を検証した。

## B. 研究方法

### 1) スルファサラジン内包ミセルの調製

特許出願を予定しているために省略

### 2) CV44v 陽性ヒト扁平上皮がん OSC-19 に対するダハプラチン内包高分子ミセルの有効性評価

OSC-19 細胞 ( $1 \times 10^6$ ) を Balb/c nude (メス、6 週齢) の皮下に移植し、固形がんを形成させた後、オキサリプラチン (8mg/kg) およびダハプラチン内包ミセル (3mg/kg) を 2 日おきに 3 回投与した (0, 2, 4 日目)。抗腫瘍効果は腫瘍サイズの測定によって評価し、全身毒性をマウスの体重によって評価した。

(倫理面への配慮)

該当なし

## C. 研究結果

### 1) スルファサラジン内包ミセルの調製

本研究では、粒径約 50nm、多分散度 0.138 のスルファサラジン内包ミセルを調製することができた。スルファサラジン内包ミセルは水中において安定であり、長期保存が可能であるものと考えられる。一方で、10mM PBS (150mM NaCl, pH7.4) においてミセルはスルファサラジンを徐放することが確認された (図 2)。

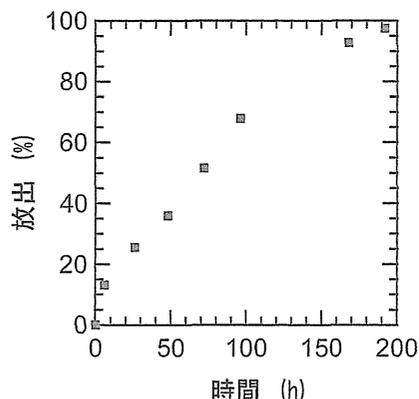


図 2. 10mM PBS (150mM NaCl, pH7.4) 中におけるミセルからのスルファサラジンのリリース挙動  
このように、スルファサラジン内包ミセルは、EPR 効果によって固形癌に集積でき、癌組織

内でスルファサラジンを徐放することができる理想的な製剤であるものと考えられた。

### 2) CV44v 陽性ヒト扁平上皮がん OSC-19 に対するダハプラチン内包高分子ミセルの有効性評価

OSC-19 の皮下腫瘍モデルに対するダハプラチン内包ミセルの治療効果を図 3 に示す。

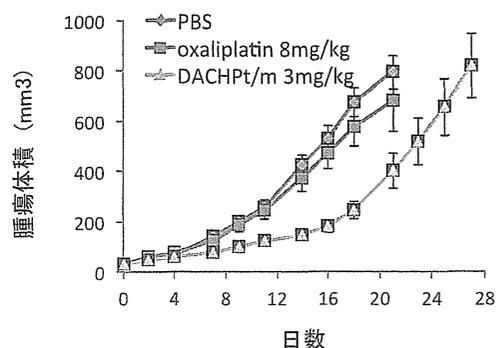


図 3. CD44v 陽性 OSC-19 の固形がんモデルに対するオキサリプラチンおよびダハプラチン内包ミセル (DACHPt/m) の抗腫瘍効果

以上のようにダハプラチン内包ミセルは、OSC-19 の固形癌モデルに対して有意な抗癌活性を示すことが確認された。マウスの体重変化の測定においては、ダハプラチン内包ミセルの 3 回目の投与後に一過的な体重減少を示したもののその後体重の回復が認められ、ダハプラチン内包ミセルによる致死的な毒性は確認されなかった。

## D. 考察

本年度は、シスチントランスポーターを阻害することによって癌幹細胞マーカー CD44v 陽性の治療抵抗性癌細胞に対して優れた治療効果を示すスルファサラジンを内包した高分子ミセルの調製法を確立した。スルファサラジン内包ミセルは初期バーストを示すことなく 200 時間で約 100% の薬剤をリリースするという理想的な薬剤放出挙動を示し、EPR 効果による固形癌への集積と癌組織内で薬剤のスローリリースを両立できる理想的な製剤であるものと考えられる。スルファサラジンは経口投与においては腸内細菌によるアゾ結合の分解が問題となるが、ミセル製剤は静脈内投与が可能であり、薬剤のバイオアベイラビリティの向上と固形癌への集積効果によってフリーの薬剤と比較して投与量を大幅に低減できる

ものと期待される。

OSC-19 細胞は、CD44v の過剰発現によってシスチントランスポーターを安定化し、細胞内 GSH 濃度を高めることによって白金抗癌剤に対して耐性を示すことが示唆されているが、本研究では高分子ミセルがこのような白金抗癌剤に対する耐性を克服できることを明らかにした。過去の研究により、ダハプラチン内包ミセルは、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた後に、初期エンドソームにおいては薬剤を放出せず、標的である核の近傍の後期エンドソーム/リソソームにおいて効率的に薬剤を放出することが確認されている(Science Transl. Med. 3: 64ra2(2011))。従って、ダハプラチン内包ミセルは、小胞輸送によって細胞質を迂回し、標的である核に効率的に薬剤を送達することができるものと考えられる。一方、ダハプラチン内包ミセルの治療抵抗性癌に対する治療効果をさらに高めるためにはミセルの細胞内取り込み量を向上させる必要があり、現在はミセルの癌幹細胞による取り込み効率を向上させるためのリガンド分子の検討を行っている。

## E. 結論

本年度は、(i) スルファサラジン内包ミセルの調製と、(ii) CV44v 陽性ヒト扁平上皮がん OSC-19 に対するダハプラチン内包ミセルの有効性の評価を行った。(i)に関しては、現在、慶応大の佐谷らの研究グループと固形癌モデルの治療の検討を実施中である。(ii)に関しては、いくつかのリガンドを検討し、その一部においてはリガンドなしミセルの全身投与によって優れた抗癌活性が確認されている。今後はリガンド導入ミセルについても OSC-19 の固形癌モデルに対する治療効果を検証する予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. S. Wu, V. Kasim, M. R Kano, S. Tanaka, S. Ohba, Y. Miura, K. Miyata, X. Liu, A. Matsushashi, U.-I Chung, K. Kataoka, N. Nishiyama, M. Miyagishi, Transcription factor YY1 contributes to tumor growth by stabilizing hypoxia factor HIF-1 $\alpha$  in a p53-independent manner. *Cancer Res.*, in press
2. P. Mi, H. Cabrala, D. Kokuryo, M. Rafi, Y.

- Terada, I. Aoki, T. Saga, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Kataoka, Gd-DTPA-loaded polymer-metal complex micelles with high relaxivity for MR cancer imaging. *Biomaterials*, 34 (2) 492-500 (2013)
3. N. Gouda, K. Miyata, R.J. Christie, T. Suma, A. Kishimura, S. Fukushima, T. Nomoto, X. Liu, N. Nishiyama, K. Kataoka, Silica nanogelling of environment-responsive PEGylated polyplexes for enhanced stability and intracellular delivery of siRNA. *Biomaterials*, 34 (2) 562-570 (2013)
4. M. Sanjoh, K. Miyata, R. J. Christie, T. Ishii, Y. Maeda, F. Pittella, S. Hiki, N. Nishiyama, K. Kataoka, A dual environment-responsive polyplex carrier for enhanced intracellular delivery of plasmid DNA. *Biomacromolecules*, 13 (11) 3641-3649 (2012)
5. K. Osada, H. Cabral, Y. Mochida, S. -E. Lee, K. Nagata, T. Matsuura, M. Yamamoto, Y. Anraku, A. Kishimura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Bioactive polymeric metallosomes self-assembled through block copolymer-metal complexation. *J. Am. Chem. Soc.* 134 (32) 13172-13175 (2012)
6. T. Suma, K. Miyata, Y. Anraku, S. Watanabe, R. J. Christie, H. Takemoto, M. Shioyama, N. Gouda, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Kataoka, Smart multilayered assembly for biocompatible siRNA delivery featuring dissolvable silica, endosome-disrupting polycation, and detachable PEG. *ACS Nano* 6 (8) 6693-6705 (2012)
7. H. Takemoto, K. Miyata, T. Ishii, S. Hattori, S. Osawa, N. Nishiyama, K. Kataoka, Accelerated polymer-polymer click conjugation by freeze-thaw treatment. *Bioconjugate. Chem.* 23 (8) 1503-1506 (2012) [Selected as Cover Picture]
8. F. Pittella, K. Miyata, Y. Maeda, T. Suma, S. Watanabe, Q. Chen, R. J. Christie, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles. *J. Control. Release* 161 (3) 868-874 (2012)
9. M. Kumagai, S. Shimoda, R. Wakabayashi, Y. Kunisawa, T. Ishii, K. Osada, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, K. Nakano,

- Effective transgene expression without toxicity by intraperitoneal administration of PEG-detachable polyplex micelles in mice with peritoneal dissemination. *J. Control. Release* 160 (3) 542-551 (2012).
10. R. J. Christie, Y. Matsumoto, K. Miyata, T. Nomoto, S. Fukushima, K. Osada, J. Halnaut, F. Pittella, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Kataoka, Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection. *ACS Nano* 6 (6) 5174-5189 (2012)
  11. Md. 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* 159 (2) 189-196 (2012).
  12. K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, Rational design of smart supramolecular assemblies for gene delivery: Chemical challenges in the creation of artificial viruses. *Chem. Soc. Rev.* 41 (7) 2562-2574 (2012)
  13. 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)
  14. 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)
2. 学会発表  
(国内学会)
    1. 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, BIOtech 2012, 2012. 04. 27, 東京ビッグサイト, 東京都, 特別講演
    2. 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 51 回日本生体医工学会大会, 2012. 05. 10, 福岡国際会議場, 福岡県, 特別講演
    3. 片岡一則, 薬物・遺伝子ターゲティングのための超分子ナノキャリア設計, 高分子学会 12-1 超分子研究会「超分子/高分子新材料設計」, 2012. 05. 15, 東京工業大学蔵前会館, 東京都, 招待講演
    4. 片岡一則, 高分子の機能と材料開発: ナノバイオテクノロジー分野への展開を中心に, 東レ第 2 回先端材料研究フォーラム, 2012. 05. 21, 東レ株式会社 滋賀事業所, 滋賀県, 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, 情報機構セミナー「核酸医薬の開発戦略と今後の展望」, 2012. 05. 24, きゅりあん, 大井町, 東京都, 招待講演
    6. 片岡一則, 薬物・遺伝子ターゲティングのための超分子ナノデバイス設計, 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 2012. 07. 04, 札幌コンベンションセンター, 北海道, 招待講演
    7. 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~, 第 28 回創薬セミナー, 2012. 07. 26, 八ヶ岳ロイヤルホテル, 山梨県, 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~, 第 19 回愛媛オンコロジーフォーラム, 2012. 08. 10, ホテル JAL シティ松山, 愛媛県松山市, 招待講演
    9. 片岡一則, 医療イノベーションを先導するバイオマテリアル~高分子ナノキャリアによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー~, 日本技術士会化学部会 2012 年 8 月度例会, 2012. 08. 23, 日本技術士会会議室, 東京, 招待講演
    10. 片岡一則, 最先端ナノ DDS が拓く医療イノベーション~超分子なデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー~, 東海メディカルプロダクト創立 30 周年記念シンポジウム, 2012. 09. 01, ウェスティンナゴヤキャ

- ッスルホテル, 名古屋市, 招待講演
11. 片岡一則, 高分子ミセルによる薬物・遺伝子デリバリー/ミセル製剤によるピンポイントデリバリーを中心に、がんや難病治療における DDS 製剤の現状およびバイオ医薬品の有効性・安全性を高める DDS 製剤への期待を含む内容, 第7回 品質/科学技術特別研修 ナノメディシン (ナノ医薬品) による DDS の現状と展望” 2012. 11. 14, 日本薬学会 長井記念ホール, 東京都, 招待講演
  12. 片岡一則, ナノテクノロジーで創る「魔法の弾丸」: がんの標的医療への挑戦, 東京大学 2012 第 63 回駒場祭, 2012. 11. 25, 21KOMCEE レクチャーホール 東京大学駒場キャンパス, 東京都, 招待講演
  13. 片岡一則, 難治がんの標的治療を実現する最先端 ナノ DDS 技術, NanoTech2013 第 12 回国際ナノテクノロジー総合展・技術会議, 2013. 01. 30, 東京ビッグサイト東 4~6 ホール内メインシアター, 基調講演
  14. 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~, AKUA 学術集会特別講演, 2013. 03. 01, グランドプリンスホテル高輪, 東京, 特別講演
- (国際学会)
1. K. Kataoka, Block Copolymer Micelles as Smart Nanocarriers for Drug Delivery, Seminar at Eisai Inc./Andver Site, 2012.04.09, Andver, Massachusetts, USA, 招待講演
  2. K. Kataoka, Block Copolymer Micelles as Smart Nanocarriers for Drug Delivery Seminar at Novartis Institute for Biomedical Research, 2012.04.09, Cambridge, Massachusetts, USA, 招待講演
  3. K. Kataoka, Supramolecular Structures Self-assembled from Engineered Block Copolymers for Theranostics Nanodevice 2012, MRS Spring Meeting 2012.04.11, Marriott Marquis Hotel, San Francisco, California, USA, 招待講演
  4. K. Kataoka, Block Copolymer Self-Assemblies as Smart Nanocarriers in Gene and Drug Delivery High Polymer Research Group Conference 2012, 2012.05.02, Shrigley Hall, Pott Shrigley, Cheshire, UK, 招待講演
  5. K. Kataoka, Smart Supramolecular Nanostructures from Block Copolymers for Gene and Drug Delivery Seminar at West China School of Pharmacy, Sichuan University, 2012.06.02, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, China, 招待講演
  6. K. Kataoka, Smart Supramolecular Nanostructures from Block Copolymers for Gene and Drug Delivery, 9th World Biomaterials Congress, 2012.06.04, New International Convention & Exposition Center Chengdu Century City, Chengdu, China, 基調講演
  7. K. Kataoka, Supramolecular Nanodevices from Functionalized Block Copolymers for Molecular Therapy, CIMTEC 2012 (4th International Conference on Smart Materials, Structures and Systems), 2012.06.14, Palazzo dei Congressi, Montecatini Terme, Italy, 招待講演
  8. K. Kataoka, Medical Innovation through Polymer Chemistry: Supramolecular Structures of Block Copolymers as Smart Nanodevices for Gene and Drug Delivery, IUPAC World Polymer Congress 2012 (IUPAC MACRO 2012), 2012.06.24, Virginia Tech Campus, Blacksburg, Virginia, USA, 基調講演
  9. K. Kataoka, Supramolecular Nanomedicines for Targeted Cancer Therapy, IUPAC World Polymer Congress 2012 (IUPAC MACRO 2012), 2012.06.25, Virginia Tech Campus, Blacksburg, Virginia, USA,

- 招待講演
10. K. Kataoka, Supramolecular Nanomedicines for Targeted Cancer Therapy, The University of Texas MD Anderson Cancer Center & The University of Tokyo 1st Joint Symposium 2012 "Bridging Cancer Nanotechnology", 2012.08.13, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA, 招待講演
  11. K. Kataoka, "Self-Assembled Nanostructures of Block Copolymers as Smart Vehicles for Gene and Drug Delivery", 2nd Symposium on Innovative Polymers for Controlled Delivery (SIPCD 2012), 2012.09.12, Garden Hotel, Suzhou, China, 招待講演
  12. K. Kataoka, Smart Supramolecular Nanotheranostic to Overcome Resistances to The Treatment of Severe Diseases 10th France-Japan DDS Symposium In Memory of Gérard Dél  ris, 2012.10.11, Place de la Com  die, Bordeaux, France, 招待講演
  13. K. Kataoka, Supramolecular Nanomedicines for Targeted Cancer Therapy, From Nanotechnology Platform to Clinical Nanomedicine, 2012.11.22, GyeongJu Hilton Hotel, Korea, 招待講演
  14. K. Kataoka, Self-assembled Nanostructures of Block Copolymers as Smart Vehicles for Gene and Drug Delivery, 2012 USA-Japan Seminar on Polymer Synthesis – From Monomers to Polymers to Materials to Applications, 2012.12.03, The Santa Barbara Hyatt, Santa Barbara, LA, 招待講演
  15. K. Kataoka, Successful developments of phospholipid polymer biomaterials designed with bioinspiration NIPAM-80 New Innovations in Polymers And (bio)Materials, A Symposium on the Future of Biomaterials to Celebrate Allan S. Hoffman's 80th Birthday ,

2012.12.16, Hyatt Regency Hotel, Ka'anapali, Maui, Hawaii, USA, 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  
スルファサラジン内包ミセルに関しては特許出願を予定
- 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**

我々は近年、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。それを受けて癌抗原特異的な 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」開発を検討している。その一環として、現在は癌（幹）細胞由来の iPS 細胞から樹状細胞（DC）を分化誘導する手法の開発に取り組んでいる。T 細胞由来の iPS 細胞でも、適切な分化誘導条件により、マクロファージや DC といった抗原提示細胞へと効率よく分化できることが明らかになった。抗原特異的 T 細胞の誘導あるいは再誘導においてこれらの抗原提示細胞が促進的に働くか否かを検討している。

**A. 研究背景、目的**

悪性腫瘍を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。昨年度から引き続き検討を行った結果、抗原特異的な末梢血ヒト T 細胞クローンから、「若返った」抗原特異的 T 細胞を大量に作り出すことに成功した (Nishimura T *et al*, *Cell Stem Cell*, 2013)。今年度は、この技術を基本に消化器癌（幹）細胞を標的として、より効率のよい治療法の開発と、評価に有用な動物モデルの開発を目指した。

**B. 研究方法**

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以前から報告されているが、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。

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ことを目指し、本年度は iPS 細胞からの抗原提示細胞の分化系を開発した。

また、近年ラット 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の開発を試みた。

**（倫理面への配慮）**

実施にあたり倫理委員会の承認を得た。

**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 CD8 T 細胞はメモリー 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 (Nishimura T *et al*, *Cell Stem Cell*, 2013)。消化器癌（幹）細胞由来のヒト iPS 細胞はまだ得られていないため、通常の T-iPS 細胞を用いて、抗原提示細胞への分化誘導を試みたところ、形態と表面抗原の発現に関して、マクロファージあるいは DC と呼ぶうる細胞をそれぞれ誘導することに成功した。現在は同細胞の機能評価を行うと共に、癌関連遺伝子を強発

現させた iPS 細胞を用いて抗原提示細胞を誘導し、抗原提示能の確認を試みている。

## 2. ラット iPS 細胞を用いて

共通ガンマ鎖をノックアウトした免疫不全ラットを作出した。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。一方、ヒト造血細胞の移植には抵抗性であった。

## 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。また消化器癌を対象に癌(幹)細胞由来の iPS 細胞からの DC 誘導する戦略の基礎として、iPS 細胞からの抗原提示細胞誘導法を確立した。今後は消化器癌(幹)細胞由来の iPS 細胞を樹立し、消化器癌抗原特異的な T 細胞の増幅、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。

iPS 細胞からの抗原提示細胞誘導法を開発した。

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. Toshinobu Nishimura, Shin Kaneko, Ai Kawana-Tachikawa, Yoko Tajima, Haruo Gotoh, Dayong Zhu, Kaori Nakayama, Shoichi Iriguchi, Yasushi Uemura, Takafumi Shimizu, Naoya Takayama, Daisuke Yamada, Ken Nishimura, Manami Ohtaka, Nobukazu Watanabe, Satoshi Takahashi, Aikichi Iwamoto, Haruhiko Koseki, Mahito Nakanishi, Koji Eto and Hiromitsu Nakauchi. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by pluripotency reprogramming and dedifferentiation.

*Cell Stem Cell.* (accepted for publication)

2. Oikawa T, Kamiya A, Zeniya M, Chikada H, Hyuck AD, Yamazaki Y, Wauthier E, Tajiri H, Miller LD, Wang XW, Reid LM, Nakauchi H. SALL4, a stem cell biomarker in liver cancers. *Hepatology.* 2012 Nov 23. doi: 10.1002/hep.26159.
3. Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Oshima M, Takagi H, Miyagi S, Endoh M, Endo TA, Takayama N, Eto K, Toyoda T, Koseki H, Nakauchi H, Iwama A. Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Blood.* 2012 Nov 20.
4. Yamaguchi T, Hamanaka S, Kamiya A, Okabe M, Kawarai M, Wakiyama Y, Umino A, Hayama T, Sato H, Lee YS, Kato-Itoh M, Masaki H, Kobayashi T, Yamazaki S, Nakauchi H. Development of an All-in-One Inducible Lentiviral Vector for Gene Specific Analysis of Reprogramming. *PLoS One.* 2012;7(7):e41007. Epub 2012 Jul 18.
5. Nakamura S, Oshima M, Yuan J, Saraya A, Miyagi S, Konuma T, Yamazaki S, Osawa M, Nakauchi H, Koseki H, Iwama A. Bmi1 confers resistance to oxidative stress on hematopoietic stem cells. *PLoS One.* 2012;7(5):e36209. Epub 2012 May 11.
6. Kumano K, Arai S, Hosoi M, Taoka K, Takayama N, Otsu M, Nagae G, Ueda K, Nakazaki K, Kamikubo Y, Eto K, Aburatani H, Nakauchi H, Kurokawa M. Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood.* 2012 Jun 28;119(26):6234-42. Epub 2012 May 16.
7. Tashiro Y, Nishida C, Sato-Kusubata K, Ohki-Koizumi M, Ishihara M, Sato A, Gritli I, Komiyama H, Sato Y, Dan T, Miyata T, Okumura K, Tomiki Y, Sakamoto K, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K. Inhibition of PAI-1 induces neutrophil-driven neoangiogenesis and promotes tissue regeneration via production of angiocrine factors in mice.