

固形癌幹細胞の代謝特性に関わる CD44 経路等を標的とした高分子ミセル型 DDS の開発

担当責任者 西山伸宏 東京工業大学 資源化学研究所 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搭載した DDS の開発を行っている。具体的には、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の溶解性を改善し、静脈内投与が可能な DDS として、新規の高分子-スルファサラジンコンジュゲートを開発した。この高分子-スルファサラジンコンジュゲートの癌幹細胞に対する有効性は、佐谷らのグループと連携して確認した。一方、スルファサラジン以外の薬剤として、CD13 陽性がん細胞等に対する有効性が報告されているベスタチンの高分子コンジュゲート体の開発にも着手した。

A. 研究背景、目的

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(GSH)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。

近年、癌幹細胞に有効性を示す薬剤として、研究分担者の佐谷らは、シスチントランスポーターxCTを阻害するスルファサラジンを見出した(Cancer Cell 19: 387-400 (2011))。癌幹細胞において、癌幹細胞マーカーとして知られるCD44vはxCTの安定化に寄与し、細胞内のGSH濃度を増大させることで薬剤耐性に寄与しているが、スルファサラジンはxCTの阻害により細胞内GSH濃度を低下させ、シスプラチン(CDDP)や活性酸素に対する感受性を高めることが示唆されている。一方、スルファサラジンは潰瘍性大腸炎に対して承認され、経口投与で用いられている薬剤であるが、経口投与では腸内細菌によってアゾ結合が分解を

受け、活性体となる。しかしながら、スルファサラジンはアゾ結合が切断されると、xCTに対する作用が失われてしまうことが知られている。したがって、スルファサラジンの経口投与では、かなりの部分の薬剤がxCTに対する作用を失っていることなる。この問題を解決するためには、スルファサラジンの静脈内投与が望まれるが、スルファサラジンは水に難溶であることが問題であった。

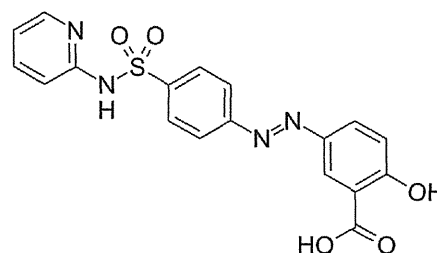


図1. スルファサラジンの化学構造

本研究では、スルファサラジンの溶解性を向上させ、静脈内投与を可能にするドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発を行っている。前年度までは、2種類の異なる高分子鎖が連結されたブロック共重合体の自己組織化によって形成されるコア-シェル型の高分子ミセルへのスルファサラジンの封入を検討し、ミセルからのスローリリースを達成することに成功したが、in vitro、in vivoのどちらの条件においても有意なスルファサラジンの薬効が確認されなかった。この理由としては、ミセルが癌

細胞に取り込まれ、細胞内でリリースされたスルファサラジンが細胞外のxCTに作用できないことが考えられる。そこで、本年度より、細胞内に取り込まれにくく、細胞外に作用する新規DDSとして、高分子-スルファサラジンコンジュゲートの開発に着手した。このコンジュゲートは細胞内への移行性が低く、細胞外のxCTに効率的に作用できるものと考えられる。このようなコンジュゲート体は、細胞外に作用する薬剤の有効性、安全性を高めるアプローチとして極めて有効であると考えられる。また、本年度は、同様な考えのもと、免疫賦活作用を有する抗悪性腫瘍剤であり、近年、C13陽性がん細胞等に対する有効性が報告されているベスタチン(J Clin Invest. 120(9) 3326-3339 (2010))の高分子コンジュゲート体の開発にも着手した。

(倫理面への配慮)

本研究成果においける動物実験に関しては、事前に動物実験計画書を提出し、東京工業大学の動物実験委員会による承認を得た上で実施した。動物実験を行うすべての者は、大学主催の動物実験教育訓練を受講し、認定を受けた上で、「動物の保護および管理に関する法律」などに従い、動物愛護の観点に十分に配慮した上で実験を行っている。

B. 研究方法

1)高分子-スルファサラジンコンジュゲートの開発

分子量が2,000と5,000の合成高分子にスルファサラジンの導入反応を行った(化学構造ならびに合成スキームは特許申請を予定しているために省略)。合成したコンジュゲート体の精製には、抽出とサイズ排除クロマトグラフィーを利用し、未反応のスルファサラジンを完全に除去した。得られた高分子-スルファサラジンコンジュゲートの活性評価は、佐谷らと連携して、癌幹細胞の細胞増殖阻止活性や細胞内グルタチオンの濃度変化により評価した。

2)高分子-ベスタチンコンジュゲートの開発

1)の高分子-スルファサラジンコンジュ

ゲートと同様に、高分子-ベスタチンコンジュゲートの合成を行った(化学構造ならびに合成スキームは特許申請を予定しているために省略)。

C. 研究結果

1)高分子-スルファサラジンコンジュゲートの開発

分子量が2,000と5,000の合成高分子にスルファサラジンの導入反応を行った(表1)。得られたコンジュゲートA、Bは、抽出とサイズ排除クロマトグラフィーによりどちらも完全に未反応のスルファサラジンを除去しているが、未反応の高分子を完全に除去することが出来なかった為、コンジュゲートAでは重量分率にして10%、コンジュゲートBでは30%ほどの未反応の高分子が混在している。これを加味して、表1にはコンジュゲート中のスルファサラジンの重量分率を算出している。コンジュゲートA、Bは共に極めて高い水溶性を有しており、スルファサラジンの水への溶解性の問題を解決することに成功した。

表1. 合成した高分子-スルファサラジンコンジュゲート

	コンジュゲート A	コンジュゲート B
分子量(Da)	2,400	5,400
スルファサラジンの重量分率(%)	15.2	5.3

次に、佐谷らと連携して、コンジュゲートA、BのCD44v陽性癌細胞に対する細胞毒性を評価した(図2)。その結果、コンジュゲートAはフリーのスルファサラジンとほぼ同等の細胞毒性を示し、コンジュゲートBも1.6倍程度の減弱は見られたものの高い細胞毒性を維持していることが確認された。また、スルファサラジンによる細胞内活性酸素量の増加に関しても、細胞毒性と同様の傾向が確認され、コンジュゲートAはスルファサラジンとほぼ同等、Bはスルファサラジンよりも多少低い活性を示した。

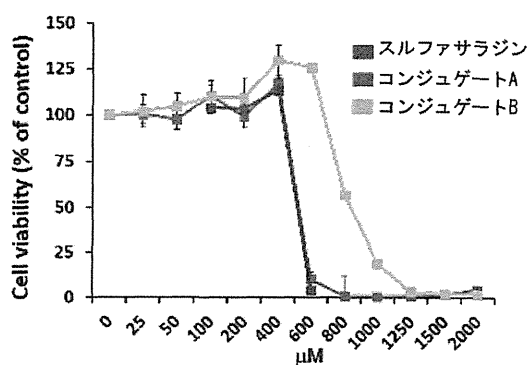


図2. CD44^v 陽性癌幹細胞に対する高分子-スルファサラジンコンジュゲートの細胞毒性

2)高分子-ベスタチンコンジュゲートの開発

1)のと同様に、ベスタチン(図3)の高分子コンジュゲート体の合成を行っている。ベスタチンは、分子構造の中にカルボキシル基と1級アミノ基を有するために、それぞれを適切な保護基で保護した後に、合成高分子に結合する反応を行っている。これまでに順調に反応が進行することが確認されており、これから精製を行う予定である。

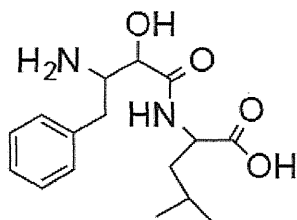


図3. ベスタチンの化学構造

D. 考察

本年度は、高分子-スルファサラジンコンジュゲートを開発し、その CD44^v 陽性癌幹細胞に対する作用を確認した。高分子ミセルの場合は、ミセルが細胞内に取り込まれた後、細胞内でスルファサラジンがリリースされる為、細胞外の xCT とは作用できないが、高分子-スルファサラジンコンジュゲートの場合は、細胞外の標的に対しても相互作用することができるものと考えられる。活性は、コンジュゲート A はスルファサラジンと同等であったが、コンジュゲート B は多少の減弱が認められた。この結果は、分子量 2,000 の高分子の結合はスルファサラジンと xCT の相互作用は妨げられないが、分子量 5,000 の高分子の結合は立

体反発効果によりスルファサラジンと xCT の相互作用が減弱されたことを反映しているものと考えられる。一方、スルファサラジンへの高分子の結合は、細胞内(特に細胞質内)への移行を妨げるものと考えられ、細胞外標的に対する特異性の向上が期待される。さらに、高分子の結合の結合によりスルファサラジンのバイオアベイラビティーの向上がもたらされ、Enhanced Permeability and Retention (EPR)効果による癌への集積性と選択性の改善が期待できる。この薬物動態(PK)の改善は、高分子の分子量が大きいほど高い効果が期待できることから、in vivo においてはコンジュゲート B の薬理活性がスルファサラジンおよびコンジュゲート B の活性を大きく上回る可能性がある。今後は、高分子-スルファサラジンコンジュゲートについて in vivo 評価も実施しながら、化学構造の最適化を進め、高分子-ベスタチンコンジュゲートの開発も進めていく予定である。

E. 結論

細胞外に標的を有する薬剤への高分子の結合は、溶解性、標的への集積性および特異性を高めるための有効なアプローチになりうる。本年度は、高分子-スルファサラジンコンジュゲートを開発し、癌幹細胞に対する作用を確認することができた。今後は、高分子-スルファサラジンコンジュゲートについて in vivo 評価も実施しながら、化学構造の最適化を進め、高分子-ベスタチンコンジュゲートの開発も進めていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) J. -Y. Ahn, Y. Miura, N. Yamada, T. Chida, X. Liu, A. Kim, R. Sato, R. Tsumura, Y. Koga, M. Yasunaga, N. Nishiyama, Y. Matsumura, H. Cabral, K. Kataoka, Antibody fragment-conjugated polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic cancer. *Biomaterials* 39 23-30 (2015)
- 2) H.-C. Yen, H. Cabral, P. Mi, K. Toh, Y. Matsumoto, X. Liu, H. Koori, A. Kim, K. Miyazaki, Y. Miura, N. Nishiyama, K.

- Kataoka, Light-induced cytosolic activation of reduction-sensitive camptothecin-loaded polymeric micelles for spatiotemporally controlled in vivo chemotherapy. *ACS Nano* 8 (11) 11591-11602 (2014)
- 3) H. -J. Kim, H. Takemoto, Y. Yi, M. Zheng, Y. Maeda, H. Chaya, K. Hayashi, P. Mi, F. Pittella, R. J. Christie, K. Toh, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. *ACS Nano* 8 (9) 8979-8991 (2014)
 - 4) H. Wu, H. Cabral, K. Toh, P. Mi, Y.-C. Chen, Y. Matsumoto, N. Yamada, X. Liu, H. Kinoh, Y. Miura, M. R. Kano, H. Nishihara, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polymeric micelles loaded with platinum anticancer drugs target preangiogenic micrometastatic niches associated with inflammation. *J. Control. Release* 189 1-10 (2014)
 - 5) H. Uchida, K. Itaka, T. Nomoto, T. Ishii, T. Suma, M. Ikegami, K. Miyata, M. Oba, N. Nishiyama, K. Kataoka, Modulated protonation of side chain aminoethylene repeats in N-substituted polyaspartamides promotes mRNA transfection. *J. Am. Chem. Soc.* 136 (35) 12396-12405 (2014)
 - 6) Y. Oe, R. J. Christie, M. Naito, S. A. Low, S. Fukushima, K. Toh, Y. Miura, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Actively-targeted polyion complex micelles stabilized by cholesterol and disulfide cross-linking for systemic delivery of siRNA to solid tumors. *Biomaterials* 35 27 7887-7895 (2014)
 - 7) S. Quader, H. Cabral, Y. Mochida, T. Ishii, X. Liu, K. Toh, H. Kinoh, Y. Miura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Selective intracellular delivery of proteasome inhibitors through pH-sensitive polymeric micelles directed to efficient antitumor therapy. *J. Control. Release* 188 67-77 (2014)
 - 8) Y. Mochida, H. Cabral, Y. Miura, F. Albertini, S. Fukushima, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Bundled assembly of helical nanostructures in polymeric micelles loaded with platinum drugs enhancing therapeutic efficiency against pancreatic tumor. *ACS Nano* 8 (7) 6724-6738 (2014)
 - 9) Y. Maeda, F. Pittella, T. Nomoto, H. Takemoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Fine-tuning of charge-conversion polymer structure for efficient endosomal escape of siRNA-loaded calcium phosphate hybrid micelles. *Macromol. Rapid Commun.* 35 13 1211-1215 (2014)
 - 10) L. Nuhn, S. Gietzen, K. Mohr, K. Fischer, K. Toh, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Kataoka, M. Schmidt, R. Zentel, Aggregation behavior of cationic nanohydrogel particles in human blood serum. *Biomacromolecules* 15 (4) 1526-1533 (2014)
 - 11) H. -J. Kim, K. Miyata, T. Nomoto, M. Zheng, A. Kim, X. Liu, H. Cabral, R. J. Christie, N. Nishiyama, K. Kataoka, siRNA delivery from triblock copolymer micelles with spatially-ordered compartments of PEG shell, siRNA-loaded intermediate layer, and hydrophobic core. *Biomaterials* 35 (15) 4548-4556 (2014)
 - 12) T. Nomoto, S. Fukushima, M. Kumagai, K. Machitani, Arnida, Y. Matsumoto, M. Oba, K. Miyata, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Three-layered polyplex micelle as a multifunctional nanocarrier platform for light-induced systemic gene transfer. *Nat. Commun.* 5 3545 (2014)
 - 13) F. Pittella, H. Cabral, Y. Maeda, P. Mi, S. Watanabe, H. Takemoto, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Systemic siRNA delivery to a spontaneous pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles. *J. Control. Release* 178 18-24 (2014)
- ## 2. 学会発表
- 1) 西山伸宏, "生体イメージングを活用したナノ DDS 設計", 3S05a 疾患克服を目指したケミカルバイオフォトニクス技術第 87 回日本生化学会大会 (2014 年 10 月 15 日-18 日), 京都国際会館, 京都 2014 年 10 月 17 日(シンポジスト)
 - 2) 西山伸宏, "高分子ミセル型ナノ医薬品の研究開発", 新製剤技術とエンジ

ニアリングを考える会 第 12 回技術
講演会, 京都国際会館, 京都 2014 年
7 月 16 日(招待講演)

- 3) N. Nishiyama, “Biological functionalities of polymeric micelle systems for targeting cancer”, The European Summit for Clinical Nanomedicine 2014 (6th CLINAM 2014) (23-25 June), Congress Center Basel, Basel, Switzerland, June 23, 2014 (Invited Lecture)
- 4) 西山伸宏, "高分子ナノテクノロジーを基盤とするナノ医薬品の開発", 第 10 回つくばがん遺伝子治療研究会, ステーションコンファレンス東京, 東京 2014 年 6 月 20 日(招待講演)
- 5) 西山伸宏, "がんの診断・治療のための高分子ミセル型 DDS の開発", 日本病院薬剤師会東北ブロック第 4 回学術大会(2014 年 5 月 31 日-6 月 1 日), 仙台国際センター, 仙台 2014 年 5 月 31 日(シンポジスト)
- 6) N. Nishiyama, “Development of supramolecular nanocarriers for cancer diagnosis and therapy”, Emerging Biomaterials 2014 (23 May), KAIST Institute, Korea, May 23, 2014 (Invited Lecture)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1.特許取得

2015 年度に、佐谷らと共に高分子-スルファサラジンコンジュゲートに関する特許を出願する予定である。さらに、森・石井らと連携して、高分子-ベスタチンコンジュゲートの開発を進め、これについても特許出願を予定している。

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のリプログラミング免疫再生療法の開発

担当責任者 中内啓光 東京大学医科学研究所 幹細胞治療分野 教授

研究要旨

我々はこれまでにiPS細胞技術を利用して抗原特異的キラーT細胞を若返らせ、大量に産生するT-iPS技術を開発した。T-iPS細胞はテロメアが伸長しており、抗原特異性とキラー活性を保持していることが*in vitro*の系で確認されたが、*in vivo*における活性については不明であった。そこで実際に*in vivo*においてT-iPS細胞が標的腫瘍に対しキラー活性機能を有しているのかを詳細に解析した。実験方法としては標的腫瘍をNOD-SCIDマウスに移植し、腫瘍のサイズや腫瘍の細胞死頻度など定量的に解析し*in vivo*における抗腫瘍キラー活性を解析した。その結果、T-iPS細胞は*in vitro*の実験同様に顕著な抗腫瘍効果を誘導することが確認された。本研究の進展によりリプログラミング技術を利用した新たな癌治療が確立されると考えられる。

A. 研究背景、目的

我々の体には様々なウイルスや細菌、寄生虫などの外敵およびがんなどから身を守る免疫細胞が存在する。その免疫細胞の中でもT細胞は主たる役割を担っている。T細胞はその表面にT細胞受容体を発現しており、これを用いて外来抗原およびがん抗原を認識する。ひとつのT細胞はある特定の抗原を認識するT細胞受容体を発現し、これによりT細胞の抗原特異性が形成されている。無限ともいえるほど多種多様な抗原を認識するため、様々なT細胞受容体を用意されており、それに比例して体内には膨大な種類のT細胞が存在している。慢性ウイルス感染症やがんの患者は異常な細胞を完全に駆逐できないため、特定のウイルスやがんの特異性をもつT細胞が何度も抗原を認識し活性化するという行動をくり返し、これらのT細胞は攻撃性や増殖性などが弱まった疲弊および老化した状態におちいつている。近年、iPS細胞（induced pluripotent stem cell、人工多能性幹細胞）の技術の開発により、体細胞をES細胞（embryonic stem cell、胚性幹細胞）とほぼ同等の能力をもつ多能性幹細胞に初期化することが可能になり、免疫拒絶の心配がなく、さまざまな疾患により機能不良あるいは機能不全を起こした細胞や臓器を置き換えてしまう再生医療の実現に大きな期待がよせられている。細胞の幼若性という側面からiPS細胞をみると、iPS細胞は受精まもない細胞と同じ性質をもつため、細胞としてはきわめて若い状態にある。

iPS細胞をつくることは、分化してしまった細胞に万能性をもたせることのみならず、このきわめて若い状態へと変化させることでもある。すなわち、iPS細胞からもういちどその由来となった細胞をつくりだすことができれば、それらは材料となった細胞からみて相対的に若い状態にあることが予想されていた。本プロジェクトで我々は、がん抗原特異的T細胞からiPS細胞（T-iPS細胞）を作製し、そのT-iPS細胞から再びT細胞を誘導した。さらに、T-iPS細胞から作製したT細胞が*in vitro*、*in vivo*の条件下においても標的であるがん細胞特異的に抗腫瘍キラー活性を示すことが確認できた。

B. 研究方法

抗原特異的T細胞の分離とT-iPS細胞の樹立

がんを発症した患者から血液を採取し、そこからHLAテトラマー法を用いてがん抗原特異的なCD8陽性T細胞を分離クローン化した。次に、センダイウイルス遺伝子導入法により分離したクローンT細胞をiPS細胞へと初期化した。樹立したiPS細胞のゲノムDNAにおけるT細胞受容体遺伝子の再構成を解析した。

T-iPS細胞からCD8陽性T細胞の細分化方法

T-iPS細胞はC3H10T1/2支持細胞との共培養によりCD34陽性の造血幹前駆細胞に分化誘導することにより、T細胞系統へと分化誘導することが可能である。この方法で

は CD4 陽性 CD8 陽性の段階までの細胞は得られるものの、TCR はもとの TCR を保てないことが確認された。そこで、T-iPS 細胞から分化させた T 細胞に目的の抗原を暴露させることにより、もとの TCR を保持したまま T-iPS 細胞から目的の抗原を認識する TCR 陽性 T 細胞(rejuvenated)へと分化させた。

In vitro における T-iPS 細胞由来 T 細胞のキラー活性評価

我々は樹立した reT 細胞の腫瘍キラー活性を解析するために標的腫瘍細胞と reT 細胞を共培養して細胞障害性法により評価した。また、その際 reT 細胞が発現する活性化マーカーやサイトカンも解析した。

In vivo における T-iPS 細胞由来 T 細胞のキラー活性評価

さらに我々は樹立した reT 細胞の in vivo における腫瘍キラー活性を解析するために標的腫瘍細胞を免疫不全マウスの皮下に移植し腫瘍を形成させた。その後、腫瘍を形成させたマウスに reT 細胞を投与し腫瘍大きさなどを in vivo イメージング装置を用いて解析を行った。

倫理面への配慮

本研究に用いた検体は東京大学医科学研究所の規定により、患者の同意を得るためのインフォームドコンセントや倫理審査を経て行った研究である。

C. 研究結果

本研究によって3つの成果が挙げられる。

1) 標的癌細胞特異的 TCR を有する T 細胞を患者から分離し、リプログラミング技術により T-iPS 細胞に誘導可能にしたことである。この技術により様々な TCR を持つ T 細胞をリプログラミングすることが用意にできるということを実験的に証明した。

2) 作製した T-iPS 細胞から目的の TCR を維持した状態で再び T 細胞へ分化誘導した。

T-iPS 細胞は無限の増殖力を保持しているために生体内から分取できる T 細胞よりも多く標的細胞特異的な T 細胞を in vitro で作製可能になった。

3) 我々が T-iPS 細胞から誘導したがん細胞特異的 reT 細胞は共培養実験において標

的がん細胞を速やかに細胞死に誘導できることが確認された。さらに、T 細胞活性化マーカーやサイトカインなどの発現も確認された。

また、免疫不全マウスに腫瘍を作製し reT 細胞を投与(治療群)することで腫瘍の大きさは小さくなり長期にわたるマウスの生存が確認されたが、未治療群においては腫瘍が大きくなりマウスが死に至った。

D. 考察

我々は T-iPS 細胞から reT 細胞を誘導し、reT 細胞のがん抑制効果を実験的に証明した。

議論として、この reT 細胞が生体内に存在する T 細胞を同様かどうかという問題が挙げられる。細胞表面マーカーの強度や遺伝子発現パターン解析からほぼ同一なパターンを示すものからそうではない遺伝子発現パターンが示されることから、我々は作製した reT 細胞は生体内に存在する T 細胞とはすこし異なる細胞であると考えられる。その理由としては分化誘導系が生体内か否可ということが大きい理由として挙げられる。しかし、標的細胞に対する reT 細胞の細胞障害活性は生体内の T 細胞と同等の機能を有する。本研究では生体内の T 細胞に酷似した細胞を誘導するのではなく、リプログラミング技術で作製された新たな細胞障害性細胞を作製することに意味があるのではないかと考えている。

E. 結論

本研究により、リプログラミング技術により大量に抗腫瘍細胞傷害性 T 細胞作出できることが証明された。T-iPS 細胞から誘導された細胞傷害性 T 細胞が患者の体内において機能するのか、さらには、よりよい機能を発揮するのかどうかは、これからの研究が鍵となっている。この手法はがん細胞に対する次世代の治療法であると期待できる。また、reT 細胞は自家移植のみならず HLA の適合する別の患者にも注入することが可能であると考えられるため、さまざまな疾患に対する抗原特異的な T-iPS 細胞バンクによる、すばやい免疫療法も実現するものと期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

中内啓光（研究分担者）

【2014】

1) Nakauchi Y, Yamazaki S, Napier C S, Usui J, Ota Y, Takahashi S, Watanabe N, Nakauchi H. (*Correspondence author) Effective treatment against severe Graft-versus-Host Disease with allele-specific anti-HLA monoclonal antibody in a humanized-mouse model. *Exp Hematol*. 2014 Oct 30

2) Ito T, Sendai Y, Yamazaki S, Seki-Soma M, Hirose K, Watanabe M, Fukawa K, Nakauchi H. Generation of recombination activating gene-1 deficient neonatal piglets: a model of T and B cell deficient severe combined immune deficiency. *Plos One* 2014 dec 1

3) Sakurai M, Kunimoto H, Watanabe N, Fukuchi Y, Yuasa S, Yamazaki S, Nishimura T, Sadahira K, Fukuda K, Okano H, Nakauchi H, Morita Y, Matsumura I, Kudo K, Ito E, Ebihara Y, Tsuji K, Harada Y, Harada H, Okamoto S, Nakajima H. Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1 mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. *Leukemia*. 2014 Apr 15.

4) Hirose S, Takayama N, Nakamura S, Nagasawa K, Ochi K, Hirata S, Yamazaki S, Yamaguchi T, Otsu M, Sano S, Takahashi N, Sawaguchi A, Ito M, Kato T, Nakauchi H, Eto K. Immortalization of erythroblast by c-Myc and Bcl-xl enables large-scale erythrocyte production from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2013 Dec 5

5) Kazuki Y, Yakura Y, Abe S, Osaki M, Kajitani N, Kazuki K, Takehara S, Honma K, Suemori H, Yamazaki S, Sakuma T, Toki T, Shimisu R, Nakauchi H, Yamamoto T, Oshimura M. Down syndrome-associated haematopoiesis abnormalities created by chromosome transfer and genome editing technologies. *Sci Rep*. 2014 Aug 27

2. 学会発表

特になし。

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。

難治性消化器癌幹細胞の CD44v 経路等を標的とした治療戦略の開発

担当責任者 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

癌幹細胞マーカーCD44分子は、そのスプライスバリエントフォーム（CD44v8-10）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ことで細胞の生存や治療抵抗性に寄与することが見出されている。私たちは xCT 阻害剤スルファサラジンが CD44v8-10 発現細胞の酸化ストレスを上昇させることで、特異的に細胞死を誘導し、抗がん剤の効果を高めることができることを見出した。本年度の研究ではスルファサラジンによる抗癌幹細胞効果をより高めるための様々なアプローチを行い、有効な誘導体を見出した。

A. 研究背景、目的

本研究グループはこれまで、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 (CD44v8-10) が、細胞膜表面のシスチントランスポーターxCTと結合し、その発現を安定化させることによって、細胞内へのシスチンの取り込みを増大させる作用があることを見出した (Ishimoto et al., *Cancer Cell* 2011)。シスチンは細胞内でシステインに転換され、還元型グルタチオン (GSH) の原料として使用される。GSH は強力な抗酸化作用を持つことから、CD44v8-10 を発現する細胞は酸化ストレスに対して耐性が高く、治療に対して抵抗性を発揮する。

潰瘍性大腸炎及び関節リウマチの治療薬として長年用いられてきたスルファサラジンという化合物は、xCT シスチントランスポーターを特異的に阻害する作用があることが報告されている (図1)。胃がんモデルマウスにスルファサラジンの投与を行い、その腫瘍形成抑制効果を検討したところ、生後 10 週からスルファサラジン単剤を投与することで、有意にその腫瘍形成を抑制することができた (Wada et al., *Cancer Sci* 2013)。また、ヒトの口腔内がん細胞をヌードマウス皮下に移植したモデルでは、スルファサラジンの投与によって、CD44v を高発現しているがん細胞特異

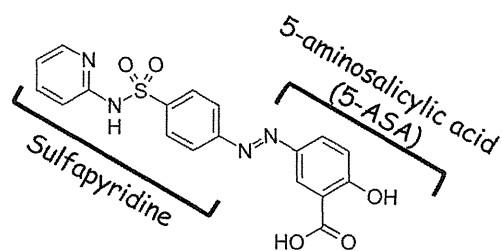


図1 スルファサラジンの構造式

スルファピリジンと 5-ASA がアゾ結合でつながったプロドラッグであり、腸内細菌によってアゾ結合が切断されることで、それぞれ抗菌剤および抗炎症剤として効果が発揮される。xCT にはこの結合したままの化合物で阻害効果をもつ。

的に細胞死が誘導されることが分かり、逆に CD44v を発現していない細胞 (インボルクリン陽性細胞) にはほとんど効果がないことが分かった (Yoshikawa et al., *Cancer Res* 2013)。これらの所見から、細胞内の活性酸素レベルの制御が xCT シスチントランスポーターに依存している CD44v 高発現がん幹細胞に対して、スルファサラジンが有効であることが明らかになった。

これらの結果に基づき、CD44v や xCT シスチントランスポーターを標的とした治療は、癌幹細胞に対する新たな治療となりうると考えた。そこで、ヒト進行性胃がんに対する医師主導型第一相臨床試験を、国立がん研究センター東病院を中心とし、4 つの医療施設が連携する体制で実施した。その結果、スルファサラジン投与後の組織で CD44v 発現の低下と GSH 量の低下がみられた症例があり、概念の証明 (POC) を

取得することができた。

しかしスルファサラジンは xCT 阻害剤としての効率は必ずしも良好ではない。経口投与ではアゾ結合が切断されるため、xCT 阻害効果をもつ非切断型のスルファサラジンは投与量の 30%以下である。そのうえ、十分な阻害活性を得るためには投与量を上げなければならない。そこで、今年度はより効率のよい新たな xCT 阻害剤を開発することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

①スルファサラジン誘導体の合成と活性検討

7 種類のスルファサラジン誘導体を合成し、それらの xCT 阻害作用を検討した。

②水溶性スルファサラジンの活性検討

本研究班分担研究者である西山伸宏博士によって合成されたポリエチレングリコール結合型スルファサラジンを用いて xCT 阻害作用を検討した。

(倫理面への配慮)

本年度の研究は全て培養細胞を用いて行った実験であり、臨床サンプルを用いた解析、実験動物を用いた解析は行っていないが、次年度以降それらを実施する予定であり、既に「実験動物使用を含む研究計画」「ヒトゲノム・遺伝子解析研究を含む研究計画」「遺伝子組換え実験を含む研究計画」の申請を行い、承認を得ている。

C. 研究結果

①スルファサラジン誘導体の合成と活性検討

アゾ結合部分を変更して切断できないように変更したものを含む 7 種の誘導体を合成し、それらの xCT 阻害活性について CD44v8-10 発現細胞を用いて検討した。その結果、アゾ結合を変更し切断できないようにした 2 種の誘導体はスルファサラジンそのものよりも阻害活性が低くなった。しかし 2 種の化合物についてはスルファサラジン同等の活性があり、それらの *in vivo* における効果、薬物動態を今後検討する予定である。またアゾ結合に近い部分に側鎖を入れても活性が落ちなかったことから、

この部分に変更を加えることで、アゾ結合切断を低下させることができる可能性があり、更に誘導体の合成を続けて最適化を行う。

②水溶性スルファサラジンの活性検討

ポリエチレングリコール結合型スルファサラジンはスルファサラジンの問題点である不溶性を解消でき、水溶性が高い物質となることが確認できた。また *in vitro* においてスルファサラジン同等の xCT 阻害作用があることが確認できた。

D. 考察

スルファサラジンは xCT 機能を阻害することで GSH 産生を抑制し、酸化ストレスを上昇させることで xCT 依存性の癌細胞を駆逐することができる。最近の解析結果では、xCT 依存性の癌細胞は、活性酸素の産生量も高いため、xCT を阻害することで酸化ストレスレベルが急激に上昇することが分かっており、それが結果的に CD44v8-10 発現癌幹細胞を抑制する機能となっている。

新たに合成を行ったスルファサラジンの誘導体の xCT 阻害作用をチェックする方法としては、①GSH 量、②活性酸素量 (DCF-DA により測定) に加えて、③培養上清中のグルタミン酸量 (xCT はシスチンを取り込むのと交換にグルタミン酸を放出するため、グルタミン酸量を測定することで xCT の機能を定量化できる (図 2)) の測定を行った。その結果、アゾ結合を変

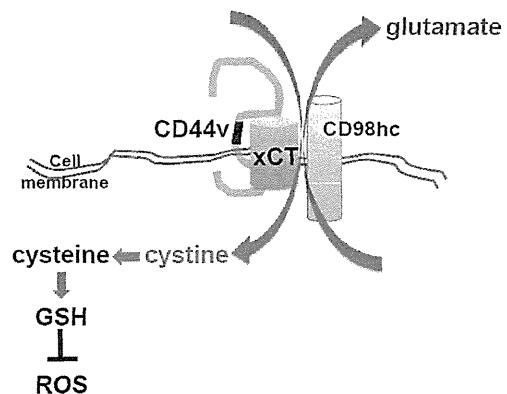


図2 CD44v8-10 と xCT の相互作用による抗酸化機構
まの化合物で阻害効果をもつ。

換した誘導体は xCT 阻害活性が極めて低く、アゾ結合付近の構造が、xCT 阻害に重要であることが明らかになった。しかし、アゾ結合部に近接した部分に側鎖を加えても xCT 阻害活性が得られ、この部分の側鎖はアゾ結合を切断する酵素の分子内への侵入を抑制する可能性があるため、実際に in vivo では従来のスルファサラジンより低濃度で作用する可能性がある。今後、これら7種類の誘導体によって得られた結果に基づいて、より適正な xCT 阻害剤の開発を行う。

スルファサラジンは腸内細菌の作用によってスルファピリジンと 5-ASA に分かかれ、xCT 阻害作用を失うため、xCT 阻害剤としては、注射薬にしたほうが効果が高いと想像される。しかし水溶性が低いため注射薬として用いることは難しい。その欠点を補う目的でポリエチレングリコールをスルファサラジンに結合することにより、その水溶性を飛躍的に高めることに成功した。PEG-スルファサラジンは in vitro の解析において原薬のスルファサラジンとほぼ同等の xCT 阻害効果を示し、今後動物実験によってその抗腫瘍効果と副作用について検討を行う。

E. 結論

スルファサラジンを合成展開することにより、より溶解性が高く、低濃度で作用する xCT 阻害剤の候補を見出すことができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishimoto T, Sugihara H, Watanabe M, Sawayama H, Iwatsuki M, Baba Y, Okabe H, Hidaka K, Yokoyama N, Miyake K, Yoshikawa M, Nagano O, Komohara Y, Takeya M, Saya H and Baba H: Macrophage-derived reactive oxygen species suppress miR-328 targeting CD44 in cancer cells and promote redox adaptation. *Carcinogenesis* 35: 1003-1011, 2014
- 2) Mikami S, Mizuno R, Kosaka T, Saya H, Oya M and Okada Y: Expression of TNF- α and CD44 is implicated in poor prognosis, cancer cell invasion, metastasis and resistance to the sunitinib

treatment in clear cell renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 136: 1504-1514, 2015

- 3) Ohmura M, Hishiki T, Yamamoto T, Nakanishi T, Kubo A, Tsuchihashi K, Tamada M, Toue S, Kabe Y, Saya H and Suematsu M: Impacts of CD44 knockdown in cancer cells on tumor and host metabolic systems revealed by quantitative imaging mass spectrometry. *Nitric Oxide* pii: S1089-8603(14)00495-9, 2014

2. 学会発表

- 1) 佐谷秀行: がん幹細胞を標的とした治療戦略。基調講演 1。第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会。06/25/2014、ホテルメトロポリタン仙台、仙台
- 2) Saya H: Redox regulation in cancer stem cells. JSH-JCA Joint Symposium “Metabolomics and therapeutic strategy in myeloid and other tumors” The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. 11/02/2014, Osaka International Convention Center, Osaka

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

xCT 阻害作用を持つスルファサラジン誘導体については特許出願を行う予定である。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

癌幹細胞のリプログラミング (CD44v 等) 経路を標的とした

microRNA 制御とエクソソーム DDS による治療応用

担当責任者 落谷孝広 国立がん研究センター研究所・分子細胞治療研究分野 分野長

研究要旨

乳がん細胞においてノンコーディング RNA の 1 つである microRNA-27b (miR-27b) の発現低下あるいは欠失によりドセタキセル耐性が誘導されることをこれまでに明らかにしている。本研究では、ルミナルタイプのヒト乳がん細胞株 2 種類 (MCF7 と ZR75-1 細胞) を用いて、miR-27b の発現低下によるドセタキセル耐性化の機序を検討した。その結果、miR-27b の発現低下により薬剤排出能が著しく亢進している side-population が形成され、ドセタキセル耐性が誘導されることを明らかにした。また、side-population が高い造腫瘍性を示す細胞集団であることが報告されていることから、miR-27b を過剰発現あるいは抑制した MCF7 細胞を用いて動物実験を行い、造腫瘍性を評価した。動物実験の結果から、miR-27b の発現低下に伴い腫瘍形成能が著しく亢進することが明らかとなった。

A. 研究背景、目的

近年、さまざまなヒト原発がんよりがん幹細胞を同定し解析する試みが国内国外を問わず多く行われ、そのような細胞集団が高い造腫瘍性と薬剤耐性を示すことが明らかにされている。乳がんにおいては、2003年にCD44⁺/CD24^{low/-}の細胞集団ががん幹細胞として報告された (Al-Hajj M et al., PNAS, 2003)。また、非がん幹細胞画分であるCD44⁺/CD24⁺からのCD44⁺/CD24^{low/-}画分の形成が上皮間葉移行 (EMT: Epithelial to Mesenchymal Transition) により誘導されることも報告された (Mani SA et al., Cell 2008)。一方で、現在に至るまで、乳がん幹細胞において抗がん剤耐性が獲得されるメカニズムを詳細に解析した報告はほとんどされていない。この1つの要因として薬剤耐性株の樹立が容易ではないことが挙げられる。これまでに、当研究室では、わずか1つのmicroRNA(miR-27b)の発現を抑制させるだけでドセタキセル耐性株を樹立できることを複数の乳がん細胞株で見出し、これらの細胞株を用いた解析を行うことで、これまで解析が困難であった抗がん剤耐性が誘導される機序やがん幹細胞画分が形成される機構を明らかにできると考えられる。また、本研究は上記のような生物学的特性を理解するのに有用だけでなく、抗がん剤に対する感受性予測さらにその治療効果の改善といった新たな診断・治療方法の開発にも応用でき

る点で非常に有用であると考えられる。

B. 研究方法

本研究では、miR-27b の発現を抑制または亢進させたヒト乳がん細胞株を用いて「ドセタキセル耐性の獲得機構」と「ヒト乳がん幹細胞画分の形成機構」の解明を目的として、以下の 2 項目の解析を行った。① miR-27b の発現を抑制あるいは過剰発現させた細胞株を用いてドセタキセル耐性を示す細胞集団の同定を行った。② 実験方法①の細胞株を用いて、ドセタキセル耐性を示した細胞集団の造腫瘍性を評価するために、免疫不全マウス (NOD/SCID マウス) を用いた動物実験を行った。

(倫理面への配慮)

miRNA、mRNA の発現解析においては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、書面での同意を得て試料提供を受け、試料を匿名化することで、試料提供者のプライバシーを保護する。また、本研究は国立がんセンター遺伝子解析研究倫理審査委員会・倫理審査委員会において審査を受け、すでに承認を得ている。

C. 研究結果

①「ドセタキセル耐性を獲得する機序の解明」について: 薬剤感受性で造腫瘍性が低く、さらには miR-27b の発現が正常乳腺組織とほぼ同程度である MCF7 細胞株を用いて解析を行った。その結果、薬剤排出能

が亢進した細胞集団である side-population の形成が促進されることでドセタキセル耐性が誘導されることを明らかにした。同様の結果は ZR75-1 細胞でも確認された。

②「ヒト乳がん幹細胞画分の形成機構の解明」について：研究結果①で確認された side-population はがん幹細胞画分で検出されることが多数報告されているため、miR-27b を過剰発現あるいは抑制した MCF7 細胞の造腫瘍性を動物実験において検討した。その結果、miR-27b の発現低下に伴い造腫瘍性が亢進することが観察された。

D. 考察

本研究では、乳がん細胞株において miR-27b の発現低下に伴い side-population が形成され、その結果、ドセタキセル耐性だけでなく造腫瘍性の亢進も誘導されることが明らかとなった。上記の結果は、miR-27b の発現低下によりがん幹細胞集団が形成されことを示唆している。また、miR-27b の発現を制御することが、難治性乳がんに対する新規治療法の開発にもつながると考えられる。

E. 結論

本研究では乳がん細胞株を用いた解析から、miR-27b の発現低下によりドセタキセル耐性が誘導されることが示された。また、その機序として miR-27b の発現低下により side-population の形成が誘導されることを明らかにした。今後は miR-27b の標的分子を同定するとともに、miR-27b のデリバリーシステムを動物モデルにより検討し、その最適化を行う。また、他のがん種においても同様の解析を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表 (10 報)

1. Chen AK, Sengupta P, Waki K, Van Engelenburg SB, Ochiya T, Ablan SD, Freed EO, Lippincott-Schwartz J. MicroRNA binding to the HIV-1 Gag protein inhibits Gag assembly and virus production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111:E2676-E2683, 2014
2. Fujita Y, Kuwano K, Ochiya T. Challenges and strategies for pulmonary

delivery of microRNA-based therapeutics. In: Babashah S (ed), *MicroRNAs: Key Regulators of Oncogenesis*. Switzerland, Springer, pp 413-428, 2014

3. Fujiwara T, Katsuda T, Hagiwara K, Kosaka N, Yoshioka Y, Takahashi RU, Takeshita F, Kubota D, Kondo T, Ichikawa H, Yoshida A, Kobayashi E, Kawai Akira, Ozaki T, Ochiya T. Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells. *Stem Cells*, 32:959-973, 2014
4. Fujiwara T, Kawai A, Nezu Y, Fujita Y, Kosaka N, Ozaki T, Ochiya T. Circulating microRNAs in sarcoma: potential biomarkers for diagnosis and targets for therapy. *Chemotherapy*, 3:1000123, 2014
5. Fujiwara T, Takahashi RU, Kosaka N, Nezu Y, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. *RPN2* gene confers osteosarcoma cell malignant phenotypes and determines clinical prognosis. *Mol Ther Nucleic Acids*, 3:e189, 2014
6. Katsuda T, Ikeda S, Yoshioka Y, Kosaka N, Kawamata M, Ochiya T. Physiological and pathological relevance of secretory microRNAs and a perspective on their clinical application. *Biol Chem*, 395:365-373, 2014
7. Ono M, Kosaka N, Tominaga N, Yoshioka Y, Takeshita F, Takahashi RU, Yoshida M, Tsuda H, Tamura K, Ochiya T. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci Signal*, 7:ra63, 2014
8. Osaki M, Kosaka N, Okada F, Ochiya T. Circulating microRNAs in drug safety assessment for hepatic and cardiovascular toxicity: the latest biomarker frontier? *Mol Diagn Ther*, 18:121-126, 2014
9. Takahashi RU, Miyazaki H, Ochiya T. The role of microRNAs in the regulation of cancer stem cells. *Front Genet*, 4:1-11, 2014
10. Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Nonaka R, Yamamoto H, Ishii H, Mori M,

Furuta K, Nakajima T, Hayashi H, Sugisaki H, Higashimoto H, Kato T, Takeshita F, Ochiya T. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. Nat Commun, 5:3591, 2014

2. 学会発表 (3 演題)

1. Ryou-u Takahashi, Hiroaki Miyazaki, Takahiro Ochiya: “Identification of microRNA-27b as a master regulator generating breast cancer stem cells” EMBL, 2014年5月8日, ドイツ
2. 高橋陵宇, 宮崎裕明, 竹下文隆, 小野麻紀子, 田村研治, 落谷孝広: 乳がんにおける幹細胞形質を制御する因子の同定とその機能解析, 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日、横浜
3. Ryou-u Takahashi, Hiroaki Miyazaki, Takahiro Ochiya: “Loss of MicroRNA-27b-mediated Gene Repression Promotes Generation of Breast Cancer Stem Cells” 19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine, 2014年10月10日, ギリシャ

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 (1 件)
国際特許出願中 (A0005-1038-PCT-1)
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

細胞初期化技術を用いたリプログラミング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

担当責任者 山田泰広 京都大学 iPS 細胞研究所 教授

研究要旨

細胞初期化技術が癌治療に応用可能かを検討するために、不完全な細胞初期化による Wilms 腫瘍マウスモデルに発生する腎臓腫瘍細胞の初期化を試みた。薬剤（ドキシサイクリン）誘導性に初期化 4 因子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) を発現させることで、生体内で iPS 細胞を作製するシステムを用いた。体細胞に不完全な細胞初期化を誘導し、腎臓腫瘍を誘導した。不完全な細胞初期化により発生する腎臓腫瘍細胞を分離し、再度初期化因子を誘導することで、腫瘍細胞の完全初期化を試みた。その結果、腎臓腫瘍細胞から、高効率、短期間で iPS 細胞が樹立可能であった。腎臓腫瘍細胞由来 iPS 細胞で作製したキメラマウスでは、腎臓腫瘍細胞由来細胞が非腫瘍性の腎臓に寄与していることが確認された。特定の癌細胞では細胞初期化技術により癌細胞の運命を制御することが示された。現在、この知見を難治性癌に応用可能かを検証する目的に、変異型 *K-ras* 遺伝子を用いた膵癌、肺癌モデルの作製を試みている。

A. 研究背景、目的

体細胞に4つの転写因子、*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *Myc*を強制発現させることで、体内のあらゆる細胞に分化しうる人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPS細胞)の作製が可能となった。この事実は、iPS細胞作製技術により、体細胞の運命を制御しうることを示唆している。本研究では、iPS細胞作製技術を癌細胞に応用し、癌細胞の性質を変化させることで、癌治療への応用を試み、革新的な癌治療法の開発を目指そうとするものである。特に、iPS細胞作製技術を用いた癌幹細胞の運命転換に着目し、効率的な癌幹細胞の運命転換方法を開発することで、癌治療への応用の可能性を検討する。

我々は、マウス体細胞に不完全な初期化を誘導することで、小児芽腫に類似した癌が発生することを見いだした。腎臓に発生した癌は小児腎臓癌の代表であるWilms腫瘍に類似していた。本発癌モデルにおいては、DNAメチル化を含むエピジェネティック修飾状態が大きく変化していることが明らかとなった。本研究では、この発癌モデルを用いて、癌細胞が細胞初期化技術により如何にその運命を変えうるかを検討した。

iPS細胞作製技術を用いた癌治療の効果をも個体レベルで適切に評価するためには動物モデルの開発が必要である。特に、膵臓癌、肺癌の動物モデル作製は、がん幹細胞

の特性を標的とした難治性がんの革新的な治療法の評価に有用であると考えられる。本研究では、肺癌、膵臓癌を標的とした癌幹細胞動物モデルの作製を試みる。

B. 研究方法

1. 不完全な細胞初期化による Wilms 腫瘍マウスモデルの腎臓腫瘍細胞の初期化を試みた。遺伝子改変を施した ES 細胞を用いてキメラマウスを作製し、薬剤（ドキシサイクリン）誘導性に初期化 4 因子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) を発現させ、生体内で iPS 細胞を作製するシステムを用いた。はじめに不完全な細胞初期化により発生する腎臓腫瘍細胞のマーカーをマイクロアレイにて同定し、マーカー発現を指標に腎臓腫瘍細胞を分離した。腎臓腫瘍細胞に再度初期化因子を誘導し、完全初期化 (iPS 細胞の樹立) を目指した。腎臓腫瘍細胞から樹立した iPS 細胞の分化能、造腫瘍能をキメラマウス作製により検討した。

2. 難治性がん動物モデル作製のために、マウス ES 細胞において癌遺伝子、癌抑制遺伝子の遺伝子改変を行った。変異型 *K-ras* の発現レベルを制御可能な ES 細胞の作製を試みた。Tet-ON システムを用いて、ドキシサイクリンにより変異型の *K-ras* 発現を制御するために、*Rosa* 遺伝子座に *rtTA* を持つ ES 細胞の *Coll1a1* 遺伝子座に tetOP-変異型 *K-ras* 遺伝子をノックインした。遺伝子座により外来遺伝子の誘導量、細胞種

が異なることが知られるため、*Rosa* 遺伝子座にも tetOP-変異型 *K-ras* 遺伝子のノックインを試みた。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、動物実験実施機関（京都大学 iPS 細胞研究所）の動物実験委員会の承認を得た。動物愛護の精神に配慮し、3R に努めて実験を施行した。

C. 研究結果

1. 生体内で体細胞が初期化できるマウスに不完全な細胞初期を誘導すると、複数の上皮性組織において、奇形腫ではなく、明らかな周囲組織浸潤性を示す、がんと解釈可能な異型細胞の増殖が観察された。このうち、腎臓で認められる腫瘍は、ヒトの Wilms 腫瘍に組織形態、遺伝子発現プロファイルが類似していた。腎臓腫瘍において胎生期に腎臓組織に発現する *Lgr5* が発現していることが明らかとなった。*Lgr5* レポーター遺伝子を用いて *Lgr5* 陽性腎臓腫瘍細胞を FACS にて回収後、再度初期化因子を誘導することで iPS 細胞が樹立可能であった。iPS 細胞は高効率、短時間で樹立可能であった。腎臓腫瘍細胞由来 iPS 細胞で作製したキメラマウスでは、非腫瘍性の腎臓に寄与していることが確認された。いずれのキメラマウスにも腎臓腫瘍の形成は確認されなかった。

2. ドキシサイクリンにより変異型の *K-ras* を誘導可能なマウス ES 細胞を樹立した。実際に試験管内においてドキシサイクリンを添加させることで、変異型 *K-ras* 遺伝子が誘導可能であることを確認した。

D. 考察

不完全な細胞初期化による Wilms 腫瘍に類似した腎臓腫瘍細胞は完全初期化により非腫瘍性の腎臓細胞へと分化可能であることが明らかとなった。ヒト Wilms 腫瘍において特定の遺伝子異常が同定されない症例が存在することを踏まえると、これらの結果は、一部のがんは、遺伝子異常およびその蓄積ではなく、主にエピゲノムの変化によって生じ得る可能性を示唆していると考えられる。さらに、特定の癌では、細胞初期化技術により癌細胞の運命制御が可能であることが示唆された。

E. 結論

特定の癌細胞は、細胞初期化技術により、運命制御が可能であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, Okita K, Osafune K, Arioka Y, Maeda T, Soejima H, Moriwaki H, Yamanaka S, Woltjen K, **Yamada Y***. Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell*. 2014 156(4):663-77.
- 2) Yamada Y, Haga H, **Yamada Y***. Concise Review: Dedifferentiation Meets Cancer Development: Proof of Concept for Epigenetic Cancer. *Stem Cells Transl Med*. 2014 Oct;3(10):1182-7.
- 3) Matsuda Y, Semi K, **Yamada Y***. Application of iPS cell technology to cancer epigenome study: Uncovering the mechanism of cell status conversion for drug resistance in tumor. *Pathol Int*. 2014 Jul;64(7):299-308.
- 4) Ohnishi K, Semi K, **Yamada Y***. Epigenetic regulation leading to induced pluripotency drives cancer development in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Dec 5;455(1-2):10-15.

2. 学会発表

- 1) **Yamada Y**. Nature Conference, Nuclear Reprogramming and the Cancer Genome 2014, Guangzhou, China, October 31-November 2, 2014
- 2) **Yamada Y**. ADVANCES IN NEUROBLASTOMA RESEARCH, Colonge, Germany, May 13-16, 2014
- 3) **Yamada Y**. 8th International Cell Therapy Conference, Seoul, Korea, October 23, 2014.

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。

難治性消化器癌幹細胞のリプログラミング(代謝・エピゲノム)に関わる経路を
標的とした安全で有効な新規治療法の開発と臨床応用

担当責任者 石井秀始 大阪大学大学院医学系研究科 特任教授

研究要旨

森総括班の方針に従い、癌細胞の性質を大きく変化させるリプログラミング（RP）方法の医療応用の実現に向けて基盤構築を行った。マイクロ RNA の顆粒に対する機能メカニズム解析を実施した。最近注目されているマイクロ RNA による RP 誘導の基盤を構築しメカニズム解析した。その結果、新たに癌幹細胞の根絶を目指す代謝特性を利用した metabolic RP が方法論として構築され、特に、癌幹細胞分子の下流に於ける非コード RNA の一亜型であるマイクロ RNA によるリプログラミングの分子基盤が明らかにされ、さらに、細胞内代謝産物のメタボローム解析を詳細に進めることにより網羅的かつ機能的なデータベースを構築、運用し、安全で効率的なリプログラミング技術の新構築に向けて、創薬シーズ開発まで展開し、代表的な癌幹細胞標的分子に特徴付けられる難治性消化器癌の革新的な治療に向けて大きく進展した。

A. 研究背景、目的

平成 26 年度からの 3 年間の初年度として、森総括班の方針に従い速攻性のある創薬の出口戦略を見据えながらトランスレーショナル研究の具現化にむけて事業を展開した。

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ことができる。本研究ではマイクロ RNA を基軸とした RP 誘導の基盤を応用可能なレベルにまで掘り下げて解明しシーズを最適化した。

B. 研究方法

非コード RNA の一亜型であるマイクロ RNA によるリプログラミングの基本技術として 3 つのマイクロ RNA(miR-302,miR-200c,miR-369)を創薬シーズとして開発したのでその最適化を進めた。架橋型核酸の合成技術を用いて、ガイド鎖及びパッセンジャー鎖を人工合成し HTC を実施した。

（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した。

●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実施した。

●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実施した。

●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った。

●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った。

●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った。

C. 研究結果

繰り返したスクリーニングの結果マイクロRNAの機能を左右する化学修飾を明らかにし知財を整備した。アッセイ系としてルシフェラーゼ、スフェア形成法、小動物実験等により選択されたシーズのPOCを取得した。またマイクロRNAの分子構造を数理的的手法により予測し機能を合理的説明する方法論の確立に向けて着手した。このように基礎研究から全臨床試験を経て医師主導治験を目指す方向で一貫性のある研究を進めるために班内での協力を密にして、癌を標的とした核酸医薬品やDDS搭載する技術の融合など基盤となる事業を展開した。複数の大学にわたる知財として整備を進めている。

D. 考察

将来の臨床応用を見据えて核酸医薬品は特に注目されている。配列情報や化学修飾等機能性核酸の整備を通じて強い知財を構

築できる可能性を秘めている。本研究では、癌幹細胞の RP による革新的な医薬品の創出に向けて基盤整備を進めるとともに事業の加速化に向けて道筋を構築することができた。癌細胞をリプログラム化するとどのようになるかは学問的には研究の余地が残されている。実験として山中因子を消化器癌細胞に導入すると、遺伝子発現では iPS 細胞に類似した変化が得られ、分化誘導剤と化学療法剤への感受性が亢進し、造腫瘍性が減弱した（森ら、Proc Natl Acad Sci USA 2010）。この現象には癌抑制遺伝子 p16INK4A のプロモーターの脱メチル化が関わっていることが示され、エピジェネティック制御の重要性が示唆される（森・山田ら）。前項の成熟型マイクロ RNA を消化器癌細胞に導入すると、抗癌剤への感受性が増感され、免疫不全マウスに移植した腫瘍の抑制が観察された（本申請の準備段階；森ら）。この現象が複数の癌に共通して観察されることか、または個々の癌によって相違しているが内因性のマイクロ RNA 発現等を事前に計測することで予測可能であるのか、検討している。前年度に引き続き私達を含む内外の研究により、癌幹細胞の性質を大きく変革できる技術開発の道が拓けた。現在可能な細胞リプログラミング（RP）方法には『3種類』が注目されている。第一は転写因子による epigenetic RP 誘導（京都大学山中先生 iPS 細胞／我々はこれを癌に応用した[PNAS 107(1), 40-45, 2010]）。第二はマイクロ RNA による RP 誘導（我々 [Cell Stem Cell, 8,376,2011]、および米国 Morrissey 博士[Cell Stem Cell, 8,633,2011] の mi-iPS 細胞）。第三は、癌幹細胞の根絶を目指す代謝特性を利用した metabolic RP で

あり、本申請で研究開発を進めている。三番目の metabolic RP に関しては、現在注目されている pathway は、嫌気性解糖系とアミノ酸合成系（特にグリシン）であり、『癌細胞では正常酸素分圧にも関わらず嫌気性解糖系が優位に働き、低いエネルギー産生効率の中で多量のバイオマスを生成している（Warburg 効果）』が知られている。鍵を握る酵素として、pyruvate kinase(PKM2), glycine decarboxylase(GLDC), Isocitrate dehydroxylase(IDH), phosphoglycerate dehydroxylase(PHGDH) の4つが知られているが、Bioinformatics から10個前後が Driver Enzymes とされる（Cell,148,1-14,2012）。本申請でこれらを同定し創薬シーズに上げる。本研究で明らかにできた核酸シーズを用いて難治性消化器癌のリプログラミングを作用点とした革新的医療の創出にむけて基盤を構築できた。特に局所の難治性消化器癌の悪性癌幹細胞に特異的に関与する核酸シーズの開発とそのシーズを最適化された DDS に搭載し表面ミセルの癌幹細胞特異性に基づいた策剤到達システムは未来型医療として大きな力を発揮することが強く期待される。以上のように難治性の高い転移性大腸癌及び膵癌を標的とした革新的な新医療技術の創出に向けて、代謝産物を基盤とした代謝リプログラミングと転写因子を基盤としたエピゲノムリプログラミングの双方を機能的かつ有機的に分子論的に掘り下げて究明することができた。新たな創薬展開として核酸医薬を含む革新的な新医療技術の具現化に向けて基盤を構築した。

E. 結論

革新的な医療を創出し、いち早く臨床現

場に展開するための創薬シーズの開発に向けて着実な基盤を構築した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koseki, J., Colvin, S. H., Fukusumi, T., Nishida, N., Konno, M., Kawamoto, K., Tsunekuni, K., Matsui, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Mathematical analysis predicts imbalanced IDH1/2 expression associates with 2-HG-inactivating β -oxygenation pathway in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* 46(3):1181-1191, 2015.
- 2) Hamabe, A., Konno, M., Tanuma, N., Shima, H., Tsunekuni, K., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Mimori, K., Gotho, N., Yamamoto, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 111(43):15526-15531, 2014.
- 3) Hamabe, A., Hirofumi, Y., Konno, M., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Nishida, N., Kawamoto, K., Koseki, J., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Combined evaluation of hexokinase 2 and phosphorylated pyruvate dehydrogenase-E1 α in invasive front lesions of colorectal tumors predicts cancer metabolism and patient prognosis. *Cancer Sci.*, 105(9):1100-1108, 2014.
- 4) Fukusumi, T., Ishii, H., Konno, M., Yasui, T., Nakahara, S., Takenaka, Y., Yamamoto, Y., Nishikawa, S., Kano, Y., Ogawa, H., Hasegawa, S., Hamabe, A., Haraguchi, N., Doki, Y., Mori, M., Inohara, H. CD10 as a novel marker of therapeutic resistance and cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer*, 111(3):506-514, 2014.
- 5) Kano, Y., Konno, M., Kawamoto, K., Tamari, K., Hayashi, K., Fukusumi, T., Satoh, T., Tanaka, S., Ogawa, K., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. Novel drug discovery system for cancer stem cells in human squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncol. Rep.*, 31(3):1133-1138, 2014.
- 6) Yoshioka, Y., Kosaka, N., Konishi, Y., Ohta, H., Okamoto, H., Sonoda, H., Nonaka, R., Yamamoto, H., Ishii, H., Mori, M., Furuta, K., Nakajima, T., Hayashi, H., Sugisaki, H., Higashimoto, H., Kato, T., Takeshita, F., Ochiya, T. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat. Commun.*, 7;5:3591, 2014.
- 7) Hasegawa, S., Eguchi, H., Nagano, H., Konno, M., Tomimaru, Y., Wada, H., Hama, N., Kawamoto, K., Kobayashi, S., Nishida, N., Koseki, J., Nishimura, T., Gotoh, N., Ohno, S., Yabuta, N., Nojima, H., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. MicroRNA-1246 expression associated with CCNG2-mediated chemoresistance and stemness in pancreatic cancer. *Br J. Cancer*, 111(8):1572-1580, 2014.
- 8) Okano, M., Konno, M., Kano, Y., Kim, H., Kawamoto, K., Ohkuma, M., Haraguchi, N., Yokobori, T., Mimori, K., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Human colorectal CD24⁺ cancer stem cells are susceptible to epithelial-mesenchymal transition. *Int. J. Oncol.*, 45(2):575-580, 2014.
- 9) Kano, Y., Ishii, H., Konno, M., Yamasaki, M., Miyata, H., Nishikawa, S., Hamabe, A., Ogawa, H., Takahashi, H., Ohta, K., Hasegawa, S., Tanaka, K., Fukusumi, T., Otsuka, M., Kawamoto, K., Haraguchi, N., Fujimoto, R., Isobe, M., Tomita, Y., Matsuura, N., Takiguchi, S., Mori, M., Doki, Y. Cells of origin of squamous epithelium, dysplasia and cancer in the head and neck region after bone marrow transplantation. *Int. J. Oncol.*, 44(2):443-450, 2014.
- 10) Takeyama, H., Yamamoto, H., Yamashita, S., Wu, X., Takahashi, H., Nishimura, J., Haraguchi, N., Miyake, Y., Suzuki, R., Murata, K., Ohue, M., Kato, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Ishii, H., Mimori, K., Doki, Y., Mori, M. Decreased miR-340 expression in bone marrow is associated with liver metastasis of colorectal cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 13(4):976-985, 2014.
- 11) Lovat, F., Ishii, H., Schiappacassi, M.,