

# がん幹細胞標的薬探索のための in vitro がん幹細胞モデル系の開発

金沢大学 がん進展制御研究所  
高橋 智聡

## 1. はじめに

がん幹細胞仮説は、がんの転移や再発の機序を非常にうまく説明する。その成立は、組織幹細胞が直接がん化する場合と、分化した細胞から生じたがん細胞がgeneticあるいはepigeneticな変異を経て、幹細胞様の性質を獲得する場合を含むと思われる。様々な理由から、この性質を標的とすることが、がん治療の方策状有用と考えられている。ところが、がん幹細胞標的薬の開発は、極めて成功例が少ない。これは、ヒト腫瘍から幹細胞マーカーを使って集めた細胞に、培養皿上で、その性質を安定的に発現させることが困難なため、ハイスループットな解析や化合物スクリーニングに不適合であることが最大の理由であろう。また、例えば、メラノーマの幹細胞がより分化した細胞と絶えず入れ替わりを起こすなど、幹細胞性だけでなく、細胞運命の可塑性そのものを標的としなければよい治療法を開発できないであろう。既存の組織幹細胞学も、がん幹細胞の理解や克服に必ずしも役立つわけではないことが知られつつある。幹細胞マーカーすら、免疫不全マウスの微小環境に適合しやすいというだけで、がん幹細胞の概念に当てはまる細胞を必ずしも代表しないのではという意見もある。これらの困難を克服するためには、制御の容易なモデル化がん幹細胞系を作り出す必要がある。この材料としては、ヒトがん由来の細胞よりも、正常ヒト細胞に外来性に遺伝子導入したものや遺伝子組み換えマウス由来の細胞など、遺伝学的な背景と腫瘍の成立機序がよく判っているものが有利であると考えた。

## 2. 方法

1) 複合変異ノックアウトマウスの作製：Rb ヘテロ型欠損は、ほぼ 100%の浸透率で、甲状腺カルシトニン産生細胞（以下 C 細胞）由来の良性腫瘍を生じる。我々は、このマウスにおいて N-ras を同時欠損するとこの腫瘍が高度に悪性化することを報告していた（1）。これは、Rb 不活性化時に N-Ras の活性が上昇し、DNA 損傷応答反応とそれに引き続く細胞老化を誘導するため、悪性進展が妨げられるが、N-Ras を同時欠損することによってそのような生体防御機構が誘導されなくなることで、腫瘍の高度な悪性進展を許す為である（2）。言い換えれば、Rb 不活性化と DNA 損傷応答あるいは細胞老化機構の破綻が起きれば、がん化には必要十分とすることである。Rb ヘテロ型欠損に加えて Ink4a, Arf, Suv39h1, ATM, p53 をホモ型で欠くマウスをすでに作製した。更に、これらを Nanog プロモーターの下流に GFP を挿入したノックインマウスと交配してえた複合変異マウスに生じる C 細胞腫瘍を観察した。

2) 細胞株の樹立：Rb ヘテロ型複合変異マウスどうしの交配により、Rb ホモ型に加え同様の複合遺伝子変異を有する MEF をえた。Rb ヘテロ型の複合変異マウスに生じた甲状腺腫瘍を切除し、培養、細胞株として樹立した。また、p53<sup>-/-</sup>マウスに生じる腫瘍を摘出、株化を試み、低悪性度であり Rb<sup>+/+</sup>; p53<sup>-/-</sup>の遺伝型を持つ細胞株を樹立した。更に、この細胞において Rb ノックダウン

を行い、細胞の挙動を観察した。

3) ハイスループット解析系樹立への準備：上記にて樹立した様々な遺伝子改変マウス由来細胞株を EGF, bFGF 等添加した無血清培地において培養し、スフィア形成能を観察した。また、形成されたスフィアの性状や安定性を解析した。

### 3. 結果 研究成果

1) Rbヘテロ型に加えて Ink4a, Arf, Suv39h1, ATM, p53 をホモ型で欠くマウスは、いずれも早期に悪性C細胞腫瘍を生じた。このような腫瘍に、細胞老化の痕跡は見出さなかった。qPCRレベルでは、腫瘍由来の細胞中に Nanog 発現の亢進を検出したが、組織レベルで GFP を検出することは困難であった。Rb-p53 DK0マウスの観察からは、非常に興味深い知見が得られた。p53 アレル数は、Rb不活性化C細胞腫の脱分化に大きく寄与することが判った。

2) 非常に有益な細胞株を多数得ることができた。Rb不活性化; p53+/-C細胞腫株と、Rb不活性化; p53-/-C細胞腫株を双方数株ずつ樹立した。この細胞株群間には、分化能、腫瘍あるいはスフィア形成能の上で、大きな差があり、がん幹細胞モデルとしても、また、Rb-p53の機能関連を探索する上でも重要な実験系を創出することができた。Rb不活性化; ATM-/-C細胞腫からも高頻度に腫瘍およびスフィア形成能を示す細胞株を得た。これらの性質は、Rbの再構成によって、完全に抑制された。Rb-/-; p53-/- MEFは、スフィア形成能を有することがわかった。また、Rbとp53を両欠損することによって、MEFとしての従来の分化能に褐色脂肪細胞への分化能が付加されることがわかった。

3) がん幹細胞において、ES細胞特異的遺伝子の発現がしばしば亢進する。我々も、上記の過程で得た細胞およびスフィアにおけるES細胞特異的遺伝子の発現をqPCR法にて解析した。スフィア形成細胞において Nanog, Sox2, Oct4 等の発現亢進を確認した。また、これらのスフィア形成が、Nanogの発現に多く依存することを見出した。さらに、スフィアを形成した細胞は、その後の接着培養中しばらくの間、強いスフィア形成能と高いNanog発現を維持することがわかった。なお、Nanogの発現調整は、DNAメチル化のレベルでなされると考えている。これらの知見を総合して、主としてRb-p53両欠損細胞を材料に、スフィア形成を阻害する化合物のスクリーニング、そして、一次コロニーよりも二次コロニーに対して高い細胞傷害性を示す化合物のスクリーニングを準備中である。化合物のソースには、FDA approved drug libraryやkinase阻害剤や脂質合成系阻害剤のlibraryを用いる。

### 4. 考察 まとめ

Rb, p53の変異あるいは不活性化は、ヒトがんにおいて極めて高頻度に観察される。これらの経路の間には、ARFがん抑制遺伝子産物等を介した複雑なクロストークが存在するので、両方の経路が不活性化することが、かなりの割合の発がんの本態であると思われる。我々の系は、C細胞や、間葉系の細胞を用いるため、臨床的癌腫とはいささか距離がある。しかしながら、まず、系が安定的で、遺伝子の再構成等によるコントロールが容易かつ理に合っていることが利点である。さらに、がん抑制遺伝子経路の不活性化というコンテキストで効能を示す薬剤を探索することにより、臨床癌腫にfidelityの高い従来のモデルでは見いだせなかった化合物そしてその標的分子に行き当たる可能性を有している。もう一つ我々が興味を持っているのは、Rb-p53系の未知のクロストーク経路である。我々はRbが脂質生合成経路を制御する可能性を報

告（２）、なおもその本態に迫ろうとしている。p53は、腫瘍の好氣的解糖を制御することが近年報告された。解糖系が脂質生合成に必要な炭素原子を供給することは言わずもがなである。ここにもRb-p53のクロストークがあるかもしれない。実際に、Rb-p53DK0細胞によるスフィア形成は、コレステロール生合成経路に強く依存するようである。Statinによるがん抑制効果は、かなり以前から周知されているが、その機序は不明である。今後、この面からも切りこむ所存である。尚、助成期間中に（３，４）の論文を刊行した。本会による御助成に、心より感謝申し上げます。

## 5. 発表論文、参考文献

1. C. Takahashi, B. Contreras, T. Iwanaga, Y. Takegami, A. Bakker, R. T. Bronson, M. Noda, M. Loda, J. L. Hunt, M. E. Ewen. *Nras* loss induces metastatic conversion of *Rb1*- deficient neuroendocrine thyroid tumor. *Nature Genetics* 38: 118-123, 2006.
2. A. Shamma, Y. Takegami, T. Miki, S. Kitajima, M. Noda, T. Obara, T. Okamoto, and C. Takahashi. Rb regulates DNA damage response and cellular senescence through E2F-dependent suppression of N-Ras Isoprenylation. *Cancer Cell* 15: 255-269, 2009.
3. T. Miki, A. Shamma, S. Kitajima, Y. Takegami, M. Noda, Y. Nakashima, K. Watanabe and C. Takahashi. The beta1-integrin-dependent function of RECK in physiological and tumor angiogenesis. *Mol. Cancer Res.* 8: 665-676, 2010.
4. S. Kitajima, T. Miki, Y. Takegami, Y. Kido, M. Noda, E. Hara, A. Shamma and C. Takahashi. Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs interferes with epidermal growth factor receptor signaling. *Oncogene* 30: 737-750, 2011.