

癌幹細胞を標的とした新規脳腫瘍治療戦略の構築

生島 弘彬

東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻 分子病理学講座

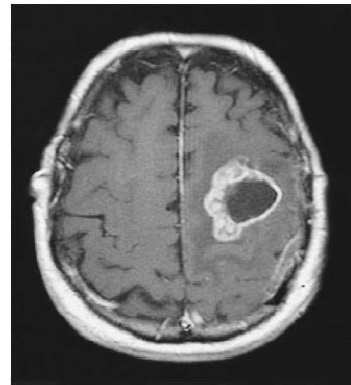
博士課程 4 年 / 医学部医学科 5 年

1. 諸言

脳腫瘍は頭蓋骨に囲まれた定体積領域内に形成される腫瘍であることから、周囲組織の浮腫と併せて、他組織の腫瘍に比較して正常組織（正常脳）に対する強い圧迫効果を持つ。さらにその圧迫対象が生命中枢である脳であることから、頭痛・嘔吐・視力障害に始まり、強い症状を示す。

神経膠腫は原発性脳腫瘍の中で最も多く発生する腫瘍であるが、

その中でも特に予後の悪い膠芽腫は、平均生存期間 1 年程度、5 年生存率 10% 以下、と体内全腫瘍の中でも最も予後の悪い腫瘍の一つであり、さらにその治療成績は数十年近く顕著な改善がみられていない。その原因の一つとして、膠芽腫細胞の強い浸潤性¹が挙げられる。膠芽腫細胞は周囲の正常脳組織に急速に浸潤し、MRI 画像で腫瘍塊として見られる領域（右図）よりもはるかに広い領域に腫瘍細胞が散らばっている。それに



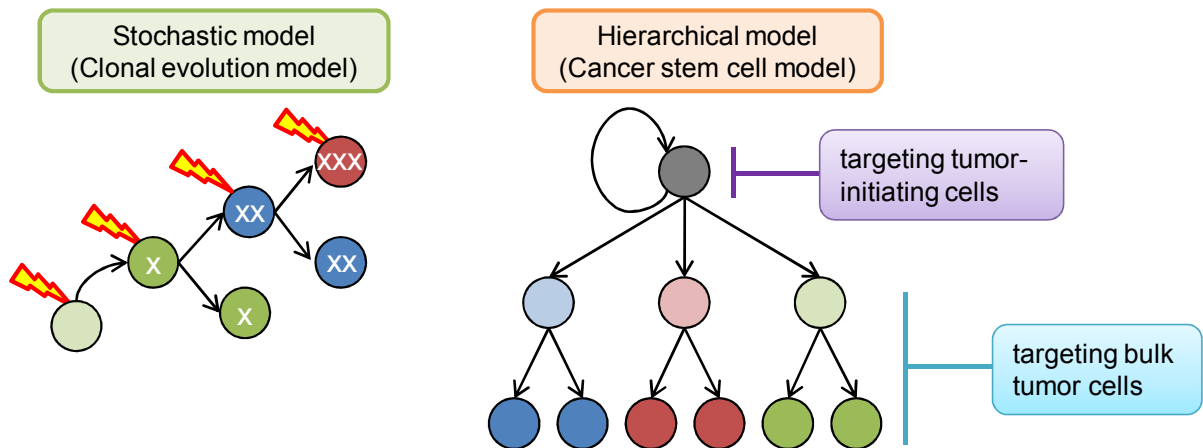
加えて、脳腫瘍の周囲に存在するのは、生命維持に必須な正常脳であり、例えば消化器系腫瘍で行われるように、マージンを取って（少し広めに）外科切除するということが現実的ではない。同様の理由から放射線を用いた治療においても、照射量を十分に確保することが難しい。その結果として、外科切除・放射線治療・化学療法を組み合わせたとしても前述のような治療成績となっており、加えて、再発率が非常に高いという特徴を持つ。

これらに対して、薬剤抵抗性、放射線抵抗性、再発時の腫瘍原性、全ての統一的な原因になっているものとして、最近、脳腫瘍幹細胞の存在が指摘されてきた (Vescovi *et al.*, *Nature Reviews Cancer*, 2006)。かつては、癌組織内において、全ての癌細胞は均一の形質をもっており、その形質の変化は生存に有利な変異を確率論的に獲得することによって為されると考えられてきた (次ページ図、*Stochastic model*)。しかしながら、様々な臨床知見や実験結果等から、癌細胞は全ての細胞が無制限な分裂能力を有した均一な細胞集団ではなく、自己複製能と多分化能を有する幹細胞（ハチの集団における女王バチのような存在）とそこから派生してできる分化した細胞（働

これらに対して、薬剤抵抗性、放射線抵抗性、再発時の腫瘍原性、全ての統一的な原因になっているものとして、最近、脳腫瘍幹細胞の存在が指摘されてきた (Vescovi *et al.*, *Nature Reviews Cancer*, 2006)。かつては、癌組織内において、全ての癌細胞は均一の形質をもっており、その形質の変化は生存に有利な変異を確率論的に獲得することによって為されると考えられてきた (次ページ図、*Stochastic model*)。しかしながら、様々な臨床知見や実験結果等から、癌細胞は全ての細胞が無制限な分裂能力を有した均一な細胞集団ではなく、自己複製能と多分化能を有する幹細胞（ハチの集団における女王バチのような存在）とそこから派生してできる分化した細胞（働

¹ 腫瘍細胞が腫瘍塊から周りの正常組織の中へと飛び散る能力。これが癌の転移に大きく寄与することが知られている。

きバチ) からなるヘテロな集団である、ということがモデルとして考えられるようになった (下図、Hierarchical model)。これが癌幹細胞モデルである。これまでに開発されてきた抗癌剤や放射線療法は、原則的には癌細胞の「増殖しやすさ」を標的として開発されてきた。しかしながら、この癌幹細胞は自身がほとんど増殖することなく、大量の癌“非”幹細胞を供給することができるという特徴を持っている。そのため、既存の抗癌剤を癌細胞集団に処理したとしても、癌“非”幹細胞 (働きバチ) は死滅するものの、癌幹細胞 (女王バチ) は生存し続け、その癌幹細胞を基点として再び癌細胞集団を形成し再発を起してしまう (Reya *et al.*, Nature, 2001)。



そのため近年、これまでの抗癌剤開発のスキームとは異なり、癌幹細胞を標的とした新規の癌治療法の開発の必要性が叫ばれ始めてきた。その一つの戦略として、癌幹細胞の“幹”細胞としての形質 (“stemness”) を失わせることができれば、その高い腫瘍原性能 (癌細胞集団を供給し再発巣を作る力) が喪失し、既存の治療法によって全癌細胞集団を死滅させることが可能になる、という方法が考えられる。しかしながら、その癌幹細胞がいかにしてその“stemness”を維持しているのかという疑問はこれまで全く解決されてきていない。そこで本申請者は、脳腫瘍幹細胞が如何にして自身の腫瘍原性能を維持しているのかを検討し、そこで得られた知見を基にして、新規パラダイムに基づく脳腫瘍治療戦略を構築した (Ikushima *et al.*, Cell Stem Cell, 2009)。

2. 実験方法

(i) 本研究に使用した細胞

東京大学医学部附属病院にて膠芽腫の患者から摘出された脳腫瘍組織を用いた。なお、本研究は東京大学医学部附属病院倫理委員会の承認と、当該患者の同意のもとで行われた。脳腫瘍組織を無血清培地で培養することで、脳腫瘍幹細胞を単離した。

(ii) 頭蓋内細胞移植

*in vitro*²にて用意した脳腫瘍幹細胞をマウス (5 週齢、Balb/c nu/nu) の右大脳半球に定局的に移植後、その生存を観察した。本実験は東京大学の動物倫理規定に基づき行われた。

² 試験管内・フラスコ内での実験を意味する。反対にマウス等を用いた生体内での実験については、“*in vivo*”と表記する。

(iii) 限界希釈法による *in vitro* での腫瘍原性能の検討

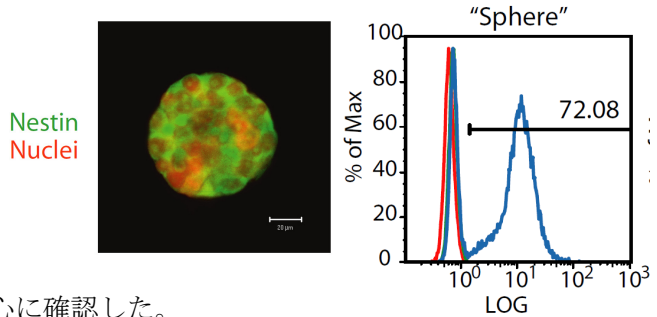
脳腫瘍幹細胞を様々な細胞数で 96 穴プレートに播種し、無血清培地内で 7 日間培養した。Sphere が形成されていない well の割合を計測し、1 well あたりの細胞数との相関関係を検討した。

(iv) 各細胞における未分化・分化マーカーの発現

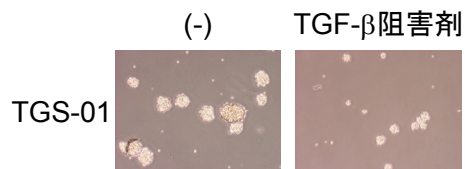
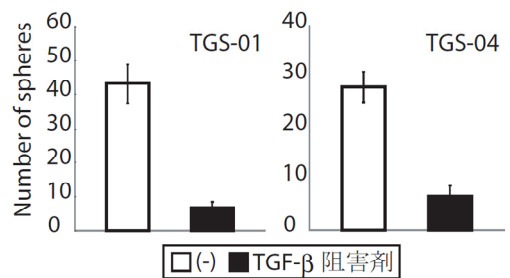
8-well chamber に各実験条件での脳腫瘍幹細胞を播種し、7 日間培養した。Paraformaldehyde にて細胞を固定後、各マーカー特異的な抗体を用いて細胞蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡下で発現陽性細胞の割合を計測した。

3. 結果

本申請者はまず、膠芽腫と診断され外科切除を受けた患者の切除塊から得られた脳腫瘍細胞群を、腫瘍原性の強い細胞のみが選択的に増殖する培養条件下 (DMEM/F12 serum-free medium, B27, EGF, bFGF) で培養することで、高腫瘍原性能を持つ細胞を得て、これらが、脳腫瘍幹細胞としての性質を持つことを、マウスへの移植実験・マーカー発現 (右図、左 : Nestin、右 : CD133) を中心に確認した。

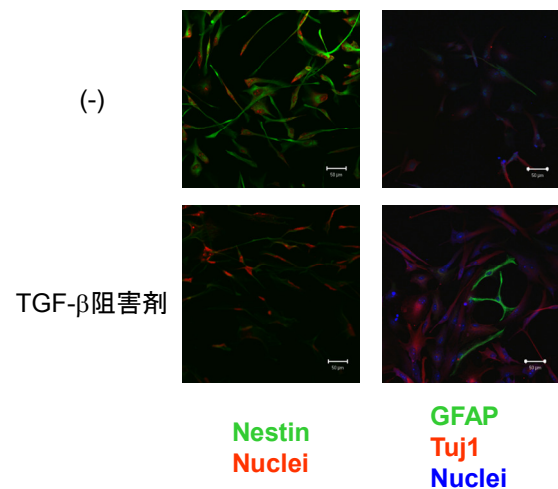


この脳腫瘍幹細胞がいかにしてその高い腫瘍原性能を維持しているのかを検討するために、脳腫瘍増大に大きく関与していることが知られているサイトカインの一つである TGF (transforming growth factor)-β の関与を検討した。TGF-β はこれまでに脳腫瘍組織において高発現が認められるなど、脳腫瘍との関係性が報告されており (Ikushima *et al.*, EMBO J, 2008)、脳腫瘍の進展に重要な働きを示す因子の一つであることが知られているが、それが脳腫瘍幹細胞においてどのような働きをしているのか、という点については、これまで知られていない。まず、TGF-β が脳腫瘍幹細胞に対してどのように作用をしているのかを検討するために、TGF-β の働きを細胞内で抑える薬剤 (TGF-β 阻害剤) を添加し、その影響を観察した。まず、*in vitro* での腫瘍原性能に対する作用を検討したところ、TGF-β 阻害剤により sphere³ の形成が強く抑制された (右図)。さらに、TGF-β を細胞外でトラップすることでその作用を抑制する中和抗体を用いた際にも同様の傾向が得られた。この結果から、脳腫瘍幹細胞は、その腫瘍原性能維持において、内因性の TGF-β シグナルに大きく依存していること

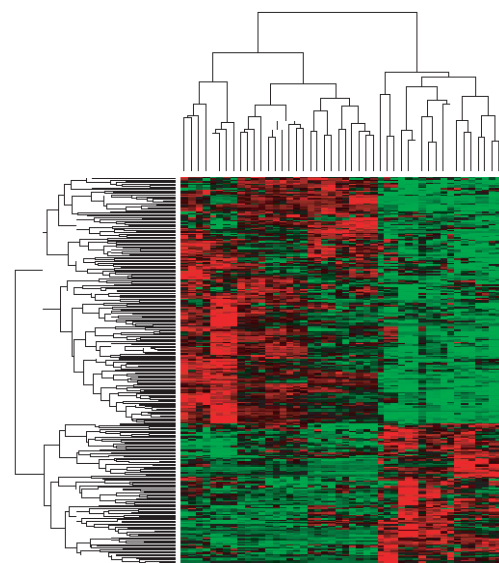


³ 神経幹細胞が *in vitro* において neurosphere と呼ばれるマリモ状の塊を形成するのと同様に脳腫瘍幹細胞も sphere を形成し、これが腫瘍原性能を反映すると考えられている。

が明らかとなった。続いて、脳腫瘍幹細胞における未分化マーカー（幹細胞マーカー）及び分化マーカーの発現状況における TGF- β の作用を検討した。その結果、TGF- β 阻害剤の存在下では、未分化マーカーである Nestin や Musashi を発現する細胞の割合が減少し、逆に分化マーカーである GFAP や Tuj1 を発現する細胞の割合が増加した（右図）。このことから、TGF- β の作用によって脳腫瘍幹細胞の“幹”細胞としての形質 (“stemness”) が保たれていることが明らかとなり、この TGF- β の作用を阻害することで、脳腫瘍幹細胞の腫瘍原性能が抑えられる（“女王バチ”が“働きバチ”に変化してしまう）ことが示された。



続いて、本申請者は TGF- β シグナル阻害剤による腫瘍原性能喪失のメカニズムを探った。その中で、TGF- β シグナルにより Sox2 と呼ばれる転写因子の発現が誘導されること、及び、TGF- β 阻害剤によりその発現が抑制されることを見出した。Sox2 はこれまでも胚性幹細胞 (ES 細胞) や神経幹細胞の維持に必須の働きをすることが知られている他、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の作成にも用いられるなど、“stemness”と強く関係する遺伝子であることが知られている。しかしながら、Sox2 の癌幹細胞における役割はこれまでに知られていなかったことから、まず本申請者は、脳腫瘍幹細胞における Sox2 の機能を探索する目的で、siRNA⁴によって Sox2 の発現を低下させることによる脳腫瘍幹細胞の性状の変化を検討した。その結果、Sox2 の発現が低下することで、脳腫瘍幹細胞の sphere 形成能が低下すること、未分化マーカーNestin を発現する細胞の割合が低下し、分化マーカーGFAP を発現する細胞の割合が上昇することが明らかとなった。この結果から、Sox2 は脳腫瘍幹細胞の“stemness”の維持に必須の因子であり、その腫瘍原性能の維持に重要な働きをしていることが示された。さらに、Sox2 を脳腫瘍幹細胞内において過剰に発現させておくことによって、TGF- β 阻害剤による脳腫瘍幹細胞の腫瘍原性能抑制効果が見られなくなった。以上の結果から、TGF- β は脳腫瘍幹細胞において Sox2 の発現を誘導することによってその“stemness”を維持し、高い腫瘍原性能の維持に作用しており、その TGF- β の作用を抑制することで脳腫瘍幹細胞の腫瘍原性能が抑えられることが示された。



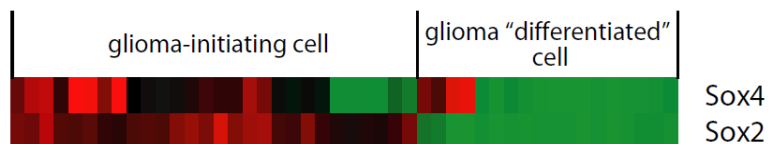
しかしながら、その後の本申請者の検討から TGF- β シグナルは脳腫瘍幹細胞内で Sox2 の発現を「直接的に」誘導しているわけではないことが示唆され、この発現調節を介在する因子が存在する可能性が生じた。そのため、脳腫瘍幹細胞の“stemness”維持のメカニズムをさらに探るために、過去に米国の研究グル

⁴ 標的とする遺伝子が細胞内で発現するのを抑える技術。

ープ (Lee *et al.*, *Cancer Cell*, 2006) によって収集された脳腫瘍サンプルを基に取られたマイクロアレイデータを入手し、それらに対して独自の解析を加えることで (前ページ下図)、TGF- β シグナル下で働く未分化性維持機構のモデルの再構築を目指した。その結果、TGF- β による Sox2 の誘導を介在する因子として Sox4 と呼ばれる別の転写因子の存在があることを示唆するデータが得られ、以下ではその Sox4 の脳腫瘍幹細胞内での働きを検討した。

まず、本申請者は脳腫瘍“非”幹細胞と比較して脳腫瘍幹細胞においては、Sox4 がより高いレベルで発現していることを確認した。また、脳腫瘍細胞内において、Sox4 と Sox2 の発現レベルに正の相関関係があることも確認

した (右図)。さらに、脳腫瘍幹細胞内において、siRNA により Sox4 の発現を抑制したところ、

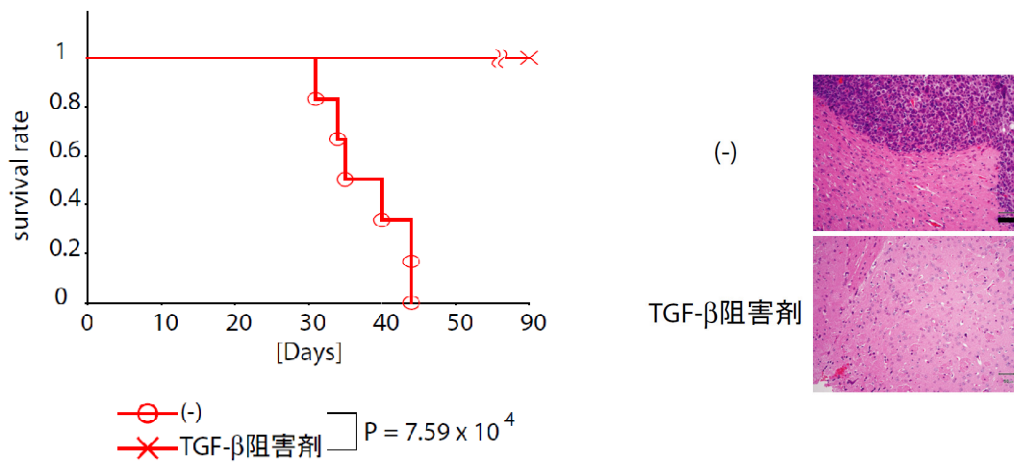


脳腫瘍幹細胞の sphere 形成能が低下すること、未分化マーカーNestin を発現する細胞の割合が低下し、分化マーカーGFAP を発現する細胞の割合が上昇することが明らかとなった。この結果から、Sox4 が腫瘍幹細胞の"stemness"の維持に必須の因子であり、その腫瘍原性能の維持に重要な働きをしていることが示された。加えて、Sox4 の発現が抑制された条件下においては、先ほどのTGF- β による Sox2 の発現誘導が見られなくなるということも見出された。以上の結果から、Sox4 は TGF- β による Sox2 の発現誘導を介在することで脳腫瘍幹細胞の"stemness"の維持に作用していることが示された。

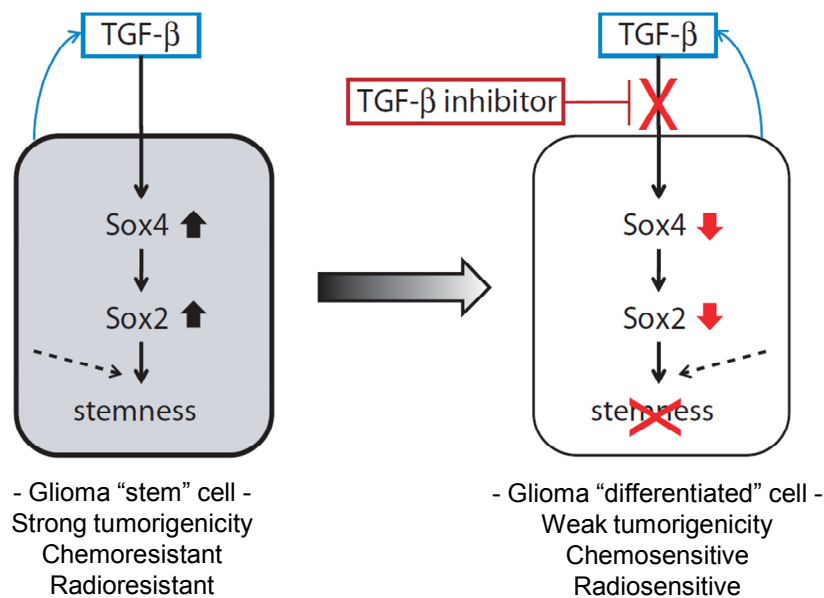
ここまでで本申請者が得た実験結果から、TGF- β は Sox4、さらにその下流の Sox2 の発現を誘導することで脳腫瘍幹細胞の"stemness"の維持を行っており、その結果として、脳腫瘍幹細胞の高い腫瘍原性能を保っている、と結論づけることができる。つまり、TGF- β の作用は脳腫瘍幹細胞の腫瘍原性能に必須の因子であり、その作用を抑制することで、脳腫瘍幹細胞の"stemness"を失わせ、腫瘍原性能を喪失させることができると考えられる。脳腫瘍において、高い腫瘍原性能をもった脳腫瘍幹細胞を喪失させる (“女王バチ”を消滅させる) ことができるということは、すなわち、薬剤・放射線抵抗性の克服や再発リスクの低下を意味し、今後の新たな脳腫瘍治療法開発にとって重要な一歩となると考えられる。

さらに、本申請者はこれまでに得られた実験結果を今後の脳腫瘍治療法開発へとつなげるために、マウスの脳内に様々な条件下で脳腫瘍幹細胞を移植して、その腫瘍形成能、マウスの神経症状の出現状況、そしてマウスの生存状況を比較検討した (次ページ上図)。脳腫瘍幹細胞をそのままの状態に移植したマウス群においては、移植後 30~40 日程度で神経症状を示し、全てのマウスがまもなく死亡した。それに対して、TGF- β 阻害剤を処理した脳腫瘍幹細胞を先ほどの群と同じ細胞数移植したマウスにおいては、移植から 90 日経過しても神経症状は認められず、全てのマウスが生存していた。また、それぞれの群のマウスの頭蓋内の移植部位を観察したところ、脳腫瘍幹細胞をそのまま移植した群では、巨大な腫瘍塊が形成されていたのに対し、TGF- β 阻害剤を処理した脳腫瘍幹細胞を移植した群においては、頭蓋内に有意な腫瘍形成を認めなかった。この結果は、TGF- β 阻害剤処理により、脳腫瘍幹細胞の腫瘍原性能が失われ、腫瘍原性能のない脳腫瘍“非”

幹細胞へと転換されたことを意味する。



以上の結果から、TGF-βは脳腫瘍幹細胞において TGF-β-Sox4-Sox2 という新規の経路を活性化することによって、その"stemness"を維持し、さらに高い腫瘍原性能の維持に寄与していることが明らかとなった。本研究によって示されたモデル（下図）は、他の腫瘍幹細胞及び正常幹細胞を含めても、全くの新規のモデルである。さらに本申請者は、その TGF-βの作用、もしくはその下流の Sox4, Sox2 の発現を抑制することで脳腫瘍幹細胞の腫瘍原性能が抑えられることを示した。このことは、TGF-β, Sox4, Sox2 が、現状の治療手段に乏しく予後が極めて不良な膠芽腫の新規治療標的となることを意味し、さらにそれはマウスへの頭蓋内移植モデルによって証明された。



4. 論議と今後の展望

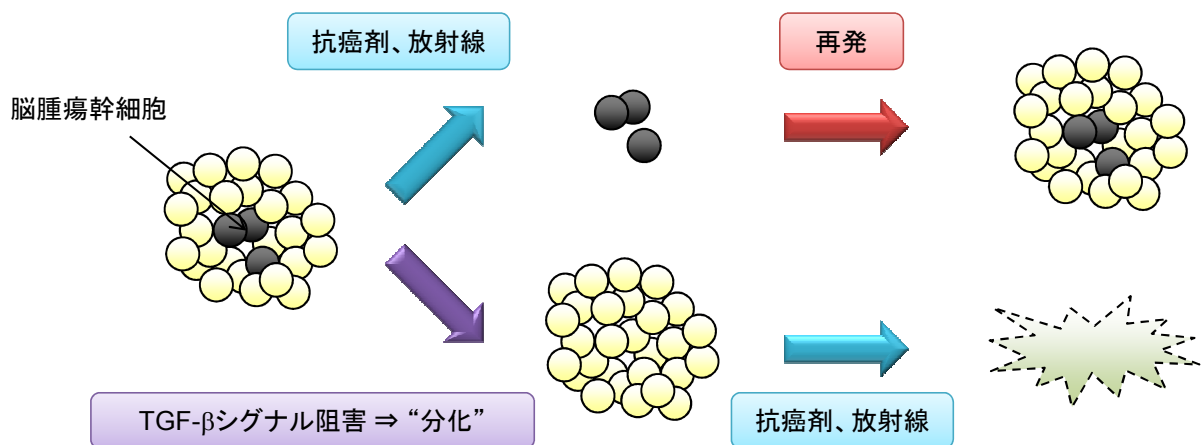
膠芽腫は脳腫瘍の中でも特に予後の悪い腫瘍であり、悪性腫瘍全体の中でも最も予後の悪い腫瘍の一つである。さらにこの統計は、膠芽腫細胞の性状が長年研究されているにも関わらず数十年

改善されていない。その原因の一つとして、膠芽腫の高い再発率が上げられる。膠芽腫細胞は浸潤性が高く、発見時には正常脳組織内へも腫瘍細胞が飛び散ってしまっているケースがほとんどである。そのため、外科切除により全腫瘍細胞を取りきることは現実的には不可能であり、その残存した腫瘍細胞が起源となって再発腫瘍が形成されてしまう。

近年、悪性腫瘍の発生において、特に腫瘍原性能の高い細胞群である癌幹細胞の存在が指摘され、その同定と同時に、それらが悪性腫瘍の治療抵抗や再発において非常に重要な働きをしていることが示されてきた。またこの癌幹細胞は他の腫瘍細胞（癌“非”幹細胞）に比較してより高い浸潤性をもつ可能性が示唆されており、このことは、前述のように膠芽腫における外科切除不能な細胞による高い再発率とも合致する。

このように癌幹細胞が新規の抗癌剤開発の有望なターゲットとなり得ることは現在までに分かっている。しかしながら、この癌幹細胞がいかにして“幹細胞”足り得ているのか、そしていかにすれば癌“非”幹細胞に転換させることができるのか、という疑問についてはこれまでに明確な答えが得られていない。

このことから、本申請者らは膠芽腫幹細胞がいかにして“幹細胞”足り得ているのかという疑問を解決し、そこで得られた知見をもとにして新規の脳腫瘍治療戦略を構築することを目的し、本研究を開始した。その中で TGF- β というサイトカインが膠芽腫幹細胞においてその維持に必須のシグナルを流していることを見出した。さらなる研究の結果、その TGF- β が膠芽腫幹細胞内において、Sox4-Sox2 という新規のカスケードを活性化することでその作用を発揮していることがあきらかとなった。また、この TGF- β -Sox4-Sox2 のシグナル経路のうちいずれの要素の作用を抑えた際にも膠芽腫幹細胞の高い腫瘍原性能が抑制されることを確認し、本研究で得られた知見が新規の脳腫瘍治療戦略の構築に向けた第一歩となることを確認した（下図）。



本研究成果の論文発表後、テレビニュース・新聞をはじめとして多くのメディアにおいて本研究成果を紹介して頂いた。その直後から、現在膠芽腫に苦しむ患者さんから直近での臨床試験の開始の可能性などについての問い合わせの連絡を多数頂いた。確かに、本研究により、膠芽腫幹細胞を標的とした膠芽腫の新規治療法の開発の可能性が開かれた。しかし残念ながら、本研究成果の臨床応用にはまだ多くの解決すべき問題が残っているのが現実である。正常神経細胞への悪影

響の有無の確認、脳内の腫瘍組織への効率的な薬剤送達方法の開発については早急な問題解決が必要である。さらに TGF- β は腫瘍組織において様々な細胞応答を誘導することも知られていることから (Ikushima and Miyazono, *Cancer Science*, 2010)、それに対する効果についても注意深く検討する必要がある。また、TGF- β の活性が強くは見られない腫瘍組織も存在することから、本研究に基づく治療戦略について、同じ膠芽腫であっても、効果が強く期待できる患者と効果が見込めない（副作用のみが出てしまう）患者とが存在する可能性がある。そのため、本治療法に対して効果が認められる可能性があるか否かを判断する技術についても開発が必須となるであろう。その技術により、本治療法に対して効果が認められ得る患者に対しては本治療法を用い、そうでない患者についてはより効果の見込める治療法を選択することで、より副作用が少なく効果的な治療法を選択することが可能となると考えられる。また、TGF- β 阻害剤により膠芽腫幹細胞から膠芽腫“非”幹細胞へと転換させることで、既存の抗癌剤・放射線治療に対する抵抗性も改善すると考えられることから、本研究成果と既存の治療法との組み合わせの可能性についても検討すべき課題の一つである。

本申請者らは本研究成果の一日も早い臨床応用を目指し、現在までに国内外の複数の製薬企業との共同研究をスタートした。まだまだ解決すべき問題は山積みであるが、新規脳腫瘍治療戦略の実現と、癌幹細胞の全滅による癌“根治”が夢ではなくなる日を目指して、今後とも研究を進めて行きたい。

5. 謝辞

本研究は東京大学大学院の宮園浩平教授、藤堂具紀特任教授、稲生靖特任准教授、高橋雅道先生、山梨大学大学院の宮澤恵二教授らの御指導のもと行われました。この場を借りて、お世話になりました先生方に深謝致します。

6. 参考文献

- ✓ Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer*. (2006) 6, 425-36.
- ✓ Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. (2001) 414, 105-11.
- ✓ Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Miyazawa K, Miyazono K. Autocrine TGF- β signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell*. (2009) 5, 504-14.

- ✓ Ikushima H, Komuro A, Isogaya K, Shinozaki M, Hellman U, Miyazawa K, Miyazono K. An Id-like molecule, HHM, is a synexpression group-restricted regulator of TGF- β signalling. EMBO J. (2008) 27, 2955-65.
- ✓ Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. Cancer Cell. (2006) 9, 391-403.
- ✓ Ikushima H, Miyazono K. Cellular context-dependent "colors" of transforming growth factor- β signaling. Cancer Sci. (2010) 101, 306-12.
- ✓ 生島 弘彬、宮園 浩平「腫瘍原性能の維持における TGF- β シグナル」
実験医学（羊土社）2010年4月号特集