

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Iron depletion is a novel therapeutic strategy to target cancer stem cells

(除鉄による癌幹細胞を標的とする新しい治療戦略)

二宮卓之、大原利章、野間和広、桂 佑貴、勝部亮一、賀島 肇、加藤卓也、友野靖子、田澤 大、
香川俊輔、白川靖博、木村文昭、Chen Ling、笠井智成、妹尾昌治、松川昭博、藤原俊義

Oncotarget 8(58):98405-98416, 2017

平成 26 年 10 月 第 73 回日本癌学会学術総会に発表

平成 27 年 4 月 **The 106th American Association for Cancer Research Annual Meeting** に
発表

平成 27 年 10 月 第 74 回日本癌学会学術総会に発表

主 論 文

Iron depletion is a novel therapeutic strategy to target cancer stem cells

(除鉄による癌幹細胞を標的とする新しい治療戦略)

【緒言】

癌幹細胞仮説によると癌幹細胞は癌細胞の中に少数存在し、多分化能、自己複製能、化学療法耐性、放射線耐性を有し治療後の再発に深く関わっているとされる。癌幹細胞は治療の標的と考えられているが、これまでに有効な治療法は確立されていない。その理由として、癌幹細胞の割合が少ないこと、また多様性のため治療効果の評価が難しいことがある。岡山大学でマウス iPS 細胞から誘導された新規癌幹細胞モデル miPS-LLCcm が樹立された。この癌幹細胞モデルは、マウス Lewis 肺癌細胞株の培養上清で 4 週間培養されることで誘導された癌細胞で、幹細胞性マーカーを維持し、自己複製能を持ち、多分化能を有している。miPS-LLCcm 細胞株は未分化性を維持している場合は Nanog をプロモーターとした GFP を発現しており、Sox2, c-Myc, Oct3/4, Klf4 といった多能性幹細胞の特徴でもあるが、造腫瘍能と治療抵抗性にかかわる癌幹細胞マーカーでもある山中因子を発現している。

In vivo で miPS-LLCcm は腺組織中にサイトケラチンを発現し、高度の核異型、多数の核分裂像、血管増生を伴った腫瘍を形成する。miPS-LLCcm は臓器特異的な癌幹細胞モデルであり、癌幹細胞の微小環境を解析するのに有用なモデルである。癌幹細胞マーカーの発現と癌幹細胞治療の効果を評価するには有用な癌幹細胞モデルである。

鉄は細胞内でエネルギー産生、DNA 合成と言った重要な役割を担っている。適度な鉄濃度はヒトの健康に不可欠であるが、鉄過剰は一部の癌を引き起こされる事も知られている。我々はこれまでに除鉄が癌細胞の増殖抑制効果がある知見を得ているが、鉄が癌幹細胞においても重要な役割を果たしていると仮説を立て、癌幹細胞モデルを用いて除鉄の効果を検討した。本研究では鉄キレート剤であるデフェラシロクスとデフェロキサミンとを用い癌幹細胞を標的とした除鉄治療が有効か検証した。

【材料と方法】

細胞株

マウス iPS 細胞をマウス Lewis 肺癌細胞株の培養上清を用いて 4 週間培養し癌化させた miPS-LLCcm を癌幹細胞モデルとして使用した。また、非癌幹細胞としてマウス大腸癌細胞株 colon26, マウス乳癌細胞株 4T1, 線維芽細胞としてマウス胎仔線維芽細胞株 MEF, マウス線維芽細胞株 NIH-3T3 を使用した。

ピューロマイシン選択

miPS-LLCcm 細胞には GFP 陽性細胞と GFP 陰性細胞が混在している。Nanog をプロモーターとした GFP 陽性細胞にはピューロマイシン耐性遺伝子が搭載されており、Nanog を発現した細胞はピューロマイシンで選択をかけることができる。ピューロマイシン選択後には、GFP 陽性細胞の比率が 90%程度にまで高まり、この状態で選択をかけた miPS-LLCcm を実験に使用した。

試薬

鉄投与には鉄が結合しているタンパクであるホロトランスフェリンを使用した。経口鉄キレート剤であるデフェラシロクス、静注鉄キレート剤であるデフェロキサミンを使用した。また、対照の化学療法剤として 5-FU とシスプラチンを使用した。

細胞生存率アッセイ

miPS-LLCcm 細胞を DMEM 通常培地に FCS 15%を加えた条件と DMEM 除鉄培地に FCS1%という除鉄 条件のそれぞれに各濃度のヒトホロトランスフェリンを投与し、投与後 48 時間後の細胞増殖率を XTT アッセイにて評価した。miPS-LLCcm 細胞にデフェラシロクスおよびデフェロキサミンを様々な濃度で投与し、48 時間後に細胞生存率を XTT アッセイにて評価した。

また、マウス乳癌細胞株 4T1, マウス大腸癌細胞株 colon26, マウス線維芽細胞株 MEF, NIH-3T3 に対しても同様の実験を行い、細胞増殖率と細胞生存率をそれぞれ評価した。

フローサイトメトリー

FACSArray を用い、miPS-LLCcm 中の GFP 陽性細胞率を計測した。

スフェア形成アッセイ

miPS 細胞を超低接着性ウェルプレートで培養し、鉄キレート剤投与後のスフェア形成能を評価した。

タネル染色

アポトーシスの誘導をタネル染色で確認した。

In vivo 皮下腫瘍モデル

miPS-LLCcm 細胞 1×10^6 個を PBS とマトリゲルで懸濁し、ヌードマウス背部に皮下注射した。腫瘍の接種から 5 日後にマウスを不作為に 3 群に振り分け、デフェラシロクスとデフェロキサミンの投与を開始した。それぞれの薬剤は臨床での投与量を目安に腫瘍に直接投与し、各週 5 日投与した。腫瘍の接種から 18 日後まで腫瘍サイズの計測と体重測定を行った。

免疫組織学的染色

In vivo におけるコントロール群，デフェラシロクス投与群，デフェロキサミン投与群の miPS-LLCcm 細胞皮下腫瘍をそれぞれ採取し，抗 Nanog 抗体，抗 SOX2 抗体，抗 GFP 抗体，抗 c-Myc 抗体，抗 Oct3/4 抗体，ベルリンブルー染色を用い免疫組織学的染色をおこなった。

統計解析

2 群間の比較には Student's *t* 検定 を用いた。 *P* 値 < 0.05 をもって統計学的有意差ありとした。

【結果】

鉄供給により 癌幹細胞は増殖し，幹細胞性マーカーの発現は維持される

miPS-LLCcm 細胞に除鉄培地に FCS1%を加えた培養条件を除鉄条件として培養したものに，ホロトランスフェリンを添加し 48 時間後の細胞数を評価した。除鉄条件にホロトランスフェリンを添加した群はコントロール群に比較し有意差をもって増殖していた。一方，FCS 15%で培養した群ではホロトランスフェリンの添加効果は認めなかった。ウエスタンブロット法での解析では，除鉄条件にトランスフェリンを添加した群では，幹細胞性マーカーの発現は維持されていた。除鉄条件にホロトランスフェリンを添加した群では，トランスフェリンレセプター1 と DMT1 の発現が有意に亢進していた。

鉄キレート剤は癌幹細胞の増殖を抑制する

miPS-LLCcm 細胞に鉄キレート剤であるデフェラシロクスとデフェロキサミンを投与し 48 時間後の細胞生存率を XTT アッセイで計測すると濃度依存的に鉄キレート剤が抗腫瘍効果を示した。蛍光顕微鏡観察では GFP 陽性細胞も鉄キレート剤の濃度依存的に低下していた。colon26, 4T1 に鉄キレート剤を投与しても，濃度依存的に腫瘍増殖は抑制された。マウス線維芽細胞株 MEF, NIH-3T3 に鉄キレート剤を投与したところ，癌細胞と比較して細胞増殖抑制効果は低かった。

鉄キレート剤はアポトーシスと細胞周期停止により 癌幹細胞の増殖を抑制する

miPS-LLCcm 細胞に鉄キレート剤であるデフェラシロクスとデフェロキサミンを曝露させ，ウエスタンブロット法で解析したところ，アポトーシスマーカーである cleaved PARP, cleaved caspase3 の発現が増強していた。TUNEL 染色でもアポトーシスが誘導されていることが示された。また，鉄キレート剤により細胞周期調節タンパクである cyclin D1 の発現がウエスタンブロット法で低下しており，癌幹細胞において細胞周期停止も起こっていることが示された。

鉄キレート剤は癌幹細胞モデルにおいて Nanog, 山中因子といった幹細胞マーカーの発現を抑制する

miPS-LLCcm 細胞に鉄キレート剤を投与した群ではウエスタンブロット法による解析で

Nanog, Oct3/4 の発現が低下していた。デフェラシロクスでは Sox2, c-Myc, Klf4 の発現が濃度依存的に低下していたが、デフェロキサミンではこれらの発現低下は有意ではなかった。

癌幹細胞において 5FU とシスプラチンは幹細胞マーカーの発現を抑制しない

miPS-LLCcm に一般的な化学療法剤である 5-FU とシスプラチンを曝露させたところ、XTT アッセイで濃度依存的な細胞増殖抑制効果を示したが、ウエスタンブロット法で幹細胞マーカーの発現は抑制されていないことが示された。

In vivo 皮下腫瘍モデルにおいて鉄キレート剤は腫瘍増大と幹細胞性マーカーの発現を抑制する

miPS-LLCcm 細胞皮下腫瘍モデルで、腫瘍注入から 5 日目に鉄キレート剤を腫瘍に直接投与した。鉄キレート剤による治療群はコントロール群と比較し有意に腫瘍の増大が抑制された。摘出した腫瘍重量も鉄キレート剤投与群で有意に小さかった。腫瘍の免疫組織学的検査では、鉄キレート剤投与群で GFP, Nanog, Sox2, c-Myc, Oct3/4 といった幹細胞性マーカーの発現が抑制されていた。また鉄染色で腫瘍内の鉄含有量が低下していた。

【考察】

幹細胞マーカー発現は腫瘍の悪性度亢進に関連しているとされており、癌幹細胞は治療後の再発に関わっているとされているが、これまでは有用な細胞モデルが存在せず、研究が困難であった。本研究で用いた癌幹細胞モデルは Nanog, 山中因子といった幹細胞マーカーを定常的に発現しているため、癌幹細胞を標的とした治療を検証するのに有用と考えられた。

鉄過剰は発癌を誘発する事が知られており、逆に鉄をキレートする事が抗腫瘍効果をもつことも報告されている。我々のこれまでの研究でも鉄キレートにより腫瘍の増殖抑制のみならず、遊走能、浸潤能の低下が起ることを示している。本研究ではさらに鉄が癌幹細胞の幹細胞性の維持に重要な働きを持つことが示された。

鉄キレート剤が癌幹細胞中の幹細胞マーカーの発現を抑制するという事は、癌幹細胞において鉄が幹細胞の維持に密接に関係していることを示唆している。しかし、鉄代謝と幹細胞性の関連はいまだ不明瞭である。鉄キレート剤によりトランスフェリンレセプター1 の発現は亢進する一方で、DMT1 の発現が大きく変化しない事が明らかにされたが、今後更なる細胞内での詳細な代謝経路の解明が望まれる。

Nanog を阻害することで、腫瘍増殖と増大が抑制されたという報告があり、本研究の見解と合致するが、鉄キレート剤は Nanog, 以外の幹細胞性マーカーの発現も抑制しており、広範な幹細胞性の抑制効果が期待できる可能性がある。5FU とシスプラチンは幹細胞マーカーの発現を抑制できず、やはり従来の抗癌剤では癌幹細胞の治療は困難である事が示された。鉄キレート剤を既存の癌治療を組み合わせる事で腫瘍組織内の癌幹細胞の機能を抑制し、効果的な治療法となり得ると考えられた。

デフェラシロクスはデフェロキサミンと比較し、より効果的に幹細胞マーカーの発現を抑制した。これはデフェラシロクスのキレート能がデフェロキサミンと比較しより強いという報告と矛盾はない。本研究は治療抵抗性の癌幹細胞治療法開発に新たな一歩を踏み出したと考えられる。

【結論】

癌幹細胞モデルにおいて、鉄は増殖と幹細胞性の維持に不可欠である。鉄キレート剤による癌幹細胞治療は、細胞周期停止、アポトーシスの誘導を介した細胞増殖抑制効果を有するのみでなく Nanog, 山中因子と言った幹細胞マーカーの発現も低下させた。鉄キレート剤による癌幹細胞治療は新規癌幹細胞治療となり得ることを示唆している。