

# 犬および猫のがん幹細胞標的療法に関する 基礎的研究

道 下 正 貴

日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医学科 病態獣医学部門 病態解析学分野

日獣生大研報 63, 23-26, 2014.

## 背 景

近年、iPS細胞、ES細胞、組織幹細胞の研究が進展する中で、白血病や乳癌などの固形がんにおいても“がん”の根源となる“がん幹細胞”の存在が報告され、正常の幹細胞システムに類似した分化階層システムを構築すること（がん幹細胞理論）が提唱されている。がん幹細胞は、自己複製能、多分化能、免疫不全マウスにおける高い腫瘍形成能を示す細胞集団と定義され、がん発症だけでなく、がん進展、再発、転移に重要な役割を果たしている<sup>1,2)</sup>。さらに、がん幹細胞は、化学療法や放射線療法に抵抗性を示すため、がん根絶に向けて、がん幹細胞を標的とした治療戦略は必要不可欠と考えられている。ヒトでは、1997年に急性骨髄性白血病において幹細胞様の性質を示す細胞集団の存在が報告され<sup>3)</sup>、2003年以降、乳癌、グリオーマなどの固形癌においても数多く同定されてきた<sup>4,6)</sup>。それらのがん幹細胞集団は、1) sphere（浮遊細胞塊）assay, 2) がん幹細胞表面マーカー（CD44, CD24, CD133）解析, 3) 幹細胞の特性である色素排出能を利用したside population（SP）解析, 4) アルデヒド脱水素酵素（ALDH）活性を用いたaldefluor assayを用いて効率よく濃縮でき<sup>7)</sup>、これらのがん幹細胞の特性を理解することは、がん発症機構の解明だけでなく、バイオマーカーの探索、がん幹細胞を標的とした新たな治療法の開発につながるため、国際的にがん幹細胞研究は脚光を浴びている。

獣医学分野におけるがん幹細胞研究は、2008年にWilsonらが犬の骨肉腫においてがん幹細胞を初報告し<sup>8)</sup>、その後、乳癌などから数多く同定されている<sup>9,12)</sup>。しかし、犬の乳癌、リンパ腫など高頻度に発生する腫瘍では、がん細胞を標的とした抗がん剤および分子標的薬の感受性試験が中心であり、現在までにがん幹細胞を標的とした感受性試験に関する詳細な知見は報告されていない。本研究は、極めて病態進行が早く、効果的な治療法がない犬および猫の難治性がんである乳癌、肝細胞癌、横紋筋肉腫などを対象とし、それらの難治性がんの根絶に向けて、がん幹細胞

の同定・特性解析およびそれらを標的とした分子標的薬を探索・同定し、獣医医療におけるがん幹細胞標的療法の基盤を形成することである。

## がん幹細胞の同定

### 1) 犬の乳癌幹細胞の同定<sup>11,12)</sup>

犬の乳腺腫瘍は、発生頻度の高い腫瘍であり、ヒト同様に臨床上重要な腫瘍である。犬の乳腺腫瘍に対して早期における外科切除は最も有効な治療法であるが、炎症性乳癌などの外科切除適応外の症例に対して確立した治療法はない。それゆえ、乳癌幹細胞を標的とした新規治療法の開発が必要不可欠である。また、犬の乳腺腫瘍は乳腺上皮細胞の腫瘍性増殖に加え、筋上皮細胞の腫瘍性増殖および骨・軟骨形成を示し、それらの骨・軟骨の腫瘍化を高頻度に伴う特有の腫瘍である。しかしながら、乳腺腫瘍における筋上皮細胞増殖および骨・軟骨形成機構は未だ解明されていない。それゆえ、乳癌幹細胞を標的とした新規治療法の開発、犬特有の乳腺腫瘍の発症機構の解明に向けて、癌幹細胞を基盤とした研究を行った。

本研究では、sphere assay, CD44 および CD24 による表面抗原解析, SP 解析および aldefluor assay を用いて犬乳癌細胞株および外科切除乳腺腫瘍組織から乳癌幹細胞集団を分取し、幹細胞関連遺伝子の発現、免疫不全マウスへの皮下移植による腫瘍形成能、抗がん剤感受性試験を行った。

犬乳癌細胞株（CHMp, CHMm, CTBp, CNMp など）は CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>細胞集団を高い割合で含有しており、癌幹細胞に特有の増殖形態である sphere の形成を認めた。CHMp 由来の sphere 形成細胞は接着細胞に比べて、CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>細胞を濃縮し、幹細胞関連遺伝子の高発現および免疫不全マウスへの皮下移植において、高い腫瘍形成能を示した。Aldefluor 解析では、検索したすべての細胞株で ALDH<sup>+</sup>細胞が認められ、その多くは CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>細胞を含有し、sphere 形成能を示した。CHMp 由来の ALDH<sup>+</sup>細胞は免疫不全マウスの皮下移植で高い腫瘍形成

能を示した。さらに CHMm 由来の SP 細胞は非 SP 細胞に比べて高い腫瘍形成能を示した。また外科切除乳腺腫瘍の sphere 解析では、すべての症例で sphere の形成が認められた。

### 2) 犬の肝癌幹細胞の同定<sup>13)</sup>

ヒトの肝癌の発生要因の多くは、B および C 型肝炎ウイルスに伴う肝炎、肝硬変に起因しているが、犬の肝細胞癌の発生機序は未だ不明な点が多い。犬の肝細胞癌の発生頻度はまれであるが、早期の外科切除以外に効果的な治療法がない。それゆえ、犬の肝癌幹細胞の存在を明らかにし、肝癌発症機構の解明および肝癌幹細胞の標的治療法の開発を目指し、研究を遂行した。

本研究では、犬の肝細胞癌株を用いて、幹細胞マーカー CD90, CD44, CD133, CD13 の表面抗原解析を行った。次に CD90 と CD44 マーカーに着目し CD90<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> 細胞集団を分取し、sphere assay による自己複製能および超免疫不全 NOG マウスへの皮下移植による腫瘍形成能を解析した。犬肝細胞癌株は CD44 および CD29 高発現、CD90 中等度発現、CD13, CD133 低発現を示した。さらに分取した CD90<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> 細胞集団は CD90<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup> 細胞集団よりも高い自己複製能および腫瘍形成能を示した。CD13<sup>+</sup> 細胞は CD90<sup>+</sup> および CD90<sup>-</sup> 細胞中に同等に含まれていた。これらの結果から、犬の肝癌細胞においてもヒトと同様に癌幹細胞が存在することが明らかとなり、CD90 は犬の肝癌幹細胞を濃縮する有用なマーカーであることが示唆された。

### 3) 犬の肉腫幹細胞の同定

横紋筋肉腫は筋芽細胞あるいは未熟な関葉系細胞から生じる悪性腫瘍である。犬の横紋筋肉腫は舌、喉頭、心臓、膀胱等の骨格筋で発生し、頭頸部原発は予後が悪い。近年、ヒト横紋筋肉腫の根源となるがん幹細胞（肉腫幹細胞）の存在が報告され、発症機構の解明に向けて詳細な解析が行われているが、犬の横紋筋肉腫幹細胞の報告はなく、その発症機構は未だ明らかとなっていない。本研究の目的は、犬の横紋筋肉腫における肉腫幹細胞の存在を明らかにすることである。

Sphere assay を用いて犬横紋筋肉腫株 (CMSC<sup>14)</sup>, CMSJ) の sphere 形成能を評価し、成長因子 (GF) 添加 (GF+) および GF 未添加 (GF-) 培養下で形成された sphere を免疫不全マウスへ皮下移植し、腫瘍形成能を解析した。CMSC 株は成長因子の有無に関わらず sphere の形成が認められたが、CMSJ 株は GF+ 培地でのみ sphere の形成がみられた。異種移植実験では GF+ 由来の sphere 形成細胞は GF- 由来の sphere 形成細胞および親細胞株に比べて少ない細胞数で腫瘍を形成し、腫瘍容積の増大が認められた。腫瘍組織内には GF+ 培養下で sphere 形成能を有する細胞を少数含有していた。形成された腫瘍はいずれも同様の組織像を呈し、核分裂指数は GF+ 由来腫瘍

で有意に高かった。以上の結果より、犬横紋筋肉腫株は sphere 形成能を有する細胞を含有し、CMSC 株の GF+ 由来の sphere 形成細胞は高い腫瘍形成能を示し、腫瘍組織内に少数の sphere 形成能を有する細胞と有さない細胞が混在していたことより、犬横紋筋肉腫株の肉腫幹細胞が存在することが示唆された。

### 4) 猫乳癌幹細胞の同定<sup>15)</sup>

猫の乳癌は、極めて病態進行が早く、肺転移や再発するため予後が悪い。また、抗がん剤や放射線療法に抵抗性を示すため、早期の外科切除を除き、効果的な治療法がない。それゆえ、犬の乳癌と同様に、乳癌幹細胞を標的とした治療法の開発が必要不可欠である。猫乳癌におけるヒト乳癌幹細胞マーカーの有用性は評価されていないため、本研究では、フローサイトメトリー技術を用いて猫乳癌細胞株における癌幹細胞の同定を試みた。

猫乳癌細胞 8 株を用いて細胞表面マーカー (CD44, CD24) および aldefluor assay により CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> 細胞および ALDH<sup>high</sup> 細胞集団を同定した。さらに FKNp 株に着目し、ALDH<sup>high</sup> 細胞の表面抗原解析、セルソーターを用いて FKNp 株由来の ALDH<sup>high</sup> および ALDH<sup>low</sup> 細胞集団を分取し、NOG マウスへの皮下移植による腫瘍形成能を評価し、形成された腫瘍は aldefluor assay および病理組織学的に解析した。すべての乳癌細胞株中に CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> 細胞および ALDH<sup>high</sup> 細胞集団が様々な割合で認められた。NOG マウスへの皮下移植では FKNp 株由来 ALDH<sup>high</sup> 細胞は、ALDH<sup>low</sup> 細胞に比べて高い腫瘍形成能を有することが示された。ALDH<sup>high</sup> 細胞由来の腫瘍組織中には ALDH<sup>high</sup> 細胞が少数検出された。

すべての猫乳癌細胞株に乳癌幹細胞集団が存在し、FKNp 株由来の ALDH<sup>high</sup> 細胞は高い腫瘍形成能を有し、形成された腫瘍組織中にも ALDH<sup>high</sup> と ALDH<sup>low</sup> 細胞が存在することが明らかとなった。猫乳癌においてもフローサイトメトリー技術は乳癌幹細胞の分離・同定に有用であることが示唆された。

### がん幹細胞を標的とした分子標的薬の探索

犬の乳癌幹細胞の自己複製能を抑制する阻害剤を同定するために、化合物ライブラリー (333 種、文部科学省) を用いて、最終濃度 10nM, 100nM, 1 μM, 10 μM 添加時における CTBp および CNMp の sphere 形成を抑制する化合物をスクリーニングし、低濃度で sphere 形成を阻害する化合物 22 種 (PI3K/Akt/mTOR 経路セリン・スレオニンキナーゼ阻害剤, 受容体型チロシンキナーゼ阻害剤, HDAC 阻害剤, プロテアソーム阻害剤, Hsp90 阻害剤など) を同定した。現在、抽出した阻害剤の抗腫瘍効果を評価するために、がん移植モデルマウスを用いて in vivo スクリーニングを行っている。

その他に、がん幹細胞を標的とした治療法ではないが、犬の血管周皮腫および猫の乳癌を対象に VEGF を標的と

した分子標的治療薬 bevacizumab の有用性を評価している。それらのがん移植モデルマウスへの bevacizumab 投与は、新生血管の減少を介した腫瘍容積の減少を示し、抗腫瘍効果が明らかになっており、獣医医療への応用が期待できる<sup>16)</sup>。

### 今後の展開

本研究は、がん幹細胞を標的とした分子標的薬の抗腫瘍効果を細胞レベル（培養細胞）から個体レベル（がん移植モデルマウス）まで評価し、得られる成果を獣医医療へ応用することである。乳癌、肝細胞癌、横紋筋肉腫以外にも、骨肉腫、メラノーマ、肥満細胞腫、血管周皮腫など数多くの難治性がんがあり、未だ効果的な治療法は少ない。今後は、現在進行中の研究を継続するとともに、難治性がんのがん幹細胞の同定および特性解析を行い、獣医医療におけるがん幹細胞標的治療法の開発に貢献したい。

### 謝 辞

本研究成果は、著者が本学に赴任して着手し、8年間で得られたものであり、多くの方々のご指導、ご協力の賜物である。研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻いただきました高橋公正教授に深謝いたします。また研究活動の場、ご指導いただきました新井敏郎教授に深謝いたします。本研究の重要なツールである犬および猫の癌細胞株を供与いただきました佐々木伸雄教授（東京大学獣医外科学研究室）、中川貴之助教（東京大学獣医外科学研究室）、荻原喜久美講師（麻布大学）、皆上大吾講師（日本獣医生命科学大学）に深謝いたします。フローサイトメトリ解析にご協力いただきました勝本拓夫先生（国立がん研究センター研究所）、北林一生先生（国立がん研究センター研究所）、遺伝子発現解析にご協力いただきました市川仁先生（国立がんセンター研究所）、癌細胞移植実験にご協力いただいた塚田晃三准教授、末水洋志先生（実験動物中央研究所）に深く感謝いたします。最後に本研究に精力的に取り組んでくれた吉村久志君、秋吉るいさん、中澤亮太君、空元あかねさん、江崎詩織さん、町田雪乃さん、宇都達弥君、大野裕子さん、大塚綾さん、河村脩介君、菊田基君、岸本拓也君、八嶋翔子さん、中平嶺君、教室室員に感謝いたします。

### 参 考 文 献

- 1) CLARKE, M.F., DICK, J.E., DIRKS, P.B., EAVES, C.J., JAMIESON, C.H.M., JONES, D.L., VISVADER, J., WEISSMAN, I.L., WAHL, G.H. (2006). Cancer stem cell-Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cell. *Cancer Res.*, **66**, 9339-9344.
- 2) VISVADER, J.E., LINDEMAN, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: Accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Review Cancer*, **8**, 755-768.
- 3) BONNET, D., DICK, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Med.*, **3**, 730-737.
- 4) AL-HAJJ, M., WICHA, M.S., BENITO-HERNANDEZ, A., MORRISON, S.J., CLARKE, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 3983-3988.
- 5) KONDO, T., SETOGUCHI T., TAGA, T. (2004). Persistence of a small subpopulation of cancer stem-cells in the C6 Glioma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 781-786.
- 6) SINGH, S.K., HAWKINS, C., CLARKE, I.D., SQUIRE, J.A., BAYANI, J., HIDE, T., HENKELMAN, R.M., CUSIMANO, M.D., DIRKS, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, **432**, 396-401.
- 7) CHARAFE-JAUFFRET, E., MONVILLE, F., GINESTIER, C., DONTU, G., BIRNBAUM, D., WICHA, M.S. (2008). Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiol.*, **75**, 75-84.
- 8) WILSON, H., HUELSMEYER, M., CHUN, R., YOUNG, K.M., FRIEDRICH, K., ARGYLE, D.J. (2008). Isolation and characterization of cancer stem cells from canine osteosarcoma. *Vet. J.*, **178**, 69-75.
- 9) PENZO, C., ROSS, M., ELSE, M.R., ARGYLE, D.J. (2009). Effect of recombinant feline interferon- $\omega$  alone and in combination with chemotherapeutic agents on putative tumour-initiating cells and daughter cells derived from canine and feline mammary tumours. *Vet. Comp. Oncol.*, **7**, 222-229.
- 10) COCOLA, C., ANASTASI, P., ASTIGIANO, S., PISCITELLI, E., PELUCCHI, P., VILARDO, L., BERTOLI, G., BECCAGLIA, M., VERONESI, M.C., SANZONE, S., BARBIERI, O., REINBOLD, R.A., LUVONI, G.C., ZUCCHI, I. (2009). Isolation of canine mammary cells with stem cell properties and tumor-initiating potential. *Reprod. Dom. Anim.*, **44**, 214-217.
- 11) MICHISHITA, M., AKIYOSHI, R., YOSHIMURA, H., KATSUMOTO, T., ICHIKAWA, H., OHKUSU-TSUKADA, K., NAKAGAWA, T., SASAKI, N., TAKAHASHI, K. (2011). Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. *Res. Vet. Sci.*, **91**, 254-260.
- 12) MICHISHITA, M., AKIYOSHI, R., SUEMIZU, H., NAKAGAWA, T., SASAKI, N., TAKEMITSU, H., ARAI, T., TAKAHASHI, K. (2012). Aldehyde dehydrogenase activity in cancer stem cells from canine mammary carcinoma cell lines. *Vet. J.*, **193**, 508-513.
- 13) MICHISHITA, M., EZAKI, S., OGIHARA, K., NAYA, Y., AZAKAMI, D., NAKAGAWA, T., SASAKI, N., ARAI, T., SHIDA, T., TAKAHASHI, K. (2014). Identification of

- tumor-initiating cells in a canine hepatocellular carcinoma cell line. *Res. Vet. Sci.*, **96**, 315-322.
- 14) AZAKAMI, D., SHIBUTANI, H., DOHI, M., TAKASAKI, M., ISHIOKA, K., MORI, A., MOMOTA, Y., BONKOBARA, M., WASHIZU, T., MICHISHITA, M., HATAKEYAMA, H., OGASAWARA, S., SAKO, T. (2011). Establishment and characterization of canine rhabdomyosarcoma cell line CMS-C. *J. Vet. Med. Sci.*, **73**, 1105-1108.
- 15) MICHISHITA, M., OTSUKA, A., NAKAHIRA, R., NAKAGAWA, T., SASAKI, N., ARAI, T., TAKAHASHI, K. (2013). Flow cytometric analysis for detection of tumor-initiating cells in feline mammary carcinoma cell lines. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **156**, 73-81.
- 16) MICHISHITA, M., UTO, T., NAKAZAWA, R., YOSHIMURA, H., OGIHARA, K., NAYA, Y., TAJIMA, T., AZAKAMI, D., KISHIKAWA, S., ARAI, T., TAKAHASHI, K. (2013). Antitumor effect of bevacizumab in a xenograft model of canine hemangiopericytoma. *J. Pharmacol. Sci.*, **121**, 339-342.
-