

がん幹細胞の生存と抗がん剤耐性化に関わる分子機構の研究

所属機関 (財) 癌研究会癌化学療法センター
研究者名 藤田 直也

《研究の概要》

腫瘍組織中にも、正常組織と同様な幹細胞（がん幹細胞）が存在し、それらは自己を複製する能力を持つとともに、少数存在するだけで元の腫瘍組織と同様の腫瘍を形成する能力をもつことが示されてきている。さらに、がん幹細胞は抗がん剤や放射線への抵抗性を有しているため治療の際に残存しやすく、再発・転移の原因となっていると考えられている。本研究では(1)腫瘍（固形がん）に存在するがん幹細胞の分離・濃縮技術を確立し、(2)その性状を細胞内シグナル、及び細胞表面たんぱく質に着目して解析し、(3)それらを標的とするがん化学療法を確立することを目指し、以下の研究成果を得た。

DNA に結合し蛍光を発する色素である Hoechst33342 に染色されにくい画分（SP; Side Population）に正常幹細胞は濃縮されることが示されているが、我々は、多くの培養がん細胞株中にも SP 細胞が存在することを明らかにした。さらに、分離された SP 細胞は nonSP 細胞に比べ造腫瘍性が高く、SP 細胞は、*in vitro*、*in vivo*いずれにおいても抗がん剤抵抗性が高いことも見出した。この SP 細胞の抗がん剤耐性に関わる ABC トランスポーターを網羅的リアルタイム PCR により同定した。さらに、我々が創成し、現在臨床試験が進行中である ABC トランスポーター阻害剤である Dofequidar の SP 細胞に対する効果を検討した結果、Dofequidar が SP 細胞に過剰発現している ABC トランスポーターを抑制し、SP 細胞の抗がん剤抵抗性を減弱することも見出した。担がんマウスを用いた動物実験を行った結果、Dofequidar を抗がん剤と併用することで、抗がん剤単独ではなし得なかった SP 細胞由来の腫瘍を退縮させることにも成功した。

がん幹細胞の維持にも必須であることが報告されている Akt シグナルパスウェイについて、その制御機構を解析し、EGF レセプターの下流で Akt の活性化につながるシグナル伝達に必要な新規タンパク質 Aki1 を同定し、Aki1 が Akt のキナーゼである PDK1 と Akt 両方に結合し、EGF からのシグナルを伝達する足場（スキュフォールド）タンパク質として機能することを見出した。また、PDK1 に結合して PDK1 の活性を抑制する分子 TUSC-4 を同定するとともに、Akt に結合しその活性を負に制御する分子 CKIP1 を同定しその機能解析にも成功した。

SP 細胞に特異的に発現している遺伝子をマイクロアレイで解析し、SP 細胞に共通して発現上昇もしくは減少している遺伝子群を同定した。共通して発現上昇する遺伝子群の解析から、miRNA-21 が発現上昇していること、同様に発現上昇している AP-1 が miRNA-21 の発現充進の原因であること、さらには miRNA-21 が SP 細胞における抗がん剤抵抗性獲得に関与していることを見出した。

本研究において、がん幹細胞のモデルとして SP 細胞を利用し、SP 細胞が治療抵抗性を獲得するメカニズムおよび、それを標的とした治療法として、Dofequidar の併用による抗がん剤感受性化ができることを見出した。また、がん細胞の生存をつかさどる AKT シグナルパスウェイの制御機構を明らかにした。このことは、今後の新たながんの治療標的とし

て大変有用な発見であり、今後の応用が強く期待できる。

藤田 直也	(財) 癌研究会癌化学療法センター 基礎研究部・部長	研究の総括、発現プラスミドの構築
片山 量平	(財) 癌研究会癌化学療法センター 基礎研究部・研究員	がん幹細胞の分離、抗がん剤耐性に関わる分子の検証
芳賀 直実	(財) 癌研究会癌化学療法センター ゲノム研究部・研究員	cDNA マイクロアレイを用いたがん幹細胞に特異的に発現している遺伝子の探索

研究報告

I 研究目的

がん治療における問題点の1つに「再発」が挙げられる。抗がん剤や放射線治療に抵抗性のがん細胞が元々存在するために、治療により一度縮小しても、その後数年～数十年かけて抵抗性を示すがん細胞が再増殖することが再発の大きな理由の一つとして考えられている。がん組織中には多分化能と自己複製能をあわせ持つ“がん幹細胞”が存在し、このがん幹細胞が抗がん剤や放射線治療に抵抗性を示すために再発が生じるという仮説が提唱されている。白血病細胞では古くよりがん幹細胞の存在が証明されていたが、がん幹細胞の研究が世界的に進められている現在では、固形がんにもがん幹細胞が存在する可能性が示されつつある。再発を阻止するより効果的な治療法開発のためには、がん幹細胞特異的な分子標的の同定が不可欠である。しかしながら、固形がんにおけるがん幹細胞の濃縮方法は十分に明らかになっておらず、そのためその性状も一部を除いてほとんど分かっていない。そこで、本研究では、がん幹細胞の性状解析をするためにヒト各種がん組織より樹立された培養細胞株をモデルとして用い、その中のがん幹細胞様画分を濃縮・分離し性状解析を行い、各細胞株間のがん幹細胞画分に共通した変化を示す因子を探索し、さらにそれらを標的とした治療法の確立を目標とした。

これまでの先行研究から、がん細胞の生存に重要な働きをしている AKT シグナルパスウェイが、がん幹細胞においても、その維持と増殖に必須の働きをしていることが示されている。Akt シグナルパスウェイの中心をつかさどる分子 Akt は、細胞の生存シグナルのハブとなっているセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞表面に存在するレセプター型チロシンキナーゼになどより伝えられたシグナルを媒介し、様々な分子（基質）のセリン／スレオニン残基をリン酸化することで下流にシグナルを伝達している。Akt の基質としては p27^{Kip1} や Bax など様々なものが報告されているが、Akt 自身の活性制御については、自身の2か所のセリン／スレオニン残基が上流のキナーゼによりリン酸化されることで制御されているということは明らかであるが、その詳細はまだ不明な点も多い。また、Akt シグナルパスウェイはがん細胞の生存にかかわるばかりでなく、生体にとっては、糖代謝をつかさどるシグナルであることから、その阻害は、がん細胞に細胞死を誘導すると共に、糖代謝異常の副作用も誘発してしまう。このことから、Akt の活性制御機構を明らかにし、特に、がんにおいて異常に活性化するメカニズムを明らかにすることが、新たながん治療

の標的を見出すことにつながると考えられる。そこで我々は、本研究において、Akt の活性制御機構を詳細に解析することを目的とした。

本研究における具体的達成目標は以下の通りである。

1. がん幹細胞の濃縮方法の探索と性状解析
2. がん幹細胞特異的に発現している遺伝子に関する研究
3. がん幹細胞の薬剤排出ポンプに関する研究
4. 薬剤排出ポンプ阻害剤のがん幹細胞標的治療への応用
5. がん幹細胞におけるシグナル伝達解析

II 研究計画および材料と方法

以下に研究材料と方法の概略を述べるが、動物実験に関しては、(財) 癌研究会の動物実験等取扱規程に従って行なわれ、遺伝子組換え実験は (財) 癌研究会の遺伝子組換え実験安全規程に従っておこなわれ、適切な拡散防止措置が取られるなど、十分な倫理面への配慮のもと遂行された。

1. がん幹細胞の分離と性状解析

がん幹細胞を患者由来のがん組織から濃縮・分離する方法も一般的には多く用いられているが、個人差が大きいこと、腫瘍組織の状態により、ばらつきが大きくなることから、本研究では乳がんを中心にヒト腫瘍組織より樹立されたがん細胞株約 20 種を用い検討した。造血幹細胞の濃縮方法として見出された蛍光色素 Hoechst33342 の排出能力の高い画分 (Side Population) を分画する方法を試みた。その結果、多くの腫瘍組織において SP 細胞の存在が認められた。そこで SP 細胞ががん幹細胞様の性質を示すかどうかを明らかにするために、次の 3 つの点について検討した。

(1) 自己複製能力、(2) 治療 (化学療法) への抵抗性、(3) 造腫瘍性

2. がん幹細胞特異的に発現している遺伝子に関する研究

乳がんを中心としたがん細胞株より分離した SP 細胞を用いた解析から、いくつかのがん細胞株において SP 細胞中にごん幹細胞が濃縮されることを見出した。そこで SP 画分に特異的に発現上昇・減少する遺伝子を、マイクロアレイを用いて検討した。乳がんを中心に 4 つの細胞より SP 細胞、nonSP 細胞を分離し、定法に従い Affimetrix 社の HumanGenome U133 Plus 2.0 Array を用いて発現解析を行い、SP 細胞で共通して発現変化する因子を抽出し、定量リアルタイム PCR 法にてその発現変化を確認した。発現変化のみられた遺伝子の中で、マイクロ RNA に着目し、解析を進めた。また、その他に共通して発現上昇のみられる転写因子、シグナル伝達分子に着目し解析を進めた。

3. がん幹細胞の薬剤排出ポンプに関する研究

主に細胞膜上に発現し、抗がん剤などの薬剤を ATP 依存的に細胞外へと排出機能を持つ ABC トランスポーターは、その過剰発現によりがん細胞が抗がん剤抵抗性を有することが知られている。この ABC トランスポーターはヒトでは 48 種類が存在し、生体にとって不要な物質の輸送や、肝臓でのビリルビン排出、脂質輸送など、それぞれがさまざまな基質を輸送している。がんでは、P 糖たんぱく質とよばれる ABCB1 や ABCC1、ABCG2 の過剰発現

がよく知られており、その解析が進んでいる。SP 細胞では、その蛍光色素 Hoechst に染まりにくい性質を有する原因として、造血幹細胞では ABCG2 が過剰発現しているためであることが、明らかとなっている。ABC トランスポーターは、それほど mRNA レベルでの発現量が高くないものも多いため、マイクロアレイでは定量検出限界以下のものも多くあった。そこで、より感度の高い定量 RT-PCR 法を用いて網羅的に 48 種類の ABC トランスポーターの発現を検討した。

マイクロアレイで用いた 4 細胞株に加え、さらに 5 細胞株を追加し、乳がんを中心とした 9 細胞株から SP 細胞、nonSP 細胞を分離し、定量 PCR 法にて 48 種類の ABC トランスポーターの発現を比較し、SP 細胞で共通して発現上昇するものを同定し解析した。

4. 薬剤排出ポンプ阻害剤のがん幹細胞標的治療への応用

複数の細胞株において共通して SP 細胞に過剰発現する ABC トランスポーターを標的とした阻害剤を抗がん剤と併用することでがん幹細胞様がん細胞にも細胞死を誘導できるのではないかと考え、種々の ABC トランスポーター阻害剤を検討した。その結果見出した阻害剤 Dofequidar について、*in vitro*、*in cell* でトランスポーター阻害活性を検証し、SP 細胞をヌードマウスに移植した実験系で、抗がん剤感受性化について検討した。

5. Akt シグナル伝達系によるがん幹細胞の抗がん剤耐性化・生存促進機構解明のための基礎的研究

がん幹細胞の維持、増殖にも必須のシグナル伝達分子として知られる Akt シグナルパスウェイの活性制御機構を明らかにするための基礎的研究として以下の取り組みを行った。Akt の活性制御領域に結合するたんぱく質、Akt のスレオニン 308 残基をリン酸化することでその活性を正に制御する分子 PDK1 に結合するたんぱく質を、大腸菌を用いた two-hybrid screening 法により探索・同定した。その結果、Akt に結合する新規タンパク質として CKIP1 をはじめ複数同定し、PDK1 に結合する分子として Aki-1、TUSC4 をはじめ複数同定した。そのなかで、Akt シグナルの活性変化を引き起こした CKIP-1、Aki-1、TUSC4 について、それぞれ解析を行った。

生化学的解析、細胞生物学的解析を定法に則って行い、後述するような新しい Akt シグナル活性制御機構を見出した。

III 研究成果

本研究により、以下に示すような研究成果を得た。

1. がん幹細胞の分離と性状解析

乳がんを中心に約 20 種のがん細胞株を用いて SP 細胞の有無を調べた結果、多くのがん細胞株中にも SP 細胞が存在することを見出した。SP 細胞ががん幹細胞様の性質を有するかどうかを調べたところ、SP 細胞からは SP 細胞と nonSP 細胞の両方が効率よく出現するのに対し、nonSP 細胞からは SP 細胞はほとんど見られず、SP 細胞が自己複製能のある集団であることが確認できた。さらに、ヌードマウスの皮下に移植する実験から、SP 細胞からは極少数の細胞数でも腫瘍形成能力があり、造腫瘍性の高いがん幹細胞が濃縮されていることが示唆された。また HeLa 細胞では、SP、nonSP いずれも、たった 100 個の細胞を皮下に植えるだけで腫瘍を形成したがその増殖速度は SP 細胞のほうが著しく速く、より悪性の高い細胞が SP 細胞には濃縮されることが明らかとなった。また、SP 細胞は nonSP 細胞

に比べ、様々な抗がん剤に対し抵抗性を示した。このことは、HeLa 細胞由来の SP または nonSP 細胞を少数移植して形成した腫瘍を用いた実験でも、SP 由来の腫瘍が抗がん剤 (CPT-11) 耐性を示すことが明らかとなった。

乳がんにおけるがん幹細胞は CD24^{-/low}、CD44^{high} 画分に存在するとの報告があるので、CD24、44 抗体による分離と解析を、乳がん細胞株 9 種を用いて行った。その結果、細胞株では、細胞表面マーカー CD24、44 の発現については、細胞株ごとにほぼ単一の集団であった。そのほぼ単一の細胞集団の中で、比較的マーカー発現の高いもの、低いもので分離したが、抗がん剤感受性に差は見られず、また、どちらの集団からも両方の集団が出現してくるという結果になり、細胞株では、細胞表面マーカー CD24、44 を用いた分離によるがん幹細胞の濃縮は出来なかった。

2. がん幹細胞特異的に発現している遺伝子に関する研究

SP 分画法によりがん幹細胞様細胞の濃縮ができたことから、SP 細胞特異的に発現する遺伝子を明らかにするために SP 細胞を複数の細胞株より分離し、マイクロアレイを用いて網羅的解析を行い、SP 細胞でがん細胞株間を越えて共通して発現上昇、減少している遺伝子を同定した。同定した遺伝子群の SP における機能について解析を進めるにあたり、特に我々が注目したものの 1 つが microRNA である。microRNA は 22 塩基程度の RNA で主にメッセンジャー RNA (mRNA) の 3' 非翻訳領域にある相同性の高い配列に結合し、そのターゲット蛋白質の翻訳を抑制したり、時には mRNA の分解を促進したりする。近年、microRNA などの機能性 RNA が次々と発見されその機能が少しずつ明らかにされてきている。がん研究の分野においても、多くの microRNA の関与が明らかにされてきており、microRNA をターゲットとしたがん治療への期待も高まってきている。発現解析より SP において高発現が認められた miRNA-21 は、がんの転移や悪性にも関与することがこれまでに報告されているが、これまでがん幹細胞との関与について報告はなかった。我々は、SP で高発現していた miRNA-21 について解析を進め、SP 細胞において、この miRNA-21 を転写亢進する転写因子 AP-1 が発現亢進しており、それにより発現上昇した miRNA-21 が細胞死を促進する因子の発現を低下させていることを見出した。SP 細胞にこの転写因子の阻害剤や miRNA-21 に相補的なオリゴ (miR-21 LNA) を処理することで SP 細胞の抗がん剤抵抗性が減少した。

3. がん幹細胞の薬剤排出ポンプに関する研究

SP 細胞は Hoechst33342 排出能力の差によって分取していることから、Hoechst 排出に関与し、SP 細胞で高発現している ABC トランスポーターを同定することを試みた。ヒトには 48 種類の ABC トランスポーターが存在する。それらを網羅的に定量 PCR 法により解析した。乳がんに加え、大腸がん、子宮頸がん細胞株からも SP 細胞および nonSP 細胞を分画し、リアルタイム RT-PCR を行った結果、これまでの造血幹細胞での報告どおり Hoechst の排出に関わるとされる ABCG2 については、いずれの SP 細胞でも過剰発現が認められたが、我々はさらにいくつかの他のトランスポーターが SP 細胞で過剰発現していることを見出した。これらのトランスポーターは、新規がん幹細胞マーカーとなりうる可能性がある。新たに SP 細胞での過剰発現を見出した ABC トランスポーターの 1 つは、ABCC2 (MRP2) であり、この過剰発現により、シスプラチンへの抗がん剤抵抗性が認められ、逆に ABCC2 を

ノックダウンすることでシスプラチンに感受性化した。SP 細胞で ABCC2 が過剰発現するメカニズムを明らかにするために、マイクロアレイで同定した発現変化している遺伝子から、解析を進めた結果、SP 細胞で発現上昇の見られたシグナル伝達分子（リガンド）を処理することで、ABCC2 の発現が上昇することを見出した。現在その下流と ABCC2 発現上昇を結びつける転写因子等を探索している。

4. 薬剤排出ポンプ阻害剤のがん幹細胞標的治療への応用

Hoechst 排出に関わり、SP 細胞で高発現している ABC トランスポーターを阻害することで SP 細胞も抗がん剤感受性化できるのではないかと考え、種々の ABC トランスポーター阻害を用い、Hoechst33342 排出能の阻害活性を調べた。その結果、Dofequidar が SP 細胞の Hoechst 排出能力を阻害することを見出した。Dofequidar は我々がこれまでに研究開発してきたキノリン誘導体の低分子化合物であり、現在までに進行・再発乳がん患者を対象とした第 III 相臨床試験まで進んでいる。Dofequidar はもともと、P 糖タンパク質として知られる ABCB1、そして ABCC1 の阻害剤として開発が進められてきた。そこで、Dofequidar の併用により、SP 細胞の抗がん剤感受性化が出来るか検討したところ、Dofequidar を併用することで、CPT-11 に対し治療抵抗性を示した HeLa 細胞の SP 画分由来の腫瘍も感受性化できることが示された。HeLa の SP 細胞では ABCB1、ABCC1 の過剰発現は見られず、ABCG2 の過剰発現が認められたことから、Dofequidar が、ABCB1、C1 に加えて ABCG2 をも阻害できるのではないかと予測し検討した結果、*in vitro vesicle assay*、*in cell* での抗がん剤感受性試験などから、Dofequidar は新たに、ABCG2 をも阻害する能力があることを見出した。そこで、Dofequidar により、SP 細胞の抗がん剤感受性化ができるかどうかを、培養細胞と、HeLa の SP 細胞を移植して作成した Xenograft モデルを用いて検討した。その結果、Dofequidar の併用により、SP 細胞の抗がん剤抵抗性は nonSP 細胞と同程度まで回復できることを明らかにした。これまで、Dofequidar は抗がん剤の作用増強剤として考えられ開発されてきたが、腫瘍中の残存しがちながん幹細胞に対しても細胞死を誘導できるとことが示唆されたことから、薬剤耐性化したがんに限らず、Dofequidar はネオアジュバント療法など初回治療から積極的に使っていける可能性があることを示したと言える。

5. Akt シグナル伝達系によるがん細胞の抗がん剤耐性化・生存促進機構解明のための基礎的研究

白血病幹細胞の研究から、Akt シグナルパスウェイの活性化ががん幹細胞にとって必要であり、そのこと（Akt の過剰活性化）が、がん幹細胞と、正常組織幹細胞との違いであることが報告されている。そこで、我々は、Akt の活性制御機構に着目して基礎研究を行い、以下のような結果を得た。

(1) CKIP-1 の同定とその機能解析

Akt の細胞膜リン脂質結合領域である PH ドメインを bait とし、大腸菌を用いた two-hybrid system によるスクリーニングを行った結果、新規 Akt 結合たんぱく質として CKIP-1 (casein kinase-interacting protein-1) を同定した。CKIP-1 は casein kinase 2 の結合たんぱく質として同定されたたんぱく質であるが、CKIP-1 に関する論文は少なく、その機能はほとんど明らかになっていない。そこで、CKIP-1 の Akt に対する機能を調べた。ま

ず結合実験から CKIP-1 は内在性 Akt と結合することを見出し、さらにその結合領域を同定した。CKIP-1 と Akt を細胞に過剰発現させたところ、Akt の活性化に必須である 308 番目のスレオニンと 473 番目のセリンのリン酸化が減少しており、CKIP-1 が Akt と結合し Akt の活性を抑制していることが示唆された。CKIP-1 による Akt の活性抑制の様式を調べた結果、CKIP-1 には Akt と同様にリン脂質結合能をもつ PH ドメインを有しており CLIP-1 は N 端側領域で Akt と結合し、自身の LZ ドメインで多量体を形成することにより、Akt が PH ドメインを介してリン脂質に結合することを阻害し、細胞膜リン脂質近傍で起こるとされる Akt の活性化を阻害していることが示された。また、CKIP-1 をがん細胞株に恒常的に強制発現させると、Akt の活性化が減少し、腫瘍の増殖能が減少し、さらに抗がん剤に対して感受性化することが明らかになった。

(2) Aki-1 の同定とその機能解析

大腸菌を用いた two-hybrid screening 法により新規 PDK1 結合タンパク質を探索しあらたに Aki-1 を同定した。Aki-1 は機能に基づく名前がつけられていなかったため、我々が Aki1 [Akt kinase (PDK1)-interacting protein 1] と命名した。結合実験から Aki1 は内在性 PDK1 と結合することを見出し、さらにその結合領域を同定した。siRNA を用いて Aki1 をノックダウンすると、増殖因子である epidermal growth factor (EGF) 刺激時の PDK1 による AktT308 のリン酸化および Akt の kinase 活性が抑制された。種々の解析の結果から Aki1 の機能として、PDK1 による AktT308 リン酸化を (PDK1 のキナーゼ活性には影響せずに) 促進していることを見出した。逆に EGF 刺激下で Aki1 を過剰発現させると興味深いことに、発現させた Aki1 の量が増えるにつれて AktT308 のリン酸化レベルは上昇した後、減少に転じた。このような 2 相性の挙動は、足場タンパク質を過剰発現させた時に見られる現象として知られており (MAPK 経路における足場タンパク質 KSR など)、Aki1 も足場タンパク質として機能する可能性が考えられた。そこで、免疫沈降法で Aki1 と Akt との結合を検討すると、Aki1 は EGF 刺激依存的に Akt とも結合した。さらに、Aki1 を発現させると PDK1 と Akt の結合が増強された。これらの結果から、Aki1 は PDK1 の基質の中でも Akt に選択的に結合し、両者の相互作用を促進していることが示唆された。以上より、Aki1 が PDK1 と Akt の足場タンパク質として機能し、PDK1 による Akt の選択的な活性化を促していることを明らかにした。

(3) TUSC4 の同定とその機能解析

Aki-1 以外にも我々は大腸菌を用いた two-hybrid screening 法により新規 PDK1 結合タンパク質として TUSC4 (Tumor suppressor candidate 4) を同定した。結合実験から TUSC4 は内在性 PDK1 と結合することを見出し、さらにその結合領域を同定した。TUSC4 は肺がんにおいて高頻度に欠失した領域に存在するがん抑制因子の候補として同定されたタンパク質であるが、TUSC4 に関する論文は少なく、その機能はほとんど明らかになっていない。我々は、TUSC4 の過剰発現により、PDK1 による AktT308 リン酸化を抑制することを見出した。PDK1 はがん原遺伝子 Src によりチロシン残基をリン酸化されることで活性化し、その下流をリン酸化するが、TUSC4 は Src、PDK1 と結合し、Src による PDK1 チロシンリン酸化を強く阻害することで、下流へのシグナル伝達を減弱することを見出した。TUSC4 をがん細胞株に恒常的に強制発現させると、PDK1 による AktT308 リン酸化や PDK1 の下流の S6K の T412 リン酸化が減少し下流シグナルが減弱した。TUSC4 を発現した腫瘍は増殖能が減少し、

さらに抗がん剤に対して感受性化することも明らかになった。今後、がん幹細胞とこれらの因子との関係についてさらに研究を深めていく必要がある。

IV 考察

本研究から、多くのがん細胞株中にも Hoechst33342 排出能力の高い SP 細胞が存在し、それらががん幹細胞様性質を有していることを明らかにした。我々は、乳がん細胞株を中心に SP 細胞の性状解析を行い、SP 細胞で高発現する遺伝子群を同定した。複数の細胞株由来の SP 細胞で共通した発現変化の見られる遺伝子群を同定し、中でも、近年注目されている機能性 RNA について解析を進め、発現上昇機構ならびに、抗がん剤抵抗性への寄与を明らかにした。本研究で同定した機能性 RNA は、これまでに各種がんにおいて、がん細胞での高発現が報告されており、予後不良と正の相関を示すことが知られている。このことから、がん幹細胞でこの機能性 RNA が上昇することで、がん幹細胞がより治療抵抗性を獲得するのに寄与していると考えられる。

さらに我々は、抗がん剤抵抗性に深く関わる ABC トランスポーターの発現を網羅的に解析し、SP 細胞において過剰発現する ABC トランスポーターを同定した。我々がこれまで開発してきた ABC トランスポーター阻害剤 Dofequidar により、抗がん剤抵抗性を有する SP 細胞を抗がん剤感受性化できることを *in cell*、*in vivo* の系により証明した。このことから、Dofequidar などの ABC トランスポーター阻害剤はこれまで、再発がんなどの薬剤耐性化したがんに対する治療法として、主に開発されてきたが、本研究から、初回治療から積極的に併用していくことで、既に最初から存在すると考えられるがん幹細胞にも抗がん剤感受性化ができ、高い治療効果が得られると考えられる。実際に、Dofequidar の第三相臨床試験結果をみると、前治療歴のない患者でのサブグループ解析において、抗がん剤単独に対して Dofequidar の併用群で顕著に無増悪生存期間および、生存期間の延長が認められている。また、本研究で同定した、SP 細胞で過剰発現する ABC トランスポーターの発現制御シグナルを標的とするによっても、抗がん剤感受性化が出来ると期待される。この発現性制御シグナルは、近年の報告から、脳腫瘍幹細胞の自己複製に必須なシグナルであることが報告されており、このシグナルが、乳がんにおいても、がん幹細胞の維持だけでなく、抗がん剤抵抗性付与にも寄与していることが予想される。

本研究において、我々は、がん幹細胞で重要な働きをしていることが報告されている Akt シグナルパスウェイを制御する因子を複数同定した。すなわち、Akt をリン酸化することで活性化する PDK1 を負に制御する TUSC4、PDK1 から Akt へのシグナル伝達を足場となって促進する Aki-1、そして Akt の膜移行を制御することで活性化を負に制御する CKIP-1 を同定した。本研究の結果、PDK1-Akt の活性が幾重にも制御されていることが明らかになってきた。これらの研究をさらに進展させていくことで、がん幹細胞で破綻している Akt 活性制御機構を見出すことができる可能性があり、それが、新しい分子標的治療へとつなげていける可能性が示された。

最後に、本研究事業に貴重なご支援を賜りました、財団法人車両競技公益資金記念財団に深く感謝申し上げます。

V 研究成果の発表

1. Tokuda E, Fujita N, Oh-hara T, Sato S, Kurata A, Katayama R, Itoh T, Takenawa T, Miyazono K, and Tsuruo T. Casein kinase 2-interacting protein-1, a novel Akt Pleckstrin homology domain-interacting protein, down-regulates P13K/Akt signaling and suppresses tumor growth *in vivo*. **Cancer Res**, 67: 9666-9676, 2007.
2. Kunita A, Kashima TG, Morishita Y, Fukayama M, Kato Y, Tsuruo T, and Fujita N. The platelet aggregation-inducing factor Aggrus/podoplanin promotes pulmonary metastasis. **Am J Pathol**, 170: 1337-1347, 2007.
3. Kamo N, Yasuchika K, Fujii H, Hoppo T, Machirnoto T, Ishii T, Fujita N, Tsuruo T, Yamashita JK, Kubo H, and Ikai I. Two populations of Thyl-positive mesenchymal cells regulate the in vitro maturation of hepatic progenitor cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 292: G526-G534, 2007.
4. Rosner M, Freilinger A, Hanneder M, Fujita N, Lubec G, Tsuruo T, and Hengstschlager M. p27^{Kip1} localization depends on the tumor suppressor protein tuberin. **Hum Mol Genet**, 16: 1541-1556, 2007.
5. Bouchard V, Demers MJ, Thibodeau S, Laquerre V, Fujita N, Tsuruo T, Beaulieu JF, Gauthier R, Vezina A, Villeneuve L, and Vachon PH. Fak/Src signaling in human intestinal epithelial cell survival and anoikis: Differentiation state-specific uncoupling with the P13-K/Akt-1 and MEK/Erk pathways. **J Cell Physiol**, 212: 717-728, 2007.
6. Kurata A, Katayama R, Watanabe T, Tsuruo T, Fujita N. TUSC4/NPRL2, a novel PDK1-interacting protein, inhibits PDK1 tyrosine phosphorylation and its downstream signaling. **Cancer Sci**, 99: 1827-1834, 2008.
7. Morishita D, Katayama R, Sekimizu K, Tsuruo T, and Fujita N. Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27^{Kip1} at the transcriptional and post-transcriptional levels. **Cancer Res**, 68: 5076-5085, 2008.
8. Nakazawa Y, Sato S, Naito M, Kato Y, Mishima K, Arai H, Tsuruo T, and Fujita N. Tetraspanin family member CD9 inhibits Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and suppresses pulmonary metastasis. **Blood**, 112: 1730-1739, 2008.

9. Nakasaki T, Tanaka T, Okudaira S, Hirosawa M, Umemoto E, Otani K, Jin S, Bai Z, Hayasaka H, Fukui Y, Aozasa K, Fujita N, Tsuruo T, Ozono K, Aoki J, and Miyasaka M. Involvement of the lysophosphatidic acid-generating enzyme autotaxin in lymphocyte-endothelial cell interactions. **Am J Pathol**, 173: 1566-1576, 2008.
10. Nakamura A, Naito M, Tsuruo T, and Fujita N. Freud-1/Aki1, a novel PDK1-interacting protein, functions as a scaffold to activate the PDK1/Akt pathway in epidermal growth factor signaling. **Mol Cell Biol**, 28: 5996-6009, 2008.
11. Bouchard V, Harnois C, Demers MJ, Thibodeau S, Laquerre V, Gauthier R, Vezina A, Noel D, Fujita N, Tsuruo T, Arguin M, and Vachon PH. β 1 integrin/Fak/Src signaling in intestinal epithelial crypt cell survival: integration of complex regulatory mechanisms. **Apoptosis**, 13: 531-542, 2008.
12. Katayama K, Nakamura A, Sugimoto Y, Tsuruo T, and Fujita N. FOXO transcription factor-dependent p15^{INK4b} and p19^{INK4d} expression. **Oncogene**, 27: 1677-1686, 2008.
13. Tsuruo T, and Fujita N. Platelet aggregation in the formation of tumor metastasis. **Proc Jpn Acad, Ser B**, 84: 189-198, 2008.
14. Demers MJ, Thibodeau S, Noel D, Fujita N, Tsuruo T, Gauthier R, Arguin M, and Vachon PH. Intestinal epithelial cancer cell anoikis resistance: EGFR-mediated sustained activation of Src overrides Fak-dependent signaling to MEK/Erk and/or P13-K/Akt-1. **J Cell Biochem**, 107: 639-654, 2009.
15. Tanaka H, Hoshikawa Y, Oh-hara T, Koike S, Naito M, Noda T, Arai H, Tsuruo T, and Fujita N. PRMT5, a novel TRAIL receptor-binding protein, inhibits TRAIL-induced apoptosis via NF- κ B activation. **Mol Cancer Res**, 7: 557-569, 2009.
16. Katayama R, Koike S, Sato S, Sugimoto Y, Tsuruo T, and Fujita N. Dofequidar fumarate sensitizes cancer stem-like side population cells to chemotherapeutic drugs by inhibiting ABCG2/BCRP-mediated drug export. **Cancer Sci**, 100: 2060-2068, 2009.
17. Nakamura A, Arai H, and Fujita N. Centrosomal Aki1 and cohesin function in separase-regulated centriole disengagement. **J Cell Biol**, 187: 607-614, 2009.
18. Katayama R, Ishioka T, Takada S, Takada R, Fujita N, Tsuruo T, and Naito M. Modulation of Wnt signaling by the nuclear localization of cellular FLIP-L.

J Cell Sci, 123: 23-28, 2010.

19. Peterfy M, Harris TE, Fujita N, and Reue K. Insulin-stimulated interaction with 14-3-3 promotes cytoplasmic localization of lipin-1 in adipocytes. **J Biol Chem**, 285: 3857-3864, 2010.
20. Nakamura A, Naito M, Arai H, and Fujita N. Mitotic phosphorylation of Akil at Ser208 by cyclin B1-Cdk1 complex. **Biochem Biophys Res Commun**, 393: 872-876, 2010.
21. Misawa A, Katayama R, Koike S, Tomida A, Watanabe T, and Fujita N. AP-1-dependent miR-21 expression contributes to chemoresistance in cancer stem cell-like SP cells. **Oncol Res**, In press, 2010.
22. Haga N, Saito S, Tsukumo Y, Sakurai J, Furuno A, Tsuruo T, and Tomida A. Mitochondria regulate the unfolded protein response leading to cancer cell survival under glucose deprivation conditions. **Cancer Sci**, In press, 2010.
23. Morishita D, Takami M, Yoshikawa S, Katayama R, Sato S, Kukimoto-Niino M, Umehara T, Shirouzu M, Sekimizu K, Yokoyama S, and Fujita N. Cell-permeable carboxy-terminal p27^{Kip1} peptide exhibits anti-tumor activity by inhibiting Pim-1 kinase. Submitted.