がん幹細胞のニッチの形成と制御

大阪大学微生物病研究所・情報伝達分野

高倉 伸幸*

Formation and Regulation of niche for cancer stem cells

Cancer has cancer stem cells (CSCs) which can self-renew and produce a lot of cancer cells. CSCs are malignant cells showing resistance against usual cancer therapy and higher invasive and metastatic behaviors. Blood vessels provide a niche that supports self-renewal of stem cell populations in normal organs. This role also extends to the field of cancer biology. CSCs have been implicated in hematological and solid cancers. Identification of these cells and their niche is critical for elucidating molecular targets to inhibit their growth and to destroy their niche. For this purpose, sorting of living CSCs is required to monitor their presence in the presumptive niche in order to establish whether a CSC candidate actually shows malignant features.

がん細胞はがん幹細胞により構築されることが明らかにされてきた。幹細胞が自己複製や未分化性を維持する領域は“幹細胞ニッチ”と呼ばれ、いわゆる幹細胞にとっての生態学的な適所を提供する。ニッチは細胞毒性のある薬剤や物質から幹細胞を防御する盾としての機能を有することから、がん幹細胞のニッチの破壊によるがん幹細胞治療法が考慮されつつある。近年、このようながん幹細胞の生態学的適所を提供する微小環境のひとつとして、血管領域が示唆されてきており、また血管領域での幹細胞性因子の探索が行われつつある。

Nobuyuki Takakura*

Keywords: cancer stem cell, vascular niche, endothelial cell, mural cell

正常組織における幹細胞ニッチ

組織形成の中心を担う幹細胞に関しては、その動態の解明が再生医療、炎症やがんに対する治療への応用に直結することから、幹細胞の自己複製、未分化性維持に関する研究が旺盛に進められてきている。幹細胞性の維持に関しては、単にその細胞だけで自立しているのか？あるいは他の細胞との相互作用により幹細胞性を維持しているのか？が問われてきたが、現在では後者の、“他の細胞との相互作用の上に幹細胞性は成立する”と考える研究者が圧倒的に多いであろう。それはたとえ幹細胞を単離できても、その細胞だけで、未分化性を維持したまま継続的に培養することができないことに由来する。

これまで種々の臓器や器官において、正常組織特

有の幹細胞がどこに局在しているのかに関して解析が進められてきた¹⁾。中でも、ほ乳類の正常組織の幹細胞ニッチは、その表現型が比較的明確になっている造血幹細胞研究において先行して明らかとされてきた。マウスでは、胎生 9.5 日目の臍腸間膜動脈の内腔面で、血管内皮細胞に接する様式で、造血幹細胞が自己複製する現場が観察される。そして、この幹細胞のニッチ形成（この場合、造血幹細胞の血管内皮細胞への直接的な接着）には、造血幹細胞に発現するレセプター型チロシンキナーゼである Tie2 受容体の活性化を介した、インテグリンの活性化が必要であることを筆者らは証明している²⁾。このような血管領域での造血幹細胞の局在は、胎生中期の背側大動脈や、胎盤の血管領域にも観察される、また肝臓においても血管領域で造血幹細胞がクラスターを形成しているのが観察される。しかしながら、出生前後、造血幹細胞は骨髓に移動し、造血は骨髓内で営まれるが、骨髓においては二つのニッ

* Department of Signal Transduction, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

チ領域が存在することが明らかになってきた。一つは骨膜に接着する骨芽細胞領域の骨芽細胞ニッチである^{3,4)}。骨芽細胞ニッチでは、造血幹細胞は休眠状態となることが示唆されているが、これは造血幹細胞上の Tie2 が強く活性化を受け、骨芽細胞と N-cadherin などを通じて、強固に接着することによって報告されてきた。Bone morphogenetic protein (BMP) の受容体である BMP type 1 受容体を欠損させると、N カドヘリンを発現する骨芽細胞の増殖が誘導される。そうすると、造血幹細胞の絶対数も骨髄内で増加する³⁾。したがって、元来骨芽細胞ニッチは、造血幹細胞のプールサイズを規定して、無秩序な幹細胞の増殖を抑制する機能を有すると考えられる。一方、骨髄における造血幹細胞のもう一つのニッチが血管領域であり、骨髄に特徴的な洞様血管近傍に造血幹細胞の局在が観察される。洞様血管では、血管内皮細胞近傍の細網細胞 (reticular cell) がケモカインである CXCL12/SDF1 を産生して造血幹細胞を動員することが示唆されている⁵⁾。造血幹細胞と血管内皮細胞の直接の接着に関しては不明であるが、実際骨髄洞様血管内皮細胞上での造血幹細胞の増殖も報告されており、成体においても、胎児と同様に、血管ニッチが造血幹細胞の自己複製領域として同定されてきた (図 1)⁶⁾。

幹細胞の幹細胞性の維持におけるニッチ細胞の役割

骨髄における造血の状況証拠からは、骨芽細胞が幹細胞の休眠化を誘導し、血管内皮細胞 (あるいは血管系細胞) が自己複製を誘導するという印象が持たれる。しかし、これは単に状況であって、実際に骨芽細胞であれ、内皮細胞であれ、造血幹細胞の自己複製あるいは分化の両方とも誘導できるのではないかと考えられる。

筆者らは、幹細胞の分化と自己複製の制御の振り分けにおけるニッチ細胞の果たす役割として、M-CSF 自然欠損マウス (OP/OP) の頭蓋冠由来骨芽細胞株である OP9 細胞をストロマ細胞として用いた培養系を開発してきた。一般的にどのようなほ乳類細胞も試験管内で維持するためには、牛血清や種々の成長因子の添加が必要である。ストロマ細胞が維持される条件で造血幹細胞を培養すると、スト

図1 幹細胞の生態学的適所である血管ニッチの概念図

幹細胞は血管領域で自己複製が誘導されたと考えられてきた。血管ニッチの構成細胞としては、血管細胞 (内腔の内皮細胞とそれを基底膜側で裏打ちする壁細胞) とそれを被覆する細胞外マトリックスがあげられるが、特にがん幹細胞ニッチにおいては血管近傍の筋線維芽細胞も重要な構成細胞である。このようなニッチ細胞から分泌される幹細胞因子により幹細胞の自己複製が誘導されるが、ニッチに対して水平に分裂した場合は対称性分裂により二つの幹細胞が産生され、垂直に分裂した際には、ニッチからはなれた細胞は分化して非対称性分裂が誘導されたと考えられている。また逆に幹細胞からも血管細胞に対する、血管関連分子の放出により血管形成を誘導する作用も知られている。

ロマ細胞の生存に利用されている成長因子や血清が、造血幹細胞に直接作用することも考えられ、ストロマ細胞からの直接の作用が判断しにくい状況となる。そこで、最低限必要なアミノ酸をのぞいては、動物由来蛋白を含まない無血清培養液を用いた培養系を構築した。本培養においてOP9細胞を種々のサイトカインで刺激し、共培養する造血幹細胞に与える影響を観察すると、OP9細胞をepidermal growth factor (EGF)で刺激した培養系では造血幹細胞を含め、造血前駆細胞の無尽蔵な増殖が誘導され、一方EGFのかわりにFGF2を使うと、造血幹細胞の分化が誘導される。EGFの造血幹細胞への直接的な作用を否定するために、恒常的活性型のerbB2をOP9細胞に導入しても、やはり造血幹細胞の増殖が誘導される⁷⁾。つまり、ニッチのひとつである骨芽細胞に関していえば、それを刺激する外来性因子により、その近傍に存在する幹細胞の運命が変化することが判明した。

そして、最近Rafiiらの研究グループも筆者らの研究に類似した培養を血管内皮細胞で展開して同様の結論を報告している。つまり、血管内皮細胞にアデノウイルスのearly region 4を遺伝子導入することにより、内皮細胞のAktシグナルを恒常的に活性化させ、初代培養の内皮細胞が無血清および成長因子の添加無しで培養できるシステムを開発した⁶⁾。この条件で造血幹細胞を共培養することにより、血管内皮細胞におけるAktシグナルが内皮細胞でBMP4, Angiopoietin-1 (Ang1)などの発現を亢進させることで、造血幹細胞の増殖を誘導することを報告している。一方、恒常的活性型のc-rafで内皮細胞を活性化して、MAPKを活性化した条件で造血幹細胞と共培養すると、造血幹細胞の分化因子であるAng2やinterleukin (IL)6の発現が亢進して細胞分化の方向に運命決定されることが示された。つまり、骨芽細胞であっても、血管内皮細胞であっても、それを刺激する外来性因子によって、幹細胞の増殖、分化を左右しうることが判明した(図1)。

グリオブラストーマのがん幹細胞傍血管ニッチ (perivascular niche)

もとより、成体における神経幹細胞は、海馬や脳室下帯の血管に近接して存在することが明らかにされてきていた。胎児期の脳の成長において脳室の神経外胚葉からは豊富な血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF)の産生がなされ、血管を動員し、血管形成を促進させる。このように血管内皮細胞と神経幹細胞は発生期から近接して存在しており、出生後もこの局在は持続する。そして、本領域での神経幹細胞の自己複製や未分化性の維持がnotchシグナルを介して誘導されることが示されてきた⁸⁾。このように造血幹細胞だけでなく、神経幹細胞の自己複製も血管領域で誘導されることから、血管ニッチの概念は、がん幹細胞にも適応されたと考えられてきた。

グリオブラストーマのがん細胞中にも、高いDNA修復能と薬剤耐性を示し、がんの再発に関わると考えられる、がん幹細胞が存在することが示されてきた。元来グリオブラストーマは血管豊富な腫瘍であり、血管ニッチの概念が当てはまると考えられてきたが、実際の組織解析によって、がん幹細胞が血管近傍に局在することが明らかにされた⁹⁾。しかも興味深いことに、腫瘍内の血管内皮細胞とがん幹細胞様細胞をともに免疫不全マウスに移植することで、がん幹細胞様細胞のみを移植したときに比べ造腫瘍能が高まる。この場合血管内皮細胞由来の幹細胞因子として、酸化窒素 (nitric oxide: NO) が考えられており、NOによるnotch経路の活性化が、がん幹細胞の自己複製を誘導すると示唆されている。また、逆にがん幹細胞は、血管内皮細胞の低酸素状態における細胞死を抑制する機能を有すると考えられており、血管新生抑制剤に対する抵抗性に関わるとされている。

造血幹細胞、神経幹細胞に続き、正常組織の幹細胞のニッチが詳細に解析されてきたのは腸である。腸小窩 (crypt) は、小腸および大腸における機能的なユニットであり、幹細胞はこの crypt の最低部に存在して、上皮細胞や筋線維芽細胞系譜の間葉系細胞近傍で自己複製を営む。本領域では Wnt シグナルが増殖分化に関わることが明らかにされてきている¹⁰⁾。

大腸がんの場合、がん幹細胞のニッチがどこかという明確な定義はなされていないが、ニッチを構成する細胞として、筋線維芽細胞あるいは間葉系幹細胞が示唆されている。正常腸幹細胞と同様、がん幹細胞でも Wnt シグナルが活性化していると考えられており、核内 β カテニンを有するがん細胞は細胞集塊を形成して、筋線維芽細胞とともに、がんの浸潤の先端部に位置する¹¹⁾。このような筋線維芽細胞ががん幹細胞ニッチ構成細胞であるか否かはまだ明確ではない。しかし、大腸がん細胞株にがん幹細胞性を誘導することが示唆されている I 型コラーゲンの主な産生細胞が筋線維芽細胞であることや、筋線維芽細胞を CD8 陽性 T 細胞を介して細胞死を誘導すると、がんの成長や転移が極めて抑制されることから、筋線維芽細胞ががん幹細胞ニッチ細胞であることが示唆されてきている (図 1)¹²⁾。また近年、Wnt の活性程度によりがん幹細胞が単離できることが報告されてきた。その系を用い、筋線維芽細胞の分泌する肝細胞成長因子 (hepatocyte growth factor:HGF) が大腸がんのがん幹細胞の Wnt シグナルの活性化を増強させることが明らかにされたことから¹³⁾、筋線維芽細胞のニッチ細胞としての役割が示唆される。

表皮の幹細胞は基底層に列に並んでおり、ケラチノサイトのターンオーバーに反応して規則的に自己複製を繰り返している。表皮幹細胞から発生する薬剤誘発皮膚がんモデルにおいて、最近がん幹細胞とその近傍の血管との間で血管ニッチが形成されていることと、がん幹細胞と血管内皮細胞のクロストークが報告されている (図 2)¹⁴⁾。

つまり、がん幹細胞は VEGF 受容体の co-receptor として機能する Nrp1 (neuropilin-1) を発現しており、自らの分泌する VEGF によるオートクラインループで VEGF 受容体を活性化することによりがん幹細胞の増殖シグナルを入れている。一方で、がん幹細胞の分泌する VEGF は従来の機能である血管形成を促進し、がん幹細胞と相互作用することのできる血管ニッチの数を増加させるという

図2 血管ニッチ細胞の分化起源細胞

がん幹細胞の血管ニッチを形成する細胞として、もちろん既存の血管由来の血管細胞により血管の形成が誘導されるが、骨髄由来細胞や腫瘍細胞が血管を構築する細胞に直接分化することも報告されてきた。例えば、骨髄由来の造血幹/前駆細胞は、内皮細胞や壁細胞に分化することが判明しており、また骨髄由来間葉系細胞は壁細胞や筋線維芽細胞に分化する。がん幹細胞は性質を変化させ血管(管腔)様構造を形成すること (vasculogenic mimicry) が報告されてきているが、直接的な内皮細胞への分化も観察されている。幹細胞は内皮細胞に対して、細胞の生存シグナルを与えることも判明しており、さらに内皮細胞に与えられたシグナルによっては、間葉系幹細胞にリプログラミングすることも判明しており、非常に複雑なネットワークが介入する。

モデルである。Nrp1 はこれまで内皮細胞に発現すると、VEGF 受容体と結合して VEGF のシグナルを増強させ血管新生を旺盛にする機能があることが報告されてきた。この Nrp1 は単独では細胞内シグナルを入れることがないことから、がん幹細胞上で Nrp1 と結合し VEGF からのシグナルを入れる VEGF 受容体がどの受容体なのか、VEGFR1, 2, 3 あるいは未知のものなのかを含めてまだ詳細ではない。しかし、がん幹細胞特異的に VEGF を欠損させるとがんの成長が極めて抑制されることから、興味深い解析結果であるが、他のがん種におけるがん幹細胞の VEGF および Nrp1 の発現解析により、この解析結果が一般化できる概念かどうか解明することが必要である。

腫瘍細胞移植モデルにおけるがん幹細胞血管ニッチ

様々ながんモデルでがん幹細胞が血管ニッチを形成することが明らかにされてきたが、筆者らは培養腫瘍細胞株をマウスに移植して形成される腫瘍においても、がん幹細胞を同定して、これらも血管近傍に存在することを示してきた¹⁵⁾。

前述したように、正常の幹細胞は、胎児期では活発に自己複製するのに対して、成体では幹細胞維持のために休眠期に入る。しかし、がん組織においては、がん細胞の増殖制限が生じず、がん幹細胞に対して分裂を抑制するようなシグナルが入る必要性はないと考えられる。よってがん組織では、休眠中にはいるものは少ないと考えられる。そこで、胎児期の幹細胞に利用されている細胞増殖機構は、がん幹細胞でも利用されているとの仮説のもと、胎児期の造血幹細胞に発現して、成体の休眠中の造血幹細胞に発現していない分子の単離を行った。単離された分子のなかでは、PSF1 (partner of sld five 1) という、酵母では DNA 複製因子として機能する分子の発現が増殖中の幹細胞に特異的に高発現することが判明した。ほ乳類における PSF1 の機能は詳細ではないが、ノックアウトマウスの解析結果、いわゆる全能性幹細胞である epiblast の増殖に必須であることが判明した¹⁶⁾。また、PSF1 のヘテロ欠損マウスを用いた解析から、PSF1 の遺伝子座が一方でもな

いと、骨髓破壊後の骨髓回復期における急速な造血幹細胞の増殖に致死的な障害が生じることが判明した¹⁷⁾。つまり、この PSF1 は、少なくともほ乳類においては未熟な幹細胞レベルでの細胞増殖に必須であることが判明した。

PSF1 のヒト固形癌組織における発現細胞の局在は特徴的で、肺がんや食道がんにおいて、腫瘍周囲の CD31 に染色される血管近傍で群れをなして存在する¹⁵⁾。しかし、PSF1 陽性細胞が内皮細胞と直接接着するのではなく、特に腫瘍周辺領域の血管では間葉系細胞の周りに存在している細胞も多い。このような腫瘍周囲の血管に存在している、PSF1 を強く発現するがん細胞ががん幹細胞に値するものかどうか、ヒトのがん組織を用いた解析は困難である。PSF1 は細胞内蛋白であり、抗体を用いて生きたまま細胞の回収をセルソーターで行うことは困難である。そこで、マウス腫瘍細胞に PSF1 遺伝子のプロモーター制御下に GFP 蛍光蛋白を発現させることで、PSF1 遺伝子プロモーター活性の高低をモニターしてがん細胞の可視化を試みた。その結果、PSF1 プロモーター制御下に GFP を発現する腫瘍細胞をマウスに移植して形成された腫瘍組織において、PSF1 プロモーター活性の高い細胞は、繰り返し造腫瘍能を有し、浸潤能、転移能とも高く、遺伝子型も悪性度と相関のある ES 細胞様の遺伝子コードを示し、また抗がん剤抵抗性を示すがん幹細胞様細胞であることが判明した。またヒトがん組織で観察されるのと同様、マウスの腫瘍モデルでも、腫瘍周囲のやはり血管領域に圧倒的に多くの PSF1 陽性細胞が存在することが判明した。

ここで興味深いのは、試験管内で培養中のがん細胞においては PSF1 のプロモーター活性の強度で悪性度に差がない点である。個体に移植して形成された腫瘍の中で初めて PSF1 高発現により悪性度が高まることから、腫瘍微小環境の、おそらく血管内皮細胞あるいはその周囲の筋線維芽細胞から分泌される何らかの因子により、がん細胞のがん悪性化が誘導されることが示唆される。

本稿で紹介したように、正常組織の幹細胞研究の治験をレッスンとして、がん組織の、特に固形がんにおけるがん幹細胞ニッチの同定が進んできている。そして、その共通性は、がん幹細胞が血管近傍に局在するということである。ただ、血管とはいえ、血管は血管内皮細胞やペリサイトや血管平滑筋細胞といった壁細胞が基本的な構成細胞であるが、その周囲を被覆する細胞外マトリックスや、さらにその近傍の間葉系細胞によっても構築されている(図1)。血管領域の実際のニッチ細胞はどの細胞なのかを解析する必要がある。その点、大腸がんニッチにおいて示唆されている筋線維芽細胞は、がん幹細胞の血管ニッチ領域に豊富に存在することから、この細胞がニッチ構成細胞としては有力な候補である。この細胞の起源であるが、諸説ある中、近年骨

髄から腫瘍周囲に集積してきた幹/前駆細胞が筋線維芽細胞に分化して、腫瘍の増大を誘導する細胞となることが報告された(図2)¹⁸⁾。また、従来、メラノーマでは、がん細胞そのものが血管様構造を形成するいわゆる vasculogenic mimicry が生じることが報告されてきていたが、最近グリオーマのがん幹細胞は血管内皮細胞に分化する能力を有することが報告されてきた¹⁹⁾。これに関連して、最近、血管内皮細胞を TGF β 、BMP2 などで刺激すると間葉系幹細胞に分化して、筋線維芽細胞にもなりうる細胞が発生することから²⁰⁾、がん幹細胞自らが最終的に自身の生態学的適所である細胞を産生する可能性もある。このような血管ニッチに特異的に発現するような分子を解明して薬剤標的とすれば、効率の良いがん幹細胞への薬剤送達が可能になると考えられ、今後がん幹細胞ニッチの正体をさらに定義する研究が発展する必要があると考えられる。

文献

- 1) Fuchs E, Tumber T, Guasch G: Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116: 769-778, 2004.
- 2) Takakura N, Huang XL, Naruse T, Hamaguchi I, Dumont DJ et al: Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis. *Immunity* 9: 677-686, 1998.
- 3) Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X et al: Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425: 836-841, 2003.
- 4) Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S et al: Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118, 149-161, 2004.
- 5) Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T: Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25: 977-988, 2006.
- 6) Kobayashi H, Butler JM, O'Donnell R, Kobayashi M, Ding BS et al: Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol* 12:1046-1056, 2010.
- 7) Takakura N, Kodama H, Nishikawa S, Nishikawa S: Preferential proliferation of murine colony-forming units in culture in a chemically defined condition with a macrophage colony-stimulating factor-negative stromal cell clone. *J Exp Med* 184: 2301-2309, 1996.
- 8) Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y et al: Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304: 1338-1340, 2004.
- 9) Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C et al: A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 11: 69-82, 2007.
- 10) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. Clevers H. *Cell*. 2006 Nov 3;127(3):469-80.
- 11) Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F et al: Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10356-10361, 2001.
- 12) Loeffler M, Krüger JA, Niethammer AG, Reisfeld RA: Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J Clin Invest* 116: 1955-1962, 2006.
- 13) Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH et al: Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* 12: 468-476, 2010.
- 14) Beck B, Driessens G, Goossens S, Youssef KK, Kuchnio A et al: A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature* 478: 399-403, 2011.
- 15) Nagahama Y, Ueno M, Miyamoto S, Morii E, Minami T et al: PSF1, a DNA replication factor expressed widely in stem and progenitor cells, drives tumorigenic and metastatic properties. *Cancer Res* 70: 1215-1224, 2010.
- 16) Ueno M, Itoh M, Kong L, Sugihara K, Asano M et al: PSF1 is essential for early embryogenesis in mice. *Mol Cell Biol* 25: 10528-10532, 2005.
- 17) Ueno M, Itoh M, Sugihara K, Asano M, Takakura N: Both alleles of PSF1 are required for maintenance of pool size of immature hematopoietic cells and acute bone marrow regeneration. *Blood* 113: 555-562, 2009.
- 18) Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SS et al: Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell* 19: 257-272, 2011.
- 19) Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G et al: Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 468: 824-828, 2010.
- 20) Medici D, Shore EM, Lounev VY, Kaplan FS, Kalluri R et al: Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med* 16: 1400-1406, 2010.