

## がん幹細胞に発現するイオン輸送体を標的とした新規治療開発

芦原 英司, 丸中 良典, 細木 誠之

京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学

**概要** 近年、幹細胞能力とがん形成能をあわせ持つ少数の幹細胞様のがん細胞(がん幹細胞)により形成・維持され、遠隔転移やがん治療後の再発に関与していることが明らかとなり、がん幹細胞の性状、動態の把握、およびがん幹細胞をターゲットとした治療開発は、がん克服のための最重要課題である。本研究ではがん幹細胞の治療標的として、イオン輸送体に着目し、神経膠腫細胞株 U251-MG を用いてその発現を検討した。U251-MG 細胞を既報に基づき、がん幹細胞を作製した。作製された cancer sphere は、二次 sphere の形成を認め、がん幹細胞としての増殖を認めた。次に、cancer sphere と親株を用いてイオン輸送体の mRNA 発現の変化を、RT-PCR にて検討した。U251-MG 細胞株から作製された cancer sphere 細胞では NHE2 が軽度増加していた。一方、NHE1、VATPase A1 subunit や KCC1 は著明に減少していた。Cancer sphere における NHE2 の発現亢進は、がん幹細胞のマーカーと推察され、今後その機能解析、および *in vitro* 系においては NHE2 のノックダウンや阻害剤投与による幹細胞維持能の変化、および *in vivo* 系における造腫瘍性の変化を検討し、がん幹細胞の標的分子となりうることを確認する。

### 1. 研究目的

#### 1.1 背景

がんとは、ウイルス、発がん物質の暴露など、何らかの原因(原因不明も含む)により遺伝子に変異が起こり、増殖や分化への正常のコントロールを受けることなく細胞増殖を起し、周囲の組織への浸潤や他の臓器への転移を来し、最終的にはその個体の生命をも脅かすような病態をいう。がんの治療の根本理念は“Total Cell Killing”であり、その理念到達のため多くの抗がん剤が開発されている。しかしながら、がん患者の多くは、治療初期での治療に対する不応状態、および再発により闘病生活を強いられ死亡に至っている。近年、がん組織はがん組織を形成・維持できる少数の幹細胞様のがん細胞(がん幹細胞)と、幹細胞様の性質を持たない非がん幹細胞がん細胞により形成され、がん幹細胞が遠隔転移やがん治療後の再発に関与していることが明らかとなり、がん幹細胞の性状、動態の把握、およびがん幹細胞をターゲットとした治療開発は、がん克服のための最重要課題である。

がん細胞の代謝は、正常細胞と比べ解糖系優位の代

謝状態(Warburg 効果)にあり<sup>1</sup>、このために産生された乳酸や二酸化炭素など、多くの酸性物質から作られる H<sup>+</sup>を細胞外に放出することで、細胞内 pH を弱アルカリに保ち細胞機能を維持している。その結果、がん組織周囲の“がん微小環境”は酸性状態となるが、このことががん細胞の遠隔転移や薬剤耐性など、腫瘍細胞の悪性化にも関わっていると考えられており、また治療後再発の原因となるがん幹細胞は低酸素状態に存在する(図 1)と考えられる。我々は慢性骨髄性白血病細胞株を用いて、低酸素状態にて長期間培養可能な低酸素適応細胞株を樹立した。この細胞株はがん幹細胞の性質と考えられている三つの性質、①細胞周期解析において静止期の細胞分画が多く、②通常の抗がん剤に抵抗性を示す、さらに③白血病発症マウスの寿命を有意に短縮することを明らかにし<sup>24</sup>、さらに多発性骨髄腫細胞株にても同様の現象が観察され、低酸素状態ではがん幹細胞様の性質を獲得することを明らかにしている(未発表データ)。こういった低酸素状態で生存するがん細胞では、解糖系代謝がより優位な状態であることが推察される。

一方、細胞質内  $\text{Cl}^-$  が MAPK 系 (JNK, p38) を介した p21 の発現調節を行い、がん細胞の細胞増殖を制御していること<sup>5,6</sup>、さらに細胞質内  $\text{Cl}^-$  が細胞質内 pH の制御に密接に関わっていることを明らかにし、細胞質内  $\text{H}^+ \cdot \text{Cl}^-$  が、がん細胞の増殖を制御していることを報告してきた (In submission)。これらのことから、がん細胞が作り出す“がん微小環境”の酸性状態、および細胞質内  $\text{Cl}^-$  の動態が、がん幹細胞の生理機能と強く関係していることが示唆される。

### 1.2 研究目的

我々は「がん幹細胞内外の  $\text{H}^+$  および  $\text{Cl}^-$  環境を調節する各種イオン輸送体機能 (図 2) を制御することで、がん幹

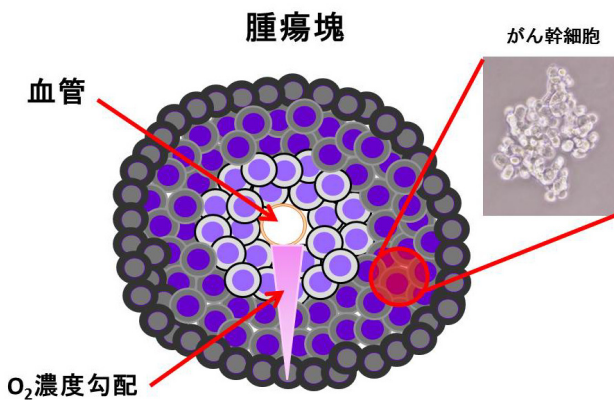


図 1. 腫瘍塊の酸素濃度勾配とがん幹細胞

細胞機能を制御できる」と仮説を立て、本研究ではイオン輸送体の発現をがん幹細胞、非がん幹細胞がん細胞と比較し、RNA 干渉を用いたイオン輸送体の発現制御、およびそれらの阻害剤により、がん幹細胞の増殖、動態の制御を検討することとした。

### 1.3 研究の意義

本研究によって既存の抗がん剤が有効でないがん幹細胞に有効な治療としてイオン輸送体を標的分子として開発できる可能性があり、がんの根治療法薬が創生できることが期待される。

## 2. 研究方法

### 2.1 実験材料

Glioblastoma multiforme (GBM) 細胞株 U251-MG、非小細胞性肺癌 (NSCLC) 細胞株 A549 を用いて実験を行った。10% FCS (胎児血清) 加 DMEM (low glucose) 培地にて維持培養を行い、がん幹細胞作製には DMEM/F12 medium 培地を用い、無血清下にて 2% B27、10 ng/mL basic-FGF、10 ng/mL EGF を添加し既報<sup>7,9</sup>に基づき行った。また、培養には Ultra-Low attachment surface のディッシュを用いて培養を行った。いずれも 37°C、5%  $\text{CO}_2$  存在下で培養し、sphere 形成時には 2 日ごとに B27、basic-FGF、EGF を添加した。

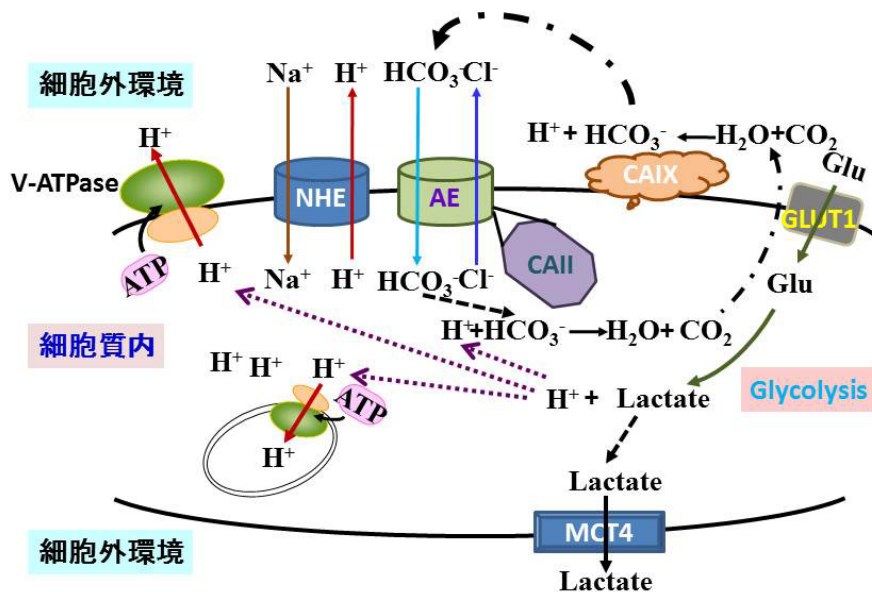


図 2. 細胞内 pH を制御するイオン輸送体とイオンの動き

## 2. 2 イオン輸送体の発現

H<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup> 輸送に関わる、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送体 (NHE)、K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> 共輸送体 (KCC)、H<sup>+</sup> Vacuolar type ATPase (V-ATPase) の各種イオン輸送体の発現を quantitative-RT-PCR 法、にて、がん幹細胞 (cancer sphere)、非がん幹細胞がん細胞 (親株) で比較検討した。

## 3. 研究結果

### 3. 1 がん幹細胞の作製

U251-MG GBM 細胞株、A549 NSCLC 細胞株を用いて、がん幹細胞の作製を行った。いずれの細胞株においても sphere formation は可能であり、cancer sphere は形成された (図 3)。ただし、細胞密度を上げることでディッシュの底面に付着し集塊を形成する細胞集団も認め、sphere 形成には至適な細胞密度調整が必要であることが示唆された。さらに、形成された sphere を dissociation solution で単細胞浮遊液状態にし、再度 sphere 形成を行ったところ、二次 sphere の形成を認め、がん幹細胞としての増殖を認めた。また単細胞浮遊液状態にした細胞を用い通常のディッシュにて培養を行ったところ、付着し親株と同様増殖した。これらのことから、浮遊状態で培養を行うことでがん幹細胞としての性質を獲得し増殖を続けることが確認された。

## 3. 2 イオン輸送体の発現

次に、U251-MG 細胞の親株、およびその cancer sphere のイオン輸送体の mRNA 発現の変化を、RT-PCR にて検討した。U251-MG 細胞株から作製された cancer sphere 細胞では NHE2 が軽度増加していた。一方、NHE1、VATPase A1 subunit や KCC1 は著明に減少していた (図 4)。

## 4. 本研究における考察と今後と展望

“Total Cell Killing”をがんの根治とするがん治療分野において、現在の治療法、薬剤では未だその目標は達成されておらず、このことは新たな観点からの薬剤開発、治

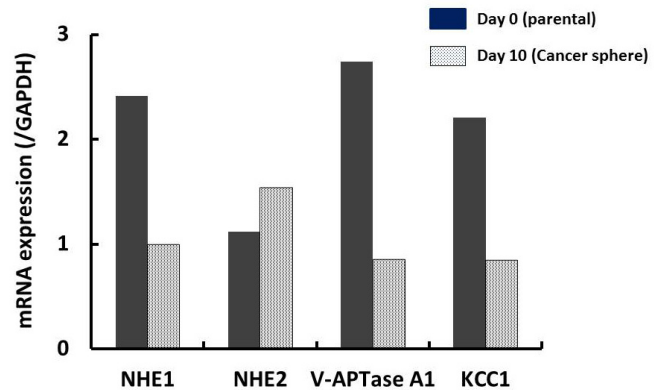


図 4. イオン輸送体の発現比較

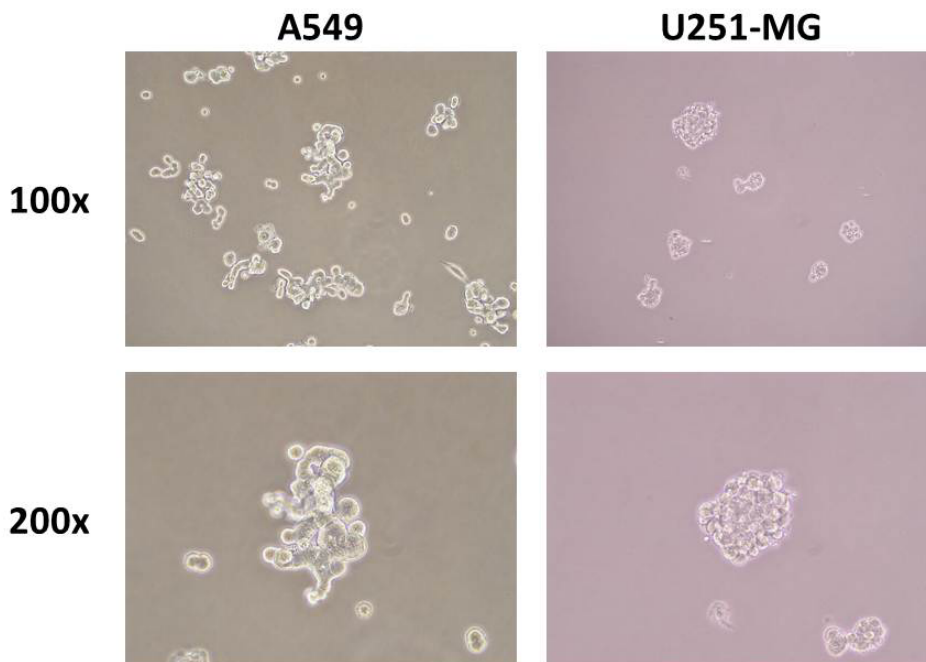


図 3. Cancer Sphere

療法開発の必要性を明らかに物語っている。がん細胞においては Warburg 効果により解糖系が優位な代謝経路である<sup>1</sup>。しかしながら、がん細胞の細胞質内 pH は正常細胞とほぼ同程度の pH が維持されている。そのためには細胞質内に溜まる H<sup>+</sup> や酸性物質を処理するする必要があり、細胞外に輸送するか、リソソーム内に溜め込むか、いずれかにより pH 調整が行われていることが予想され、がん細胞では H<sup>+</sup>、およびそのカウンターイオンである Cl<sup>-</sup> の輸送に関わるイオン輸送体やイオンチャネルの発現が高いことが推測される<sup>10,11</sup>。特にがん再発の最大の原因であるがん幹細胞は低酸素状態に存在する<sup>2,4</sup>ことから、がん幹細胞では H<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup> 輸送に関わるイオン輸送体の発現がさらに亢進していることが推察され、我々は上記のような仮説によりイオン輸送体をターゲットとしたがん幹細胞の新規治療法の開発をめざし、本研究を開始した。

自律性増殖を続ける細胞株においても、培養条件によりがん幹細胞様の性質を獲得することは過去にも報告されている<sup>7-9</sup>が、本検討でも cancer sphere は形成され、二次培養により sphere は維持されることから、cancer sphere はがん幹細胞性を有した細胞集団と考えられた。しかし、*in vivo* モデルにおける limiting dilution 法による移植細胞の造腫瘍性の確認、がん幹細胞に特異的な表面抗原の発現、等の確認は必要であり、今後検討していく。

NHE は細胞質内の H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>濃度に従って細胞質内の H<sup>+</sup>を細胞外に汲み出し Na<sup>+</sup>を細胞質内に取り込むことにより、細胞質内 pH の調節と細胞容積を制御している<sup>12</sup>。NHE には9つの isoforms があるが、そのうち NHE1 は生体内の細胞に普遍的に発現する。NHE2 は主に胃、大腸、腎臓に発現しており、神経細胞に発現するのは NHE5 である。今回の検討では、がん幹細胞化により NHE1 の発現は減少し、NHE2 の発現が軽度上昇した。神経細胞特異的な NHE5 の発現変化は今後確認するが、NHE2 は元来正常の神経細胞における発現はないことから考えると、U251-MG 親株に発現していること自体異所性の発現で、cancer sphere における NHE2 の発現亢進は、がん幹細胞のマーカーと推察される。現時点ではその機能解析は遂行できていないが、今後他の GBM 細胞株や正常神経細胞、神経幹細胞における NHE2 の発現変化、さらに他のがん種での発現変化を確認し、NHE2 が普遍的ながん幹細胞マーカーとなりうるか検討を続けるとともに、*in vitro* 系

においては NHE2 のノックダウンや阻害剤投与による幹細胞維持能の変化、および *in vivo* 系における造腫瘍性の変化を検討し、がん幹細胞における新規の治療標的をなるか、検証を続ける。

V-ATPase は細胞膜、リソソーム膜、acidic vesicle の膜表面(主にリソソーム膜、acidic vesicle 膜)に発現しており、ATP 依存性に H<sup>+</sup> の輸送を行う<sup>13</sup>。V-ATPase 機能阻害による抗がん作用は近年注目を浴びており<sup>14-16</sup>、本研究者も、V-ATPase 阻害により多くのがん細胞がアポトーシスによる細胞死を誘導されることを確認している(未発表データ)。今回の検討では、がん幹細胞化に伴いその発現は減少していた。がん幹細胞の多くは静止期の状態にあり、何かの刺激に伴い細胞回転が回り増殖サイクルに入ることから考えると、静止期にあるがん幹細胞の代謝レベルは細胞回転に入っている非がん幹細胞がん細胞より低いことが考えられ、H<sup>+</sup>のリソソーム内への蓄積も少ないことが考えられる。また細胞外への H<sup>+</sup>の汲み出しが NHE2 の発現亢進により行われ、代償的に V-ATPase の発現が低下していることも考えられる。今後免疫蛍光染色を用いて、がん幹細胞と非がん幹細胞がん細胞における V-ATPase の発現強度や局在の違いを検討する。

KCC は電気的中性を保ちながら K<sup>+</sup>と Cl<sup>-</sup> を細胞外に汲み出す共輸送体で、KCC3 や KCC2 はがん細胞の増殖、浸潤に関わることが報告されている<sup>17,18</sup>。今回の検討では、V-ATPase 同様ながん幹細胞では減少しており、これらのイオン輸送体も非がん幹細胞がん細胞の機能維持に重要な輸送体である可能性が考えられる。その他、がん細胞機能に重要と考えられている輸送体や細胞質内 pH 制御を行う酵素として、モノカルボン酸輸送体(monocarboxylate transporter: MCT)<sup>19</sup> やグルコース輸送体<sup>20</sup>、炭酸脱水酵素(carbonic anhydrase: CA)<sup>21</sup> が、がん細胞に対する治療標的分子として注目されている。これらの分子も含め、がん幹細胞の生存維持に重要な分子をさらに同定し、イオン輸送体を標的とした“がん根治”のための新規治療開発を継続する。

## 5. 結語

GBM 細胞株を用いてがん幹細胞化を試み、cancer sphere を形成した。この sphere には今回検討したイオン輸送体のうち、NHE2 の発現の亢進を認め、NHE1 や

V-ATPase、KCC1 の発現は非がん幹細胞がん細胞より減少していた。今後、他の GBM 細胞、他種のがん細胞を用いて検討を続け、がん幹細胞の生存維持に重要なイオン輸送体をさらに探索し、がん幹細胞治療に有効なイオン輸送体の標的分子を同定していく。

## 文 献

1. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(5):325-337.
2. Nagao R, Ashihara E, Kimura S, *et al*. Growth inhibition of imatinib-resistant CML cells with the T315I mutation and hypoxia-adaptation by AV65--a novel Wnt/beta-catenin signaling inhibitor. *Cancer Lett*. 2011; 312(1):91-100.
3. Takeuchi M, Ashihara E, Yamazaki Y, *et al*. Rakicidin A effectively induces apoptosis in hypoxia adapted Bcr-Abl positive leukemic cells. *Cancer Sci*. 2011;102(3): 591-596.
4. Takeuchi M, Kimura S, Kuroda J, *et al*. Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl+ leukemic cells acquiring stem-like characteristics in a hypoxic environment. *Cell Death Differ*. 2010;17(7):1211-1220.
5. Miyazaki H, Shiozaki A, Niisato N, *et al*. Chloride ions control the G1/S cell-cycle checkpoint by regulating the expression of p21 through a p53-independent pathway in human gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;366(2):506-512.
6. Ohsawa R, Miyazaki H, Niisato N, *et al*. Intracellular chloride regulates cell proliferation through the activation of stress-activated protein kinases in MKN28 human gastric cancer cells. *J Cell Physiol*. 2010;223(3):764-770.
7. Louie E, Nik S, Chen JS, *et al*. Identification of a stem-like cell population by exposing metastatic breast cancer cell lines to repetitive cycles of hypoxia and reoxygenation. *Breast Cancer Res*. 2010;12(6):R94.
8. Fan H, Guo H, Zhang IY, *et al*. The different HMGA1 expression of total population of glioblastoma cell line U251 and glioma stem cells isolated from U251. *Brain Res*. 2011;1384:9-14.
9. Pan J, Zhang Q, Wang Y, You M. 26S proteasome activity is down-regulated in lung cancer stem-like cells propagated in vitro. *PLoS One*. 2010;5(10):e13298.
10. Shen MR, Lin AC, Hsu YM, *et al*. Insulin-like growth factor 1 stimulates KCl cotransport, which is necessary for invasion and proliferation of cervical cancer and ovarian cancer cells. *J Biol Chem*. 2004;279(38): 40017-40025.
11. Shiozaki A, Miyazaki H, Niisato N, *et al*. Furosemide, a blocker of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter, diminishes proliferation of poorly differentiated human gastric cancer cells by affecting G0/G1 state. *J Physiol Sci*. 2006;56(6):401-406.
12. De Vito P. The sodium/hydrogen exchanger: a possible mediator of immunity. *Cell Immunol*. 2006;240(2):69-85.
13. Nishi T, Forgac M. The vacuolar (H<sup>+</sup>) -ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(2):94-103.
14. Lebreton S, Jaunbergs J, Roth MG, Ferguson DA, De Brabander JK. Evaluating the potential of vacuolar ATPase inhibitors as anticancer agents and multigram synthesis of the potent salicylhalamide analog saliphenylhalamide. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008; 18(22):5879-5883.
15. Lu X, Qin W, Li J, *et al*. The growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma xenografts are inhibited by small interfering RNA targeting to the subunit ATP6L of proton pump. *Cancer Res*. 2005;65(15):6843-6849.
16. You H, Jin J, Shu H, *et al*. Small interfering RNA targeting the subunit ATP6L of proton pump V-ATPase overcomes chemoresistance of breast cancer cells. *Cancer Lett*. 2009;280(1):110-119.
17. Hsu YM, Chen YF, Chou CY, *et al*. KCl cotransporter-3 down-regulates E-cadherin/beta-catenin complex to promote epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2007;67(22):11064-11073.
18. Wei WC, Akerman CJ, Newey SE, *et al*. The potassium-chloride cotransporter 2 promotes cervical cancer cell migration and invasion by an ion transport-independent mechanism. *J Physiol*. 2011;589(Pt 22):

- 5349-5359.
19. Dhup S, Dadhich RK, Porporato PE, Sonveaux P. Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Curr Pharm Des.* 2012;18(10):1319-1330.
20. McBayer SK, Cheng JC, Singhal S, Krett NL, Rosen ST, Shanmugam M. Multiple myeloma exhibits novel dependence on GLUT4, GLUT8, and GLUT11: implications for glucose transporter-directed therapy. *Blood.* 2012;119(20):4686-4697.
21. Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(2):168-181.

## Analysis of Ion Transporters in Cancer Stem Cells

Eishi Ashihara, Yoshinori Marunaka, Shigekuni Hosogi

Department of Molecular Cell Physiology, Graduate School of Medical Science,  
Kyoto Prefectural University of Medicine

### Summary

Recent evidences have demonstrated that most cancers are composed of a heterogeneous population of cells, and that a small minority of cancer cells have the capacity to proliferate extensively and form new tumors. These tumorigenic cells are defined as cancer stem cells (CSCs). This small population of CSCs, which generates non-cancer stem cell (non-CSC) cancer cells and relapses cancers, exists in the hypoxic niche. It is an urgent issue for cancer therapy to develop an agent attacking CSCs.

Cancer cells produce ATP through glycolysis even under a normoxic condition (Warburg's effect), and cancer cells generate excessive lactic acid in their cytoplasm. To maintain their metabolism and intracellular pH at normal level, cancer cells secrete  $H^+$  to the outside of cells and acidify their extracellular environment. The previous reports indicate that CSCs exist in the hypoxic area of the tumor tissue.

We hypothesize that the regulation of ion transporter function in CSCs can regulate the survival of CSCs via controlling intracellular pH. In this study, we investigate the expression of ion transporters in CSCs compared to non-CSC cancer cells. We demonstrated that the transcripts of *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 2 (NHE2)* mRNA are expressed more in the CSCs generated from glioblastoma cells compared to those in the parental cells, suggesting that NHE2 could be one of the biomarkers to maintain the CSCs in glioblastomas. We next clarify the functions of NHE2 in glioblastoma CSCs as well as those in CSCs generated from other kinds of cancers. In near future, we discover the novel therapeutic targets against CSCs.