

令和元年6月17日現在

機関番号：22101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10399

研究課題名(和文)放射線生物学的研究に用いる株化がん幹細胞の樹立

研究課題名(英文) Establishment of a cancer stem cell line for radiation biological research

研究代表者

大西 健(Ohnishi, Ken)

茨城県立医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：50152195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：放射線生物学的研究に神経膠芽腫がん幹細胞を安定的に供給するため、腫瘍の培養系モデルである3次元細胞塊(スフェロイド)の低酸素微小環境に出現するがん幹細胞様細胞(がん幹細胞マーカーかつ未分化細胞マーカー陽性細胞)から株化がん幹細胞を樹立する方法を検討した。その結果、がん幹細胞様細胞をスフェロイド内で長期培養できる培養条件を明らかにすることができた。スフェロイド内で長期培養したがん幹細胞様細胞はがん幹細胞の形質を維持していた。スフェロイドから分離したがん幹細胞様細胞のみを継代維持する方法については、今回確立することはできなかった。この方法は、今後さらに検討する必要があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線がん治療後のがん幹細胞の生存は、再発、転移に繋がり効率の良い治療にとって大きなマイナス要因と最近考えられている。従って、がん幹細胞に対する放射線殺細胞効果を高める治療法の開発が重要となっている。しかし、がん幹細胞が実際に生体内でどのように発生し、増殖、移動しているのかその挙動についてはほとんど分かっていない。放射線生物学的研究にがん幹細胞が安定的に供給できれば、放射線がん治療の進展に大きく役立つ。本研究は、スフェロイド内に存在するがん幹細胞様細胞をがん幹細胞としての形質を保持させたまま長期培養できる培養法を明らかにした。この研究成果は、放射線生物学的ながん幹細胞研究に寄与できると考える。

研究成果の概要(英文)：This study examined cell culturing methods which enable to establish a cancer stem cell line from cancer stem cell-like cells (cancer stem cell marker-positive and undifferentiated cell marker-positive cells) existing in three dimensional cell masses (spheroids) of human glioblastoma cells. The cancer stem cell-like cells could be cultured in spheroids for a long period under a developed cell culturing condition. It was also shown that those cells maintained the phenotype as a cancer stem cell during the long-term culturing. This study could not establish the method which successively culture the cancer stem cell-like cells alone sorted from spheroids for a long period. It was suggested that further studies are needed to examine the cell culturing methods.

研究分野：放射線生物学

キーワード：がん幹細胞 スフェロイド CD133

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

放射線がん治療後のがん幹細胞の生存は、再発、転移に繋がり、効率の良い治療にとって大きなマイナス要因と最近考えられている。従って、がん幹細胞に対する放射線殺細胞効果を高める治療法の開発が重要となっている。がん細胞の活発な増殖によって形成される腫瘍においては、十分な血管形成が伴わず、腫瘍内は低酸素状態にあることがよく知られている。腫瘍の低酸素微小環境は細胞生存系、血管新生、転移などのがんの進行に関わる転写因子の活性化を誘導し、がん細胞の悪性化(転移・浸潤能の亢進等)の要因となる。さらに、このようながん細胞の挙動に加え、がん幹細胞においても腫瘍内の低酸素微小環境が深く関わっていることが明らかにされた。従来、低酸素微小環境は正常な幹細胞の未分化能の維持に重要であることが分かっていたが、がん幹細胞においても低酸素微小環境はニッチ形成や未分化能維持に重要であることが示された。また、放射線抵抗性の脳腫瘍においても、グリオーマ幹細胞の未分化能維持に腫瘍の低酸素微小環境は欠かせないことが示されている。我々は、グリオブラストーマのスフェロイドを用い、CD133 陽性細胞(図 1a)が低酸素微小環境(図 1b)に出現することを明かにし、この細胞がいわゆるがん幹細胞としての性質を示すことを示唆している。放射線生物学的研究にこの細胞が安定的に供給できれば、がん幹細胞を標的としたより進歩した放射線がん治療の進展に大きく役立つものと思われる。

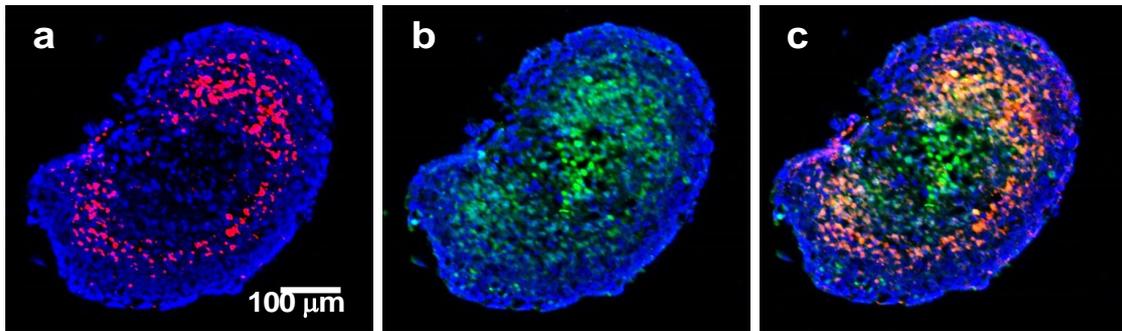


図 1. グリオブラストーマスフェロイド(T98G)の凍結切片の免疫蛍光染色像

a, CD133 免疫蛍光染色像 b, HIF-1α免疫蛍光染色像 c, Merge 像

CD133 陽性細胞(白黒印刷では白い部分)が低酸素領域(HIF-1α陽性領域、白黒印刷では白い部分)の外縁部にリング状に存在することが分かる。

## 2. 研究の目的

臨床的に生体内の腫瘍に存在するがん幹細胞の体内動態を詳しく調べるには、様々な臨床的制約を伴い、十分な解析が難しい。さらに、生体内のがん幹細胞を培養系に移した時、培養環境が生体内環境と異なるため、がん幹細胞としての性質が失われてしまう。そのため、がん幹細胞が実際に生体内でどのように発生し、増殖、移動しているのか、その挙動についてはほとんど分かっていない。一方、腫瘍の *in vitro* モデルである 3 次元細胞塊(スフェロイド)実験系は臨床的、倫理的制約を受けず、低酸素微小環境に出現する放射線抵抗性を示すがん幹細胞様細胞の性質について詳しく解析することが可能となる。これまでグリオブラストーマ(T98G 細胞)で形成されるスフェロイドの低酸素微小環境に注目し、そこにがん幹細胞様細胞が出現することを報告した論文は我々の論文(Ohnishi et al., Int. J. Oncol., 2014)以外に見当たらない。スフェロイドが直径 300 μm 程度と極めて微小な組織であるため、切片を作製するのが困難である点、さらに、レーザー光がスフェロイド表面から 100 μm 程度までしか到達せず、共焦点レーザー顕微鏡による中心部の明瞭な細胞観察が困難である点などがその要因と思われる。我々は、良好なスフェロイド凍結切片を作製する手法を確立し、スフェロイド中心部の凍結切片を免疫蛍光染色し、タンパク質の発現解析に成功している。

インキュベータ内の単層細胞培養における低酸素曝露(図 2a)と異なり、細胞が能動的に集合した 3 次元立体構造であるスフェロイド内部に形成される低酸素微小環境(図 2b)は、より生体の腫瘍内低酸素微小環境(図 2c)に近い環境を再現することができる。興味深いことに、図 2a の単層細胞培養における低酸素曝露では CD133 陽性細胞は出現しない。

本研究では、スフェロイド CD133 陽性細胞をがん幹細胞として利用できるよう、がん幹細胞形質を保持しつつ継代維持できる培養法を確立する。さらに、継代維持した細胞が、がん幹細胞としての性質(放射線抵抗性、非対称分裂性及び腫瘍形成能)を維持しているのかを確認することも目的とする。安定的に放射線生物学的研究にこの細胞が供給できれば、本研究は、がん幹細胞を標的とした放射線がん治療の進展に寄与できる。

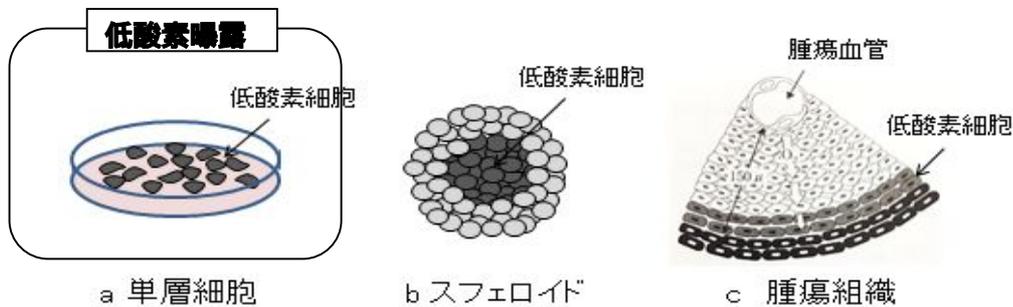


図2 異なる低酸素環境と低酸素細胞

### 3. 研究の方法

本研究では、まず、スフェロイドを長期培養することにより、スフェロイド内に形成されるがん幹細胞様細胞 (CD133 陽性細胞) を増殖維持できるかを調べた。様々な培地で培養した時のスフェロイド数の増減や形状の変化について経時的に観察した。次に、スフェロイド分散細胞の CD133 陽性細胞のみ継代維持できる培養容器の接着性、形状及び培地の成分について調べた。さらに、スフェロイドによって長期培養した細胞ががん幹細胞の形質を維持しているかを確認するため、CD133 抗体で免疫蛍光染色しセルソーターで分別回収した CD133 陽性細胞と陰性細胞の遊走能・浸潤能、放射線抵抗性、腫瘍形成能について調べた。遊走能・浸潤能、については、一般的によく用いられているマトリゲルを塗布してないあるいは塗布したトランスウェル膜 (直径 18mm、膜穴 8 $\mu$ m) を用い、膜を通過した細胞数をカウントすることにより、それぞれを評価した。放射線抵抗性については、コロニー形成法で評価した。腫瘍形成能については、CD133 陽性細胞と陰性細胞をヌードマウスに細胞を移植し、経時的に腫瘍サイズを計測することを試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) スフェロイドの継代維持法

スフェロイドを長期培養 (約 2 か月間) することにより、スフェロイド内に形成されるがん幹細胞様細胞 (CD133 陽性細胞) を増殖維持できるかを調べた。-MEM、DMEM、神経幹細胞用培地、ES 細胞用培地などを用い、それぞれの培地の入った非接着性シャーレで長期培養した時のスフェロイド数の増減や形状の変化について経時的に顕微鏡観察した。その結果、-MEM あるいは DMEM で培養した場合、徐々にスフェロイドの形状が崩れ、その数が減少した。一方、神経幹細胞用培地あるいは ES 細胞用培地で培養した場合、スフェロイドの形状は保たれ、その数はほとんど減少しなかった。興味深いことにこれらの培地で培養した場合、サイズの小さなスフェロイドが新生した。神経幹細胞用培地あるいは ES 細胞用培地で長期培養したスフェロイドにも CD133 陽性細胞が内在していることを免疫蛍光染色法によって確認した。がん幹細胞様細胞を長期間維持培養する方法として、神経幹細胞用培地あるいは ES 細胞用培地でのスフェロイド培養が有効であることが明らかとなった。

#### (2) スフェロイド分散細胞の継代維持法

スフェロイド分散細胞の CD133 陽性細胞のみを継代維持できる培養法を検討するため、培養容器の接着性及び培地成分を変えて調べた。その結果、シャーレの接着性、-MEM、DMEM、神経幹細胞用培地、ES 細胞用培地などの培地の種類に関わらず、CD133 陽性細胞を増殖させ継代維持することはできなかった。今後さらに検討する必要があることが分かった。

#### (3) がん幹細胞としての形質評価

##### 遊走能・浸潤能

セルソーターで分別回収した CD133 陽性細胞と陰性細胞の遊走率はそれぞれ約 10% と 4% であり、CD133 陽性細胞の遊走率は陰性細胞よりも有意に高かった ( $P < 0.05$ ) (図 3)。浸潤能については信頼できる結果が得られなかった。

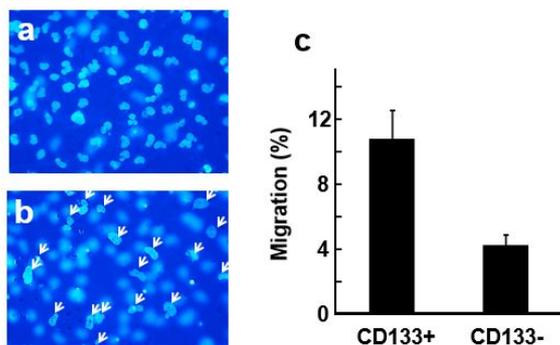


図3. スフェロイド CD133 陽性/陰性細胞の遊走率

a. トランスウェル膜通過前の細胞の核染色像 b. トランスウェル膜通過後の細胞の核染色像 c. CD133 陽性細胞と陰性細胞の遊走率  $\text{Migration}(\%) = \frac{\text{通過後の細胞数}}{\text{通過前後の細胞数}} \times 100$

### 放射線抵抗性

セルソーターで分別回収した CD133 陽性細胞と陰性細胞の X 線感受性をコロニー形成法で調べたところ、CD133 陽性細胞は陰性細胞に比べ約 1.5 倍 X 線抵抗性であった。(図 4)。

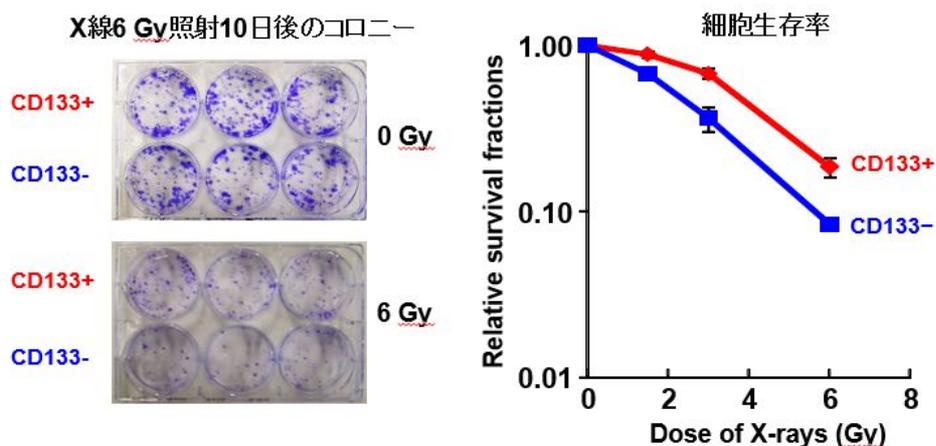


図 4. スフェロイド CD133 陽性/陰性細胞の X 線感受性

### 腫瘍形成能

CD133 陽性細胞と陰性細胞をセルソーターで分別回収した後、ヌードマウスに細胞を移植し、これら細胞の腫瘍形成について調べた。スフェロイド 400 個から回収した約  $10^4$  個の CD133 陽性細胞と陰性細胞を移植し増殖過程の観察を試みたが、どちらの細胞においても腫瘍の形成は観察されなかった。腫瘍が形成されなかった原因として、腫瘍形成に必要な移植細胞数が不十分であったことが考えられる。今後、分別回収し移植する細胞数を増やす必要があると思われる。

### < 引用文献 >

1. Ohnishi K, Tani T, Bando S, Kubota N, Fujii Y, Hatano O, Harada H. Plastic induction of CD133AC133-positive cells in the microenvironment of glioblastoma spheroid. International Journal of Oncology, 45, 581-586, 2014.

### 5 . 主な発表論文等

#### [ 雑誌論文 ] ( 計 2 件 )

1. Ken Ohnishi  
Effectiveness of hyperthermia on cancer stem cells.  
Themal Med, 33: 29-37, 2017.
2. Shin-ichi Bando, Osamu Hatano, Hiroshi Takemori, Nobuo Kubota, Ken Ohnishi  
Potentiality of syringetin for preferential radiosensitization to cancer cells.  
International Journal of Radiation Biology, 93, 286-294, 2017.

#### [ 学会発表 ] ( 計 2 2 件 )

1. 大西健、三澤雅樹、鹿野直人、松本信弘  
LAT1 発現増強による BNCT における中性子線増感  
第 21 回菅原・大西記念癌治療増感シンポジウム in 奈良 (奈良) 2019 年 2 月
2. 大西健、三澤雅樹、鹿野直人、松本信弘  
先端的がん治療のホウ素中性子捕捉療法の前臨床的研究  
第 11 回三大学交流セミナー (阿見) 2019 年 2 月
3. 大西健、三澤雅樹  
BNCT がん治療効果の生物学的な増強戦略  
SAT テクノロジー・ショーケース 2019 (筑波) 2019 年 1 月

4. Ken Ohnishi, Sanae Matsutani, Naoto Sikano  
Overexpression of LAT1 by lipofection enhances BPA intracellular incorporation in glioblastoma cells  
The 18th International Congress on Neutron Capture Therapy (台北) 2018年10月
5. 大西健、藤田智也、高崎真美、松谷早苗、鹿野直人  
がん細胞選択的なアミノ酸トランスポーターLAT1 過剰発現誘導の検討  
第77回日本癌学会学術総会 (大阪) 2018年9月
6. 大西健、相良順一、高崎真美、鹿野直人  
マウス中枢神経系細胞を用いた脳腫瘍ライブイメージングモデルの開発.  
第20回癌治療増感研究シンポジウム (奈良) 2018年2月
7. Masaki Misawa, Ken Ohnishi, Naoto Shikano, Hiraku Fuse, Yoshitaka Matsumoto, Tomoko Okada  
Liposomal Transfection of Amino Acid Transporter LAT1 for Enhanced Uptake of BPA.  
The 8th International Society of Radiation Neurobiology Conference (Tsukuba) February, 2018
8. 大西健  
がん細胞あるいはがん幹細胞様細胞選択的な LAT1 過剰発現による BNCT の検討.  
茨城大学理学部公開シンポジウム第11回 Quantum Medicine 研究会 (水戸) 2018年1月
9. 大西健、坂本裕貴、松谷早苗、鹿野直人  
アミノ酸トランスポーターLAT1 過剰発現による BPA の細胞内取込み増強  
第76回日本癌学会学術総会 (横浜) 2017年9月
10. 三澤雅樹、大西健、坂本裕貴、鹿野直人、松本孔貴、長谷川功紀、岡田朋子  
抗体リポソームによる選択的BPA取込み増強のためのアミノ酸トランスポーターLAT1 遺伝子導入技術の開発  
第14回日本中性子捕捉療法学会 (仙台) 2017年9月
11. 大西健、坂本裕貴、鹿野直人、松谷早苗、三澤雅樹  
アミノ酸トランスポーターLAT1 過剰発現による BPA の細胞内取込み増強の検討  
第60回日本放射線影響学会 (千葉) 2017年9月
12. 大西健、坂本裕貴  
がん幹細胞に対するハイパーサーミアの有効性について  
第34回日本ハイパーサーミア学会 (京都) 2017年9月
13. 秦野修、磯崎勝弘、竹森洋、大西健、岩崎哲史、片桐昌直、川崎英也、一柳優子、荒川隆一  
SALDI と誘導体化によるステロイドホルモンのイオン化法の改良と質量分析イメージングへの応用 第68回イオン反応研究会/第157回質量分析関西談話会/第6回イオン移動度研究会・合同研究会 (奈良) 2017年4月
14. 相良順一、加藤侑希、藤田智也、大西健、岩井浩一  
中枢神経系のグルタチオン維持機構に対するさしま茶抽出物の効果の研究 第9回三大学交流セミナー (阿見) 2017年2月
15. 大西健  
東海村の加速器型中性子発生装置を用いた BNCT の生物実験について. 茨城大学理学部公開シンポジウム第10回 Quantum Medicine 研究会 (水戸) 2017年2月
16. 大西健、坂本裕貴、鹿野直人  
神経膠芽腫細胞におけるアミノ酸トランスポーターLAT1過剰発現によるBPAの細胞内取込み増強. 第20回癌治療増感研究シンポジウム (奈良) 2017年2月
17. Toshiaki Tani, Yuki Sakamoto, Yoshihiro Fujii, Ken Ohnishi  
Usefulness of spheroid originated CD133-positive cells for cancer stem cell-targeting radiotherapy. The 7<sup>th</sup> International Society of Radiation Neurobiology Conference (Niigata) February, 2017
18. Osamu Hatano, Katsuhiko Isozaki, Hiroshi Takemori, Ken Ohnishi, Masanao Katagiri, Hideya Kawasaki, Yuko Ichiyanagi, Ryuichi Arakawa, Norio Kurumatani  
Improvement of Ionization Methods of Steroid Hormones and Application to Imaging Mass Spectrometry

- Intl. Symp. of Biological Mass Spectrometry Oct.14-15th, Tokyo (2016)
19. Ken Ohnishi, Takamitsu Kato  
Preferential radiosensitizing effect of syringetin on cancer cells. 62nd Annual Meeting of the Radiation Research Society (Hawaii) October, 2016
  20. 大西健  
p53 を標的とした分子シャペロン法による細胞の温熱増感(学会賞受賞講演) 日本ハイパーサーミア学会第34回大会(つくば)2016年9月
  21. 谷俊明、福地命、大西健  
HSP90 阻害剤 AUY による神経膠芽腫 CD133 陽性細胞の温熱/放射線増感作用 日本ハイパーサーミア学会第34回大会(つくば)2016年9月
  22. 秦野修、磯崎勝弘、竹森洋、大西健 他7名  
ステロイドホルモンのイオン化法の改良と質量分析イメージングへの応用.  
第64回質量分析総合討論会(大阪)2016年5月

[図書](計2件)

1. Ken Ohnishi  
Part I Basic Science in Cultured Cells, Chapter 7 Thermo-Tolerance, Chapter 8 Enhancement of Hyperthermia on Radio-sensitivity. Kokura S, Yoshikawa T, Ohnishi T (Eds) 「Hyperthermic Oncology from Bench to Bedside」 Springer pp.77-90, 2016.
2. 大西健  
第1章1章 放射線作用の基礎 分子から細胞へ 1.6. 放射線による細胞死  
大西武雄(監)「放射線医科学」 医療科学社(東京) pp.23-25, 2016.

[その他]

ホームページ等

<http://researcher.ipu.ac.jp/cgi-bin/cbdb/db.cgi?page=DBRecord&did=86&qid=350&vid=84&rid=254&sid=634&rev=1&fvid=3029>

[http://www.hs.ipu.ac.jp/files/Ohnishi/map\\_1.htm](http://www.hs.ipu.ac.jp/files/Ohnishi/map_1.htm)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。