

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K18368

研究課題名（和文）人工すい臓がん幹細胞の樹立と放射線増感ナノ粒子によるその治療法

研究課題名（英文）Induction of cancer stem cells in pancreatic cancer cells and their treatment with radiosensitized nanoparticles

研究代表者

西村 勇哉（Nishimura, Yuya）

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・客員准教授

研究者番号：40728218

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：すい臓がん細胞を用いた人工がん幹細胞（iCSC）を樹立した。その結果、ひとつの細胞株においてiPS細胞と同様の形態変化が観察された。その細胞群ではがん幹細胞のマーカーとなる遺伝子発現が確認された。この細胞群をマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析とLCMSMSによるメタボローム解析を行った結果、いくつかの遺伝子および代謝物が優位に上昇していることが確認された。これらのマーカー候補を標的とする抗体がiCSCを特異的に認識するかどうかを評価した結果、コントロール細胞と比較して抗体の結合量増加が確認された。つまり、すい臓がん人工がん幹細胞の標的マーカーが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで取得が困難であったがん幹細胞を人工的に作製することにより、学術的な研究は一気に進むことが考えられる。がん幹細胞の細胞数を確保できることで、これまで不可能であった代謝解析も十分に実施可能となる。また、すい臓がんの人工がん幹細胞が初めて作製されたことで、すい臓がんの治療を目的とする研究に与える影響は大きい。さらに、このすい臓がん人工がん幹細胞のマウスへの移植が確立すれば、これまでのがん細胞株移植マウスとは次元の違う評価が可能と思われる。

研究成果の概要（英文）：We established induced cancer stem cells (iCSCs) using pancreatic cancer cells. As a result, morphological changes similar to iPS cells were observed in one cell line. In the cell group, expression of cancer stem cell marker genes was confirmed. Transcriptome analysis by microarray and metabolome analysis by LCMSMS of this cell group confirmed that several genes and metabolites were significantly increased. As a result of evaluating whether antibodies targeting these marker candidates specifically recognize iCSCs, increased antibody binding was confirmed compared to control cells. Therefore, a target marker for pancreatic cancer induced cancer stem cells was suggested.

研究分野：生物学

キーワード：幹細胞 人工がん幹細胞 すい臓がん 放射線増感 ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

すい臓がんは、初期(ステージ0)で発見されることはほとんど無く、約8割はステージIVの最も進んだ状態で見つかっている。この場合、根治を断念して症状改善のみを目指した抗がん剤による化学治療や放射線治療、またはその両者が行われる事が多い。しかしながら、すい臓がんは放射線に対する感受性が低く、治療効果が低いことが知られている。

また、すい臓がんに限らず、切除したがんの再発や転移が大きな課題であり、そのメカニズムとしてがん幹細胞(Cancer stem cell: CSC)の存在が報告されてきた。CSCはがん細胞の根幹となる細胞で、がん細胞がもつ自己複製能力に加えて分化能力もあるため、ごくわずかな細胞で腫瘍形成が可能である。そのため、このがん幹細胞を完全に根絶することががん治療において求められているが、その性質を解明するには至っていない。その理由は、CSCが腫瘍内に極少量しか存在しないため、分離が困難で解析するほど得られないことにある。そこで本研究ではすい臓がんに着目し、人工的にCSCを作製することでその特徴を解明し、新たな放射線増感治療法に応用する。

2. 研究の目的

すい臓がんを標的とした低侵襲な放射線治療によってがん細胞を根絶することが本研究の最終目標である。そのためには、腫瘍内に存在するがん細胞の根幹で、分化や転移の能力をもつがん幹細胞を死滅させなければならない。しかし、このCSCの性質はあまり解明が進んでいない。その一番の理由は解析に必要な量を確保できないからである。そこで本研究では、iPS細胞と同様にすい臓がん細胞から人工がん幹細胞(iCSC)を作製する。そして、その細胞を利用して、がん幹細胞の特徴をメタボローム解析やトランスクリプトーム解析の観点から分析する。そこで得られた知見からがん幹細胞の標的因子を定め、これまで研究してきたナノ粒子のドラッグデリバリーシステムとX線の併用効果による低侵襲な放射線増感治療の標的とする。

3. 研究の方法

(1) すい臓がん由来 iCSC の樹立

大腸がん(SW480)由来と肺がん(A549)由来のiCSCがすでに樹立されている。この細胞株を樹立した方法(Oshima N. *et al.*, (2014))に従ってすい臓がん細胞株からiCSCへ誘導した。

具体的には、レトロウイルスを用いてすい臓がん細胞株に初期化因子(OCT3/4, SOX2, KLF4)を導入し、その発現をqPCRで確認した。また、細胞の形態変化を顕微鏡で確認した。初期化因子以外にもすい臓がんCSCのマーカーとして報告されている遺伝子(Vaz A.P. *et al.*, (2014))の発現も同様にqPCRで確認した。また、排出能力の差を利用してソートすることでiCSCの濃縮を確認した。

(2) すい臓がん iCSC のマーカー探索

得られたすい臓がんiCSCから細胞抽出物を回収し、CETOF-MSを利用して網羅的なメタボローム解析を行った。また、得られたすい臓がんiCSCからトータルRNAを回収し、トランスクリプトーム解析を行った。これらの解析結果から得られたすい臓がんiCSCのマーカー候補を標的としたAlexa488標識抗体を用いて、フローサイトメーターによって細胞への結合を測定し、すい臓がんiCSCマーカーとなりうるかを評価した。

4. 研究成果

(1) すい臓がん由来 iCSC の樹立

大腸がん(SW480)iCSCの樹立と同様に、すい臓がん細胞株にも初期化因子(OCT3/4, SOX2, KLF4)をレトロウイルスを用いて感染させた。コントロールとして遺伝子が含まれないGateway Plasmid(gw)を利用した。すい臓がん細胞株にはBxPC3、MIAPaCa2、Panc1、AsPC1を用いた。その結果、AsPC1細胞においてのみ、感染から12日目にSW480iCSCと同様の細胞の形態変化が観察された(図1)。

次に、遺伝子発現量を比較するために、細胞群からトータルRNAを抽出した。gwとOSKそれぞれの遺伝子発現量をqPCRで測定し、GAPDHで標準化した値をgwと比較した(図2)。その結果、導入した初期化因子(OCT3/4、

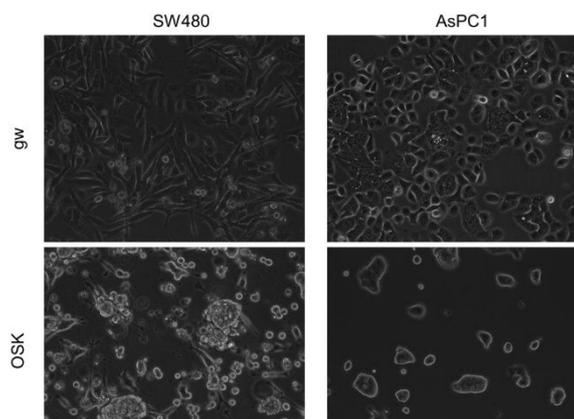


図1 .SW480 と AsPC1 細胞株における初期化因子感染 12 日目の顕微鏡観察写真. gw: Gateway plasmid, OSK: OCT3/4, SOX2, KLF4.

SOX2, KLF4) だけでなく、初期化因子として知られる Nanog 遺伝子の発現量増加も確認された。その他にもすい臓がん CSC のマーカーとして報告されている遺伝子のいくつかが増加した。

さらに、薬剤排出能力が高いとされる CSC の特徴を利用して、すい臓がん iCSC を濃縮可能かどうかを評価した。その方法は、細胞を回収して PBS で洗浄後、PBS (5% FBS、1mM HEPES) に 10^7 cells/mL で再懸濁した。Hoechst33342 とベラパミル (終濃度 100 μ M) を添加し、37 で 30 分間インキュベートした。洗浄後、細胞を PBS (5% FBS、1mM HEPES、100 μ M ベラパミル) に再懸濁し、37 で 30 分間インキュベートした。その後、冷やした HBSS-Hank's 平衡塩溶液 (2% FBS、1 mM HEPES) に培地交換した。測定前に PI (2 μ L/1mL) を添加して緩やかに混合し、40 μ m フィルターに通してからセルソーティングを行った。ベラパミル存在下でも薬剤放出能力が高い細胞群 (OSK V100) を回収し、RNA 抽出して遺伝子発現量を評価した (図 3)。その結果、ソーティングされた OSK V100 細胞群の各遺伝子発現量はソーティング前の OSK 細胞群よりも増加した。つまり、AsPC1 由来のすい臓がん iCSC も薬剤排出能力が高く、この方法で識別および濃縮が可能であることが示された。

(2) すい臓がん iCSC のマーカー探索 すい臓がん iCSC の標的マーカーを探索するため、細胞抽出物のメタボローム解析を行った (図 4)。その結果、gw 細胞と比較して OSK 細胞でいくつかの代謝産物の増加が確認された。その中で、細胞表面で標的マーカーとして機能しうる Choline に着目した。

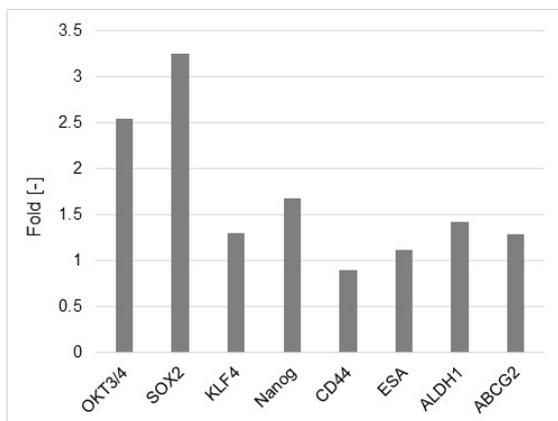


図 2 . 初期化因子を導入した AsPC1 の遺伝子発現量

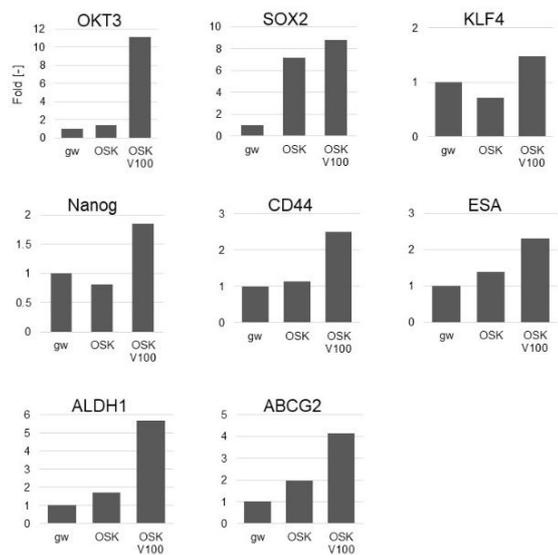


図 3 . ソートされた薬剤排出能力が高い細胞群 (OSK V100) の遺伝子発現量の比較

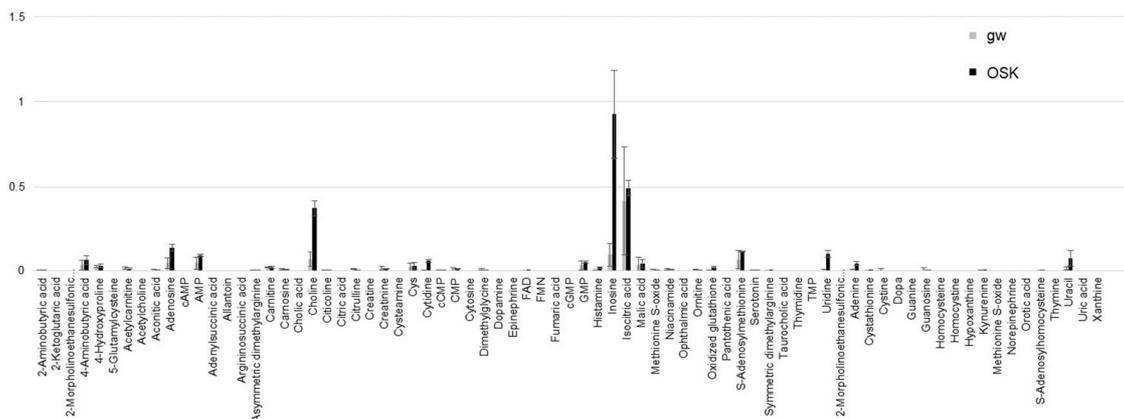


図 4 . AsPC1 細胞の gw 導入細胞と OSK 導入細胞のメタボローム解析の比較

また、メタボローム解析に加えて、トランスクリプトーム解析 (Clariom S Array, Human: タカラバイオ) も行った。その結果、図 5 A のように gw 導入細胞 (青) と OSK 導入細胞 (赤) で異なる傾向が見られた。そこで、詳細なトランスクリプトーム解析を実施し、gw (Control) と OSK (Sample) の Fold change を Scatter plot で示した (図 5 B)。P-value < 0.001 でソートされた Gene symbol を緑で示した。これらの遺伝子の中から、細胞表面に発現し、すい臓がん iCSC の標的マーカーとなりうる候補遺伝子を 8 つ (LRP5、LGR5、LGR6、BMP4、KITLG、TMEM97、NPSR1、FAT1、BMP2) 選択した。

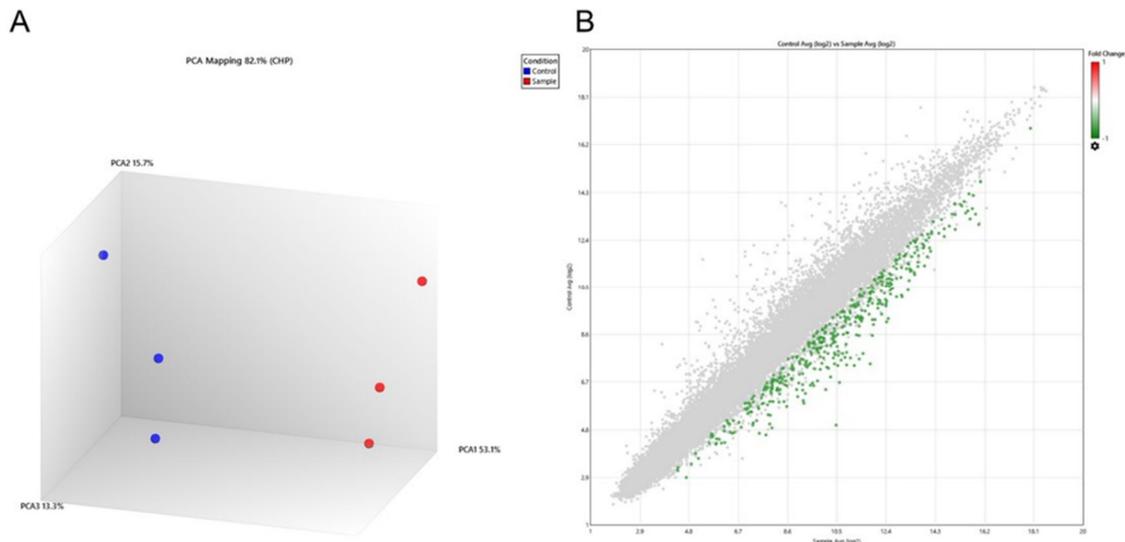


図5 .(A) PCA mapping. gw (Control) 青色と OSK (Sample) 赤色. (B) Scatter plot. gw (Control) と OSK (Sample) .p-value < 0.001 の OSK 遺伝子シンボル緑色.

メタボローム解析とトランスクリプトーム解析によって、9つのすい臓がん iCSC 標的マーカー候補を選択した。これらの候補を標的とする抗体が AsPC1 iCSC を認識するかどうかをフローサイトメーターで評価した (図6)。それぞれ以下の抗体を使用した。LGR5: Human Lgr5/GPR49 Alexa Fluor 488 Antibody (Clone 707042) (R&D Systems) LGR6: Anti-Human Lgr6 Alexa Fluor 488 Antibody (Clone 918719) (R&D Systems) BMP4: Anti-BMP-4, Mouse-Mono(OTI6B7), Alexa Fluor 488 (Novus Biologicals) KITLG: Anti-SCF/c-kit Ligand, Rabbit-Mono(004), Alexa Fluor 488 (Novus Biologicals) NPSR1: Anti-NPSR1 Rabbit Polyclonal Antibody (Alexa Fluor® 488) (Bioss) FAT1: Anti-FAT1 Rabbit Polyclonal Antibody (Alexa Fluor® 488) (Bioss)、BMP2: Anti-BMP2 Polyclonal Antibody, ALEXA FLUOR 488 Conjugated (Bioss)、LRP5: Anti-LRP5 Polyclonal Antibody, ALEXA FLUOR 488 Conjugated (Bioss) Choline:choactase 抗体 (E-7) Alexa Fluor® 488 (Santa Cruz)。その結果、BMP4 と KITLG は SW480 iCSC でも確認されたが、NPSR1 と LRP5 は AsPC1 iCSC のみで確認された。

つまり、NPSR1 と LRP5 はすい臓がん CSC の標的マーカーになりうることを示唆された。

これらの結果、すい臓がん iCSC を樹立し、その細胞標的マーカーをメタボローム解析およびトランスクリプトーム解析によって探索することで、がん治療への応用が示唆された。

引用文献

Nobu Oshima, Yasuhiro Yamada, Satoshi Nagayama, Kenji Kawada, Suguru Hasegawa, Hiroshi Okabe, Yoshiharu Sakai, Takashi Aoi, Induction of cancer stem cell properties in colon cancer cells by defined factors, *PLoS One*. 9(7), 2014.
Arokia Priyanka Vaz, Moorthy P. Ponnusamy, Parthasarathy Seshacharyulu, Surinder K. Batra, A concise review on the current understanding of pancreatic cancer stem cells, *J. Cancer Stem Cell Res.* 2, 2014.

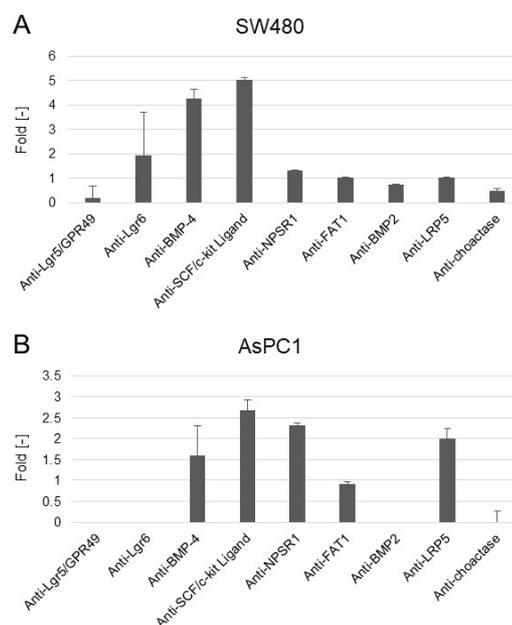


図6 .フローサイトメーターを用いた抗体認識能力の評価 (A) SW480, (B) AsPC1

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------