

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659242

研究課題名（和文）人工多能性幹細胞由来の腸上皮細胞株の確立と大腸癌幹細胞モデルの構築

研究課題名（英文）Generation of intestinal epithelial cell line from induced pluripotent stem cell and establishment of colorectal cancer stem cell model

研究代表者

檜井 孝夫 (HINOI TAKAO)

広島大学・病院・講師

研究者番号：10444689

研究成果の概要（和文）：人工多能性幹細胞(iPS 細胞)は、胚細胞（ES 細胞）を使わない理想的な幹細胞である。本研究では、マウス iPS 細胞から分化誘導した内胚葉系前駆細胞に、腸上皮細胞特異的のホメオボックス転写因子 Cdx2 を遺伝子導入し、正常腸上皮細胞株を樹立する。さらに大腸癌関連遺伝子を遺伝子導入し、iPS 由来大腸癌細胞株を樹立後、網羅的遺伝子解析により、大腸癌関連遺伝子の新規標的遺伝子の同定を試みる。

研究成果の概要（英文）：Induced pluripotent stem cell is the ideal stem cell and it is not necessary to use embryonic stem cell. In this study, we aimed to establish normal intestinal epithelium cell line by progenitor of endoderm induced from mouse iPS cells in the first step and differentiated by gene transfer of intestine-specific homeobox transcription factor CDX2. In the next step, we aim to generate iPS-induced colorectal cancer stem cell line with transformation using gene transfer of colorectal cancer-related gene. By analyzing the these cell lines, we aimed to identify novel target of the colorectal cancer-related genes with the microarray analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	0	1,800,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：小腸大腸肛門外科学

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞は分化した体細胞に 4 種類の遺伝子 Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 を遺伝子導入することで作製可能である。iPS 細胞から心筋細胞や膵島細胞などを分化誘導することが可能となり、再生医療への応用が期待されている。私共は、これまで腸上皮の発生や分化に関連した遺伝子として、腸上皮細胞特異的ホメオボックス転写因子 Cdx2 に着目して研究を行い、Cdx2 が胎生期の非常に早期から発現して、原腸の腸上皮細胞への分化を制御している事を報告してきた。Cdx2 は受精卵(桑実胚期)の栄養芽膜(胎盤)への分化にも関与することが報告された。本研究では、iPS 細胞を特殊な培養条件で内胚葉系の前駆細胞に誘導した後に、Cdx2 を遺伝子導入し、正常腸上皮細胞株の樹立を試みる。本研究の特徴としては、大腸癌研究で使用される培養細胞株は癌組織由来が多く、複合的な遺伝子変異やエピジェネティックな変化により、形質転換し不死化している。そのため、癌関連遺伝子による形質転換の研究をはじめ、生理的条件での解析が必要な様々な研究に大きな制約が発生し、その影響を常に考慮する必要がある。本研究では、マウス iPS 細胞を特殊な培養条件で内胚葉系の Cell lineage (細胞系列) に誘導後、腸上皮特異的ホメオボックス転写因子 Cdx2 により、正常の腸上皮細胞の樹立を目的とする。現在、有用な正常腸上皮細胞株は無く、ヒトの腸上皮細胞はもとより、マウスの腸上皮や浸潤癌細胞からですら、細胞株の樹立は容易ではない。多能性幹細胞である iPS 細胞は、遺伝子導入方法をレトロウイルスからプラスミドに変えたことで、癌化の問題が克服され、様々な細胞への分化誘導とその臨床応用に関する研究が報告されている。しかしながら、いまだ確立された腸上皮細胞への分化誘導法がなく、本研究の最初のチャレンジはこの誘導方法の確立にある。私共は、これまでに一貫して、腸上皮細胞特異的転写因子 Cdx2 の研究を行い、この転写因子が腸上皮細胞の分化と機能の維持に重要な役割を果たしていることを報告してきた。ところが、Cdx2 は他にも桑実胚期に発現し胎盤の一部となる栄養芽層の細胞への分化を誘導すること、体軸形成期では、尾部に発現することがわかってきている。本研究では、iPS 細胞を最終的に腸上皮細胞に分化される内胚葉系の Cell lineage (細胞系列) に誘導することと、そこからさらに Cdx2 の遺伝子導入によって腸上皮細胞への分化誘導をするという、2 つのステップにおける問題点を解決する必要があるが、内胚葉系への誘導条件は、すでに報告されており、再現性を確認するととどめる。内胚葉系の前駆細胞まで誘導し

た後であれば、Cdx2 による腸上皮細胞への分化がより効率的に誘導できると考えており、二段階の分化誘導法を用いて腸上皮細胞まで分化させる方法が確立する。従来、人やマウスの腸管からは腸上皮細胞の初期培養と継代は困難であり、正常の腸上皮細胞の培養細胞株は今のところ存在しない。このため、現在実験に使われている腸上皮細胞株は何らかの方法で不死化しているか、癌細胞由来であり、腸上皮細胞の生理的条件下での *in vitro* の実験系は無い。ところが実際の腸上皮の関与する病態、とくに癌などは、正常の上皮細胞に遺伝子異常が蓄積して発癌や浸潤をおこすことが一般に理解されているが、これらのプロセスを *in vitro* で再構築し癌関連遺伝子の機能解析をするには、正常な腸上皮細胞株が不可欠である。本研究で、癌化していない生理的な腸上皮細胞株が作製された場合、従来の細胞株では影響が不明であった多くの現象について、より詳細な研究成果を得る事が可能となり、大腸癌における発癌や浸潤、転移に関係した新規の遺伝子が同定され、新しいメカニズムが解明される可能性がある。

次に、近年、癌幹細胞研究に関心が集まり、化学療法のターゲットとしても臨床で有用な研究であると考えられている。通常、腸上皮細胞の幹細胞が crypt に存在することがわかっているのは異なり、大腸癌の幹細胞については、そのマーカーや細胞の局在についても、不明な点が多い。本研究では、従来の癌組織や大腸癌細胞株からのスクリーニングとは全く逆の新しい方法により癌幹細胞の実態に迫る。すなわち、iPS 細胞由来の正常腸上皮細胞を大腸癌関連遺伝子によって形質転換(癌化)し、それらの細胞集団の中から、これまでに報告されている CD133 や CD44 などのマーカーで解析するとともに、免疫不全マウスをつかって、これらの癌化した細胞の悪性度を検討し、大腸癌幹細胞の研究に有用な疾患モデルとなる細胞株とその樹立を試みる。iPS 細胞由来の大腸癌細胞株が樹立されれば、既知のマーカーで癌幹細胞の特性を選択できない場合でも、マイクロアレーを利用した網羅的遺伝子解析法により、遺伝子プロファイリングを行い、新規大腸癌幹細胞のマーカーの同定が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、まずマウス iPS 細胞を内胚葉系の前駆細胞へ分化を誘導する方法についての追試を行う。続いて Cdx2 を遺伝子導入して腸上皮細胞株を作製した後、腸上皮細胞のマーカー(villin や CDH17)の発現を解析し確認する。iPS 細胞由来の正常腸上皮細胞が確立された場合、大腸癌関連遺伝子(活性型

S33Y- β -catenin, 活性型 G12V K-ras) の導入により細胞を形質転換する。表現型の変化、網羅的遺伝子解析を行うとともに、癌幹細胞のマーカーについて解析する。

3. 研究の方法

1) iPS 細胞を理研から供与を受け、培養を行う。2) iPS 細胞を activin A と低濃度の血清の存在下で培養し、内胚葉系の細胞への分化を誘導する。3) 内胚葉系に分化した細胞株に Cdx2 を遺伝子導入し、その形質の変化を観察する。4) 1) から 3) までの実験について、レトロウイルスベクターを使わないプラスミドをつかった遺伝子導入を行い、樹立された細胞株の悪性度について transformation アッセイを行い検討する。5) 癌化していない腸上皮細胞株が樹立されたことを確認して、腸上皮細胞における大腸癌関連遺伝子の機能の解析を行う。Wnt シグナルや Ras シグナルの影響を検討するため、 β -catenin の変異型(S33Y- β -catenin) や K-ras の変異型 (G12V K-Ras) などを過剰発現し、それらの影響を網羅的遺伝子解析によって調べる。

平成 22 年度

1) iPS 細胞を activin A と低濃度の血清の存在下で培養する。この条件でマウス ES 細胞が内胚葉系の前駆細胞に分化誘導されること、さらに免疫不全マウスに移植して 5 週間培養すると腸上皮細胞の形態に近い形質をもち、Cdx2 の発現が認められたことが報告されている。そこで、本研究では、二段階に分けて実験を行う。まず、第一段階として、分化誘導用の培養条件下 (activin A と低濃度血清) で iPS 細胞を内胚葉系の細胞に分化を誘導することを目的とする。第二段階としてこれら内胚葉系の前駆細胞に Cdx2 による遺伝子導入を行い、成熟した腸上皮細胞への分化を誘導する。Cdx2 は出生後、腸上皮細胞に特異的に発現し、腸上皮内に存在する幹細胞から腸上皮細胞に分化するとともに、腸上皮細胞としての形態や機能を維持することが知られているが、胎生期では桑実胚期前後で胎盤の形成に関与している事、また体軸形成期では尾部の形成に関与していることが明らかになってきている。そのため Cdx2 に腸上皮細胞への分化促進作用があっても iPS 細胞への直接的な強制発現では、胎児細胞ではなく胎盤への分化を誘導してしまう可能性が高い。したがって、iPS 細胞を一度、内胚葉系の細胞に分化した上で Cdx2 を発現する方が、効率的に腸上皮細胞への誘導が可能になると考える。

2) 平成 23 年度

Cdx2 の遺伝子発現が確認された細胞株が得られた場合、まず腸の分化のマーカー

である villin や私共がこれまで Cdx2 の標的遺伝子 Liver Intestine-cadherin(CDH17) や Hephaestine (HEPH) などの発現を Real time PCR や免疫組織染色法によって確認する。分化誘導された iPS 細胞由来の正常大腸細胞株が癌化していないことを、形質転換アッセイ (コロニーフォーメーションアッセイや細胞株の増殖能の変化など) で検証する。癌化が疑われた場合、2008 年 10 月に山中研から発表されたプラスミドを使って作製された癌化しない iPS 細胞を使って実験を行う。Cdx2 の発現ベクターはレトロウイルス用とプラスミド用が準備されている。癌化していない腸上皮細胞株が樹立された場合、将来的な再生医療目的でも利用可能だが、本研究では正常腸上皮細胞株を利用した癌関連遺伝子の研究に利用する。

次に、正常大腸上皮細胞の形質転換 (癌化) を試みる。孤発性大腸癌の 9 割に遺伝子異常が認められる Wnt シグナルの新規標的遺伝子を同定する目的で β -catenin の変異型(S33Y- β -catenin) や分子標的薬セツキシマブに無効な活性型 K-ras(G12V) を遺伝子導入し、形質転換アッセイで癌化を確認する。DNA マイクロアレーなどの網羅的遺伝子解析を行い、従来の大腸癌細胞株ではマスクされていた新規標的遺伝子の同定を行う。

4. 研究成果

本研究では、マウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17) をフィーダー細胞 (SNL 76/7, MEF(RCHEFC003)) 上で培養して用いた。この維持培養状態からフィーダーおよび分化誘導抑制因子である leukemia inhibitory factor (LIF) を除去し、分化誘導実験を行った。フィーダーレスかつ LIF を添加しない条件下に、hanging drop method によって 6 日間培養することで細胞塊を形成させた。まず予備実験として、この細胞塊を培養ディッシュ上で outgrowth culture を行うと、様々な形態を示す細胞集団を形成し、42 日目に自律収縮運動する集団を確認した。次に、マウス iPS 細胞から正常腸上皮細胞株を樹立する目的で、予備実験で確認された細胞分化が生じる際に腸上皮に分化誘導するため、腸の分化増殖に関与する腸上皮細胞特異的ホメオボックス転写因子 Cdx2 の遺伝子導入を試みた。Hanging drop culture から outgrowth culture を行いつつ、内胚葉系前駆細胞に誘導する目的で高濃度の activin A と低濃度の血清の存在下に培養し、レトロウイルスによる Cdx2 遺伝子導入を試みた。

pBABE-Hygro(RTV-001-hygro)に Cdx2 の cDNA 組み込んだレトロウイルスを作製し、ダイレクトシークエンスでその配列を確認後、CDX2 タンパク非発現大腸癌細胞株である RKO に感染させて、免疫染色でタンパクの発現を確認することで、作製ウイルスが機能することを確認した。その後 outgrowth culture を行い、細胞の分化誘導を以下の方法で評価した。内胚葉系前駆細胞へ誘導後の培養細胞に対して、内胚葉マーカーとなる SOX17 に対する抗体を用いた免疫染色を行った。またウイルス感染後の培養細胞に対して抗 CDX2 抗体による免疫染色を行った。いずれのタンパク発現も増強が見られなかった。続いて Sox17 および Cdx2 遺伝子の発現レベルを比較するために、培養細胞から RNA を回収後、逆転写を行って cDNA を作製した。この cDNA を鋳型として定性的 polymerase chain reaction(PCR)および real time PCR を行ったが、いずれも分化誘導前の細胞と比較して明らかな発現増加を確認できなかった。以上より、マウス iPS 細胞(iPS-MEF-Ng-20D-17)に対して、高濃度の activin A と低濃度血清による培養と、レトロウイルスによる遺伝子導入では有効な分化誘導が得られなかった。現在、他の cell line あるいは自家樹立による iPS 細胞の使用、アデノウイルスなど異なる遺伝子導入方法を継続検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1) Shimomura M, Ikeda S, Takakura Y, Kawaguchi Y, Tokunaga M, Egi H, Hinoi T, Okajima M, Ohdan H. Adequate lymph node examination is essential to ensure the prognostic value of the lymph node ratio in patients with stage III colorectal cancer. *Surg Today*. 査読あり、Oct;41(10): 2011, P1370-9
- 2) Takakura Y, Okajima M, Kanemitsu Y, Kuroda S, Egi H, Hinoi T, Tashiro H, Ohdan H. External validation of two nomograms for predicting patient survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. *World J Surg*。 査読あり、 Oct;35(10): 2011, 2275-82.
- 3) Miguchi M, Takakura Y, Egi H, Hinoi T, Adachi T, Kawaguchi Y, Shinomura M, Tokunaga M, Okajima M, Ohdan H. Malignant peripheral nerve sheath tumor arising from the greater omentum: case

report. *World J Surg Oncol.*, Mar 21;2011, 9-33, 査読あり

4) Matsuda M, Sentani K, Noguchi T, Hinoi T, Okajima M, Matsusaki K, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Oue N, Yasui W. Immunohistochemical analysis of colorectal cancer with gastric phenotype: claudin-18 is associated with poor prognosis. *Pathol Int*. 査読あり、 Oct;60(10): 2010, 673-80.

5) Takakura Y, Hinoi T, Oue N, Sasada T, Kawaguchi Y, Okajima M, Akyol A, Fearon ER, Yasui W, Ohdan H. CDX2 regulates multidrug resistance 1 gene expression in malignant intestinal epithelium. *Cancer Res*. 査読あり、 Sep 1;70(17): 2010, 6767-78.

6) Anami K, Oue N, Noguchi T, Sakamoto N, Sentani K, Hayashi T, Hinoi T, Okajima M, Graff JM, Yasui W. Search for transmembrane protein in gastric cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap: expression of DSC2 in gastric cancer with intestinal phenotype. *J Pathol*. 査読あり、 Jul;221(3): 2010, 275-84.

7) Shimomura M, Ikeda S, Takakura Y, Kawaguchi Y, Tokunaga M, Takeda H, Sumitani D, Yoshimitsu M, Hinoi T, Okajima M, Ohdan H. Gastrointestinal stromal tumors of the small intestine in pediatric populations: a case report and literature review. *Pediatr Surg Int*. 査読あり、 Jun;26(6): 2010, 649-54.

[学会発表] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檜井 孝夫 (HINOI TAKAO)

広島大学・病院・講師

研究者番号：10444689

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：