

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650598

研究課題名(和文)人工多能性幹細胞から作成するがん幹細胞モデルとその応用

研究課題名(英文)Development and characterization of cancer stem cells from iPS cells

研究代表者

妹尾 昌治 (Seno, Masaharu)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：90243493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：がんの発生、転移、再発に深く関与しているがん幹細胞は、がんを根治する為の標的として広く認知されてきている。しかし、がん幹細胞のモデル細胞と呼べるものは従来なく、がん幹細胞を対象とした研究は困難を極めていた。本研究では万能細胞であるiPS細胞から、がんを誘導する環境に置き、がんを生み出すがん幹細胞へと誘導し、性質の異なる複数種のがん幹細胞モデル細胞を作製することに成功した。

研究成果の概要(英文)：It is widely recognized that cancer stem cells (CSCs) are responsible for initiation, metastasis, and recurrence of cancer. The lack of suitable model of CSCs was one of the limiting factors for the progress of CSC research while, for complete cure of cancer, CSCs are considered most important therapeutic targets. In this study, we have succeeded in establishing model cell lines of CSCs, into which h was converted from iPS cells cultured under the cancerous conditions.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：幹細胞 iPS細胞 がん幹細胞 微小環境 分化 培養上清

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年 5月16日現在

1. 研究開始当初の背景

がん組織内には、造腫瘍性の高いがん幹細胞が存在し、正常幹細胞と同様に自己複製を行いつつ、腫瘍を形成する細胞群を生み出すという「がん幹細胞説」が広く認知され、実際に多くのがんでがん幹細胞が分離・同定が試みられていた。しかし、実際の腫瘍内にはそのような細胞は数パーセントしか存在しないとされており、がん幹細胞研究は患者からの限られた細胞に依存していた。このため、がんの根治方法の確立を目指したがん幹細胞研究を強力に推進するには、適切ながん幹細胞の「モデル細胞」が必要であると考えられた。

一方で、再生医療の分野では、体細胞から作製される iPS 細胞に大きな期待が寄せられていたが、当初 iPS 細胞の「がん化」が危惧されていた。しかし iPS 細胞を直接マウスに移植して形成される腫瘍は良性（奇形腫）である。この組織像は言うまでも無く正常に分化した細胞の集合であり、幹細胞の分化はそのおかれる微小環境に制御されており、正常な微小環境では正常に分化誘導されることを示唆している。つまり真の意味での iPS 細胞の「がん化」は、正常な微小環境におかれないことに起因すると考えられる。このことから、この微小環境に「がん性」の因子を存在させることによって、多能性幹細胞をがん幹細胞へと分化誘導するという仮説を立て研究を開始した。

2. 研究の目的

iPS 細胞を用いてがん幹細胞のモデル細胞を作製し、そのモデル系を確立することを本研究の目的とした。幹細胞の分化はそのおかれる微小環境により制御されている。分化誘導因子を含めた微小環境が正常（適切）であれば、特異的な系統へと分化誘導されることが考えられている。がんを誘導する様な微小環境を設定すれば幹細胞はがん幹細胞をへて、がん細胞へと分化するという仮説を立てた。そこで、iPS 細胞を様々ながん細胞由来細胞株と共存させる、或は、その培養上清を添加し、長期間培養を継続した後得られる細胞中にがん幹細胞の形質をもつ細胞が存在すると想定し、がん幹細胞のモデル細胞作製を試みた。生存する細胞に対してがん幹細胞としての条件を満たす性質を解析し、モデル細胞として提唱する。

3. 研究の方法

マウス iPS 細胞は、Nanog プロモーターの制御下で GFP 及びピューロマイシン耐性遺伝子を発現する株（iPS-MEF-20D-17、理研セルバンク、京都大学との使用契約締結）を使用した。種々の株化がん細胞は、ATCC より入手、常法により培養、維持した。

(1) iPS 細胞のがん幹細胞化。株化がん細胞をマイトマイシン処理し、分裂阻害をした後に培養器に播種し、その上に iPS 細胞を播種した。この時、未分化を維持する為の LIF は除いている。未分化 iPS 細胞は GFP の蛍光を観察することで検出した。一ヶ月の培養の後生存していた iPS 細胞は、LIF を含まない幹細胞用培地にて、維持を試みた。また、がん細胞の培養上清を iPS 細胞の培養系に添加する（培地の半量を、毎日培養上清と交換する）系も試み、同様に LIF 不含条件で一ヶ月 iPS 細胞の培養を行い、生存した細胞は LIF を含まない幹細胞用培地にて維持を行った。

(2) 肺がん由来エクソソームによるがん幹細胞化の試み。マウスルイス肺がん細胞株（LLC）の培養上清から、超遠心分離によりエクソソームを含む微小膜小胞画分を調製した。粒子径とマーカー（CD63）の発現により



図1、iPS細胞のがん幹細胞化

エクソソームの存在を確認した後、iPS 細胞の培養系へ添加し、一ヶ月間培養を継続した。iPS 細胞は事前に LIF 不含培地で3日間培養し、分化を促したのち、エクソソームを添加している。

(3) 造腫瘍性の評価。生存した細胞は、免疫不全マウスの皮下に移植し、その造腫瘍性の評価を行った。この時対象として、通常培養した iPS 細胞も移植した。形成された腫瘍は、切片を作製後、各種染色により病理的所見を行った。

(4) がん幹細胞の自己複製能の評価。がん幹細胞の自己複製評価では、血清不含培地中

での浮遊培養系でのスフェロイド形成で評価を行った。この時、成長因子としてインスリン、トランスフェリンを加えている。

(5) 分化能の評価。試験管内での血管内皮細胞分化を評価するため、細胞をマトリゲル上に播種し、内皮細胞用培地 (EGM 培地) をもちいて培養した。24 時間後形成された血管管腔用構造を観察した。また、CD31 抗体をもちいて免疫染色を行い、血管内皮細胞の検出を行った。その他、分化マーカーの発現解析を RT-PCR、ウェスタンブロット解析、FACS 解析により行った。

4. 研究成果

(1) マウス iPS 細胞のがん幹細胞化。種々のがん細胞の培養上清を添加した条件でマウス iPS 細胞培養を一ヶ月間行い得られた細胞は、免疫不全マウスの皮下に移植すると、急激な成長を伴う腫瘍を形成した。その腫瘍の組織学的所見として、未分化な細胞に富み、核異型、核/細胞質比の増大、高頻度な細胞分裂像等が上げられる。特に、ルイス肺がん (LLC) の培養上清を用いて培養した iPS 細胞 (miPS-LLCcm) は、新生血管に富んだ腫瘍 (癌腫様) を形成していた。これらの所見は、本培養法によって iPS 細胞が悪性の腫瘍を形成する能力を獲得したことを示している。正常な iPS 細胞を免疫不全マウスに移植して見られる奇形腫 (テラトーマ、良性腫瘍) は種々の正常組織像を示すもので、これとは明らかに区別されるべき悪性腫瘍である。なお、がん細胞との共培養を行った場合は、悪性腫瘍の形成率は低かった (4 種のがん細胞中 1 種のがん細胞のみ悪性腫瘍形成)。この理由は現段階では明らかではない。

一方、LLC 細胞の分泌するエクソソームを分化途上にある iPS 細胞に供して得られた細胞は、免疫不全マウスで脂肪肉腫様の腫瘍を形成した。また、まれに腹腔内に腫瘍が播種されたマウスも見受けられ、転移・浸潤能の高い腫瘍であった。In vitro での自己復性能の解析、未分化マーカー遺伝子の発現、分化能解析 (以下に示す) 及び二次腫瘍の形成により、本細胞はがん幹細胞としての条件を満たすものであった。

本結果は、胚性幹細胞から遺伝子導入等の人為的手段に依らず、がん幹細胞が試験管内で作製でき、培養維持可能であることを示している。これまでは、がん幹細胞を得るにはがん患者より外科的に切除された腫瘍を用いる他なく、倫理的、患者個人間による差異などの課題点が存在していた。また、このようにして得たがん幹細胞は、試験管内での維

持が困難であり、しばしば免疫不全マウス内での維持が行われる。世界的な動物実験の回避の流れから鑑みても、本研究成果は、がん幹細胞を得る手段として抜きん出ているものと考えられる。加えて、癌腫のがん幹細胞の単離の報告例は多いが、肉腫由来のがん幹細胞の報告例は少なく、ここで作製した脂肪肉腫を形成するがん幹細胞は、モデル細胞としての高い有用性が見込まれる。この細胞に関する詳細な解析、及び、その生成機構については今後の課題であるが、本研究で得られたがん幹細胞モデル細胞は、今後のがん研究に大きく貢献すると考えられる。

(2) がん幹細胞ニッチへの洞察。本研究で作製したがん幹細胞の一つである miPS-LLCcm は試験内の培養系において自立的に幹細胞集団と分化細胞集団を維持していた。このことは、本細胞集団ががん幹細胞自己複製と分化の制御を自ら行っていることを示唆していた。がん幹細胞の自己複製は血管内皮細胞 (実験的には正常血管内皮細胞が用いられている) により促進されることが知られており、一方で腫瘍組織内に見られる血管内皮細胞はがん細胞由来である報告がなされている。

ここで、miPS-LLCcm 細胞の形成する腫瘍では新生血管にとんでいることを踏まえ、本細胞は血管内皮細胞への分化能を有している可能性、及び、がん幹細胞から分化した血管内皮細胞ががん幹細胞の自己複製を制御している可能性について検討を行った。miPS-LLCcm 細胞をマトリゲル上に播種すると血管様構造を形成した。この血管様構造内の中には CD31 陽性細胞が含まれており、本細胞が血管内皮細胞へ分化することが示された。興味深いことに、この血管様構造をとる細胞集団は未分化マーカーを発現している細胞も存在しており、ヘテロな細胞集団であった。興味深いことにがん幹細胞集団のみで培養を継続すると、次第に血管内皮細胞への分可能が失われていくことを見いだした。がん幹細胞の分化能自身には大きな影響はないことから、がん幹細胞からの分化系統の選択は、分化がん細胞からのフィードバック機構の存在を伺わせるものであった。

一方、miPS-LLCcm がん幹細胞集団、及びがん幹細胞と分化細胞を含む集団のそれぞれの培養上清を回収し、それをがん幹細胞の自己複製評価系である浮遊培養でのスフェロイド形成系に添加したところ、両者は明らかにがん幹細胞の自己複製を促進していた。とくに、分化細胞を含む集団からはがん幹細胞

の自己複製に關与する Notch シグナルを活性化する因子を含んでいることが Notch 阻害剤による解析から明になった。ここでスフェロイド形成時に Notch シグナルを消失あるいは阻害すると、その後の血管内皮細胞への分化能が減弱する。よって、miPS-LLCcm がん幹細胞は Notch シグナルのバランスにより自己複製と分化が制御されており、分化型がん細胞、特に血管内皮細胞からは分化系統を維持する分泌因子の存在が示唆された。

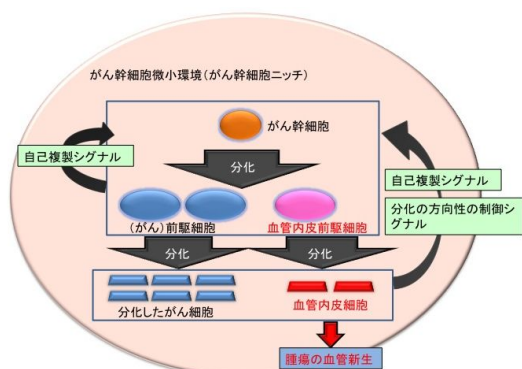


図2. miPS-LLCcm細胞が作るがん幹細胞ニッチ

本研究で得られた miPS-LLCcm 細胞の試験管内での挙動を追うと、がん幹細胞は自らの増幅や分化を制御する微小環境「がん幹細胞ニッチ」を、分化がん細胞を生み出すことにより形成していると考えられる。この概念は腫瘍の成長や腫瘍組織内の不均一性を考えていく上で、重要なものである。がん幹細胞ニッチの細胞レベル、分子レベルでの分化制御機構等の詳細は今後の課題ではあるが、本系はがん幹細胞の可塑性や、腫瘍の不均一性の理解に大きく貢献するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Mouse induced pluripotent stem cell microenvironment generates epithelial-mesenchymal transition in mouse Lewis lung cancer cells. Chen L, Mizutani A, Kasai T, Yan T, Jin G, Vaidyanath A, El-Aarag BY, Liu Y, Kudoh T, Salomon DS, Fu L, Seno M. Am J Cancer Res. 2014 Jan 15;4(1):80-8. eCollection 2014. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3902235/>

がん幹細胞から考えるがんの正体 -クローン説に基づく治療薬/治療法からのパラダイムシフト、妹尾昌治、笠井智成、

村上宏、水谷昭文、化学 vol. 69, No.3, pp 70-71 (2014), 査読無

Cancer stem cells maintain a hierarchy of differentiation by creating their niche. Matsuda S, Yan T, Mizutani A, Sota T, Hiramoto Y, Prieto-Vila M, Chen L, Satoh A, Kudoh T, Kasai T, Murakami H, Fu L, Salomon DS, Seno M. Int J Cancer. 2014 Jul 1;135(1):27-36. doi: 10.1002/ijc.28648. Epub 2013 Dec 9. 査読有

【My Technology】マウス iPS 細胞から作るがん幹細胞モデル、笠井智成、陳凌、工藤孝幸、水谷昭文、妹尾昌治、細胞工学(秀潤社) Vol.32 (No.3) 2013年3月号 pp.330-337, 査読無

A model of cancer stem cells derived from mouse induced pluripotent stem cells. Chen L, Kasai T, Li Y, Sugii Y, Jin G, Okada M, Vaidyanath A, Mizutani A, Satoh A, Kudoh T, Hendrix MJ, Salomon DS, Fu L, Seno M. PLoS One. 2012;7(4):e33544. doi: 10.1371/journal.pone.0033544. Epub 2012 Apr 12. 査読有

〔学会発表〕(計30件)

Seno M. Our cancer stem cell project: past, present and future 第7回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム 2014.2.7 岡山

Matsuda S, Yan T, Mizutani A, Murakami H, Seno M. Cancer stem cells maintain a hierarchy of differentiation by creating their niche 第7回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム 2014.2.7 岡山

Yan T, Mizutani A, Chen L, Hiramoto Y, Takaki M, Murakami H, Seno M. Characterization of cancer stem-like cell converted from mouse iPS cell by tumor derived exosome/microvesicle 第36回日本分子生物学会年会 2013.12.3-6 神戸

Seno M. Cancer stem cells derived from mouse iPS 日印再生医療センター第8回

年次大会 2013.10.19 インド

Mizutani A, Matsuda S, Yan T, Sota T, Kasai T, Murakami H, Kudoh T, Seno M. In vitro niche created by cancer stem-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cell. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013. 2013.4.6-10 アメリカ ワシントン DC

Yan T, Matsuda S, Prieto Vila M, Mizutani A, Murakami H, Seno M. Cancer stem-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cell create a niche to promote self-renewal by themselves. 第35回日本分子生物学会年会 2012.12.11-14 福岡

妹尾昌治 iPS 細胞から作るがん幹細胞モデル：がん幹細胞を誘導する微小環境へのアプローチ 第13回バイオメディカル研究会 2012.10.26 大阪

松田修一、水谷昭文、笠井智成、佐藤あやの、工藤孝幸、陳凌、妹尾昌治 マウス人工多能性幹細胞より誘導したがん幹細胞モデルの生体外解析 日本癌学会 第71回日本癌学会学術総会 2012.9.19-21 札幌

Chen L, Matsuda S, Kasai T, Sugii Y, Okada M, Igarashi K, Satoh A, Kudoh T, Fu L, Seno M. Development and characterization of cancer stem cell model from mouse iPS cells. American Association for Cancer Research, AACR annual meeting 2012. 2012.3.31-4.4 シカゴ

〔図書〕(計2件)

Mizutani A, Chen L, Kasai T, Kudoh T, Murakami H, Fu L, Seno M. Chapter 6 A cancer stem cell model: an insight into the conversion of induced pluripotent stem cells to cancer stem-like cells. In "Cancer Stem Cells (Ed. Rajasekhar K. Vinagolu)", Wiley-Blackwell, 2014, pp79-88. ISBN: 978-1-118-35616-6

Murakami H, Mizutani A, Chen L, Kasai T, Kudoh T, Fu L, Seno M. Cancer stem cells derived from mouse induced

pluripotent stem cells. In "Stem cells and cancer stem cells Volume 11 (Ed. M.A. Hayat)", Springer. 2014, pp 127-133.

doi:10.1007/978-94-007-7329-5_11

〔その他〕

本研究は、クローズアップ現代 (HK、2012.7.2)、真相報道バンキシャ (日本テレビ、2012.10.14) その他、中国地区ローカルニュース、全国紙を含む約 20 紙で取り上げられた。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

妹尾 昌治 (SENO MASAHARU)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：90243493

(2) 研究分担者

水谷 昭文 (MIZUTANI AKIFUMI)

岡山大学・大学院・自然科学研究科・助教

研究者番号：50598331

工藤 孝幸 (KUDOH TAKAYUKI)

岡山大学・大学院・自然科学研究科・助教

研究者番号：00346412