

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 11日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790162

研究課題名（和文） ES/iPS細胞を用いた幹細胞化学発がんメカニズムの解析

研究課題名（英文） Determination of carcinogenic mechanisms in stem cells using ES/iPS cells

研究代表者

岡本 誉士典（OKAMOTO YOSHINORI）

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：50512323

研究成果の概要（和文）：

近年、がん組織中にごん幹細胞が発見され、その起源の一つとして幹細胞のがん化が指摘されている。本研究では、強力な発がん物質である7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセンがマウス胚性幹（mES）細胞に対して引き起こすDNA損傷や異物代謝酵素誘導、未分化状態への影響を検討した。その結果、mES細胞は発がん物質の標的となること、DNA損傷により増殖停止・分化誘導されることが示唆された。この分化誘導は、異常な幹細胞を排除するという幹細胞防御機構の一つであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

There are several reports suggesting that the target of certain carcinogens would be tissue stem cells. To develop a model system assessing carcinogenic activity of chemical compounds in stem cells, we determined chemical-induced DNA damage in murine embryonic stem (mES) cells as well as the expression of xenobiotics-metabolizing enzymes (*Cyp1a1* and *Cyp1b1*) and undifferentiation markers (*Sox2*, *Nanog*, *Oct3/4*, *Dppa5* and alkaline phosphatase ALP). These patterns were compared with murine embryonic fibroblast (MEF), a representative differentiated cell to understand stem cell-specific responses. DNA adducts were detected in a carcinogen 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-treated cells. The level was almost two times higher in MEF as compared with mES cells, indicating a good correlation with the expression magnitude of *Cyp1b1*, not *Cyp1a1*. In mES cells, DMBA treatment suppressed the expression of well-known undifferentiation markers *Sox2*, *Nanog*, *Oct3/4* and *Dppa5*, and decreased ALP-positive cells. 3-Methylcholanthrene-treatment in mES cells induced *Cyps* expression with no detectable DNA adduct formation and no down regulation of undifferentiation markers, indicating that DNA damage induced by DMBA would be responsible for disruption of stemness by which damaged stem cells are being eliminated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：環境系薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：幹細胞発がん、化学発がん物質、DNA付加体、未分化状態、増殖抑制

1. 研究開始当初の背景

近年の幹細胞技術の発達に伴い、われわれ

は幹細胞を未分化な状態で維持培養することが可能になってきた。幹細胞は、自己複製

能と分化能を特徴とする生体ホメオスタシス維持には欠かせない細胞群である。例えば、ヒトの組織が障害を受けた場合には、幹細胞が増殖・分化することにより、新たな細胞を供給することで、損傷部位を修復する。こうした中、幹細胞の負の側面にも注目が集まっている。同じ幹細胞でも「がん幹細胞」と呼ばれる細胞群は、がん組織中に存在し、正常幹細胞がわれわれの組織を修復するのと同様に、抗がん剤あるいは放射線治療により損傷を受けたがん組織を修復してしまうのである。これががんの再発および薬剤耐性化と深い関連があるため、臨床的には「がん幹細胞」を叩く薬剤の開発が進められている。しかしながら、依然として「がん幹細胞」の由来については明らかとされないままである。

2. 研究の目的

これまでに多くの研究によって、がん化した幹細胞「がん幹細胞」ががんの不均一性・転移・再発に関係していることが指摘されているが、その由来については明らかとされていない。生体内各臓器には「組織幹細胞」が存在しており、分化することにより生体のホメオスタシスを維持している。本課題では、この組織幹細胞が発がんと直接関係しているかどうかを明らかとすることを目的として、幹細胞の化学発がんメカニズムについて解析し、幹細胞発がん物質の新規評価系を構築する。

3. 研究の方法

(1)細胞培養：mES 細胞として ES-D3 細胞株 (ACTT より購入) を用いた。mES 細胞はマウス胚性線維芽細胞 (MEF) 上で培養した。培地としては、15% 代替血清および 2 mM グルタミン、1% 非必須アミノ酸、1% ペニシリン-ストレプトマイシン、0.1 mM 2-メルカプトエタノール、1000 U 白血球抑制因子を含むノックアウト DMEM を用いた。処理薬物には、化学発がん物質である 7,12-ジメチルベンズ (a)アントラセン (DMBA) およびその対象として 3-メチルコラントレン (3-MC) を使用した。

(2)³²P-ポストラベリング法：薬物を処理した mES 細胞からゲノム DNA を抽出した。抽出 DNA に対してマイクロコッカルヌクレアーゼおよびアルカリフォスファターゼを処理後、ヌクレアーゼ P1 でヌクレオシドレベルまで分解した。この時、付加体を形成した核酸塩基はヌクレアーゼ P1 に対して抵抗性を示す。これに対して [³²P]-ATP およびポリヌクレオチドキナーゼを処理することで、付加体塩基特異的に ³²P ラベルを導入する。このサンプルをシーケンス電気泳動法により分

離し、放射活性から DNA 付加体を定量した。

(3)アルカリフォスファターゼ試験：mES 細胞をアセトン溶液にて固定後、アルカリフォスファターゼ特異基質により染色した。

(4)リアルタイム RT-PCR：トータル RNA から cDNA を合成後、各種遺伝子特異的プライマーを用いて遺伝子発現レベルを相対定量した。

(5)アポトーシスの測定：TUNEL 試験によりアポトーシス陽性細胞の染色を実施し、蛍光顕微鏡観察によりその割合や細胞コロニーの状態を観察した。

4. 研究成果

mES 細胞および MEF に対して化学発がん物質である DMBA を処理した結果、両細胞において用量依存的に DNA 付加体の生成を確認した。その付加体レベルは mES よりも MEF において高い傾向を示した。これは異物代謝酵素の発現レベルの違いを反映していると考えられる。DMBA 処理をすると mES 細胞のコロニーサイズが顕著に低下し、その後、未分化の指標であるアルカリフォスファターゼ陽性細胞が減少した。各種未分化マーカー (*Sox2*, *Nanog*, *Oct3/4* および *Dppa5*) の発現レベルもまた、DMBA 処理濃度依存的に変動したことから、mES 細胞は DMBA に応答して細胞増殖を停止し、最終的に分化傾向を示していると考えられる。また、コロニーサイズが低下する条件下でさらに mES 細胞を培養すると TUNEL 陽性細胞が観察された。一方、DMBA と類似構造だが DNA 付加体形成の低い 3-メチルコラントレンを処理した場合、このようなコロニーサイズの低下、未分化マーカーの変動および TUNEL 陽性細胞の増加は全く認められなかったことから、これらの細胞応答は DNA 付加体形成によって引き起こされていることが示唆される。したがって、DNA 付加体形成に応答して細胞周期チェックポイント機構が関与して細胞増殖を停止し、DNA 修復能力を上回る DNA 付加体が形成された場合には未分化マーカーの発現低下とアポトーシスを引き起こすものと考えられる。これは、幹細胞がストレス状況下で自己を守るとともに、自ら幹細胞の品質を管理するシステムの一端であると考えられる。

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 4 件)

(1)Okamoto Y., Ushida M., Taniguchi Y., Takada T., Kojima N.: Effects of genistein, kaempferol and daidzein on neural

differentiation of mouse embryonic stem cells. J. Res. Inst. Meijo Univ. (2013) in press. 査読有

(2) Okamoto Y., Nakai T., Ando M., Ueda K., Kojima N.: Induction of the anticancer effects of cisplatin platinum(IV) derivatives against cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. J. Res. Inst. Meijo Univ. (2013) in press. 査読有

(3) Ueda K., Ando M., Okamoto Y., Kojima N.: Manganese neurotoxicity: Interplay with iron in catecholaminergic oxidative stress. J. Res. Inst. Meijo Univ. (2013) in press. 査読有

(4) Liu X., Suzuki N., Laxmi Y.R.S., Okamoto Y., Shibutani S.: Anti-breast cancer potential of daidzein in rodents. Life Sci. 91, 415-419 (2012). 査読有

[学会発表] (計 16 件)

① 岡本 誉士典, 他 4 名, DNA 付加体形成によるマウス胚性幹細胞の未分化状態および自己複製への影響. 日本薬学会第 133 年会 (2013 年 3 月 29 日, 横浜)

② 岡本 誉士典, 他 5 名, 多能性幹細胞の神経系分化誘導と金属による神経毒性研究への応用. 日本薬学会第 133 年会 (2013 年 3 月 28 日, 横浜)

③ 岡本 誉士典, 他 6 名, マウス胚性幹細胞を用いた分化評価系の構築と植物フラボノイド類の効果. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2012 (2012 年 11 月 18 日, 岐阜)

④ 岡本 誉士典, 他 1 名, 幹細胞に対する化学発がん物質の DNA 損傷作用と未分化状態への影響. フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2012 年 10 月 26 日, 名古屋)

⑤ 岡本 誉士典, 他 7 名, フラボノイド類がマウス胚性幹細胞分化に及ぼす影響. フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2012 年 10 月 25 日, 名古屋)

⑥ 岡本 誉士典, エストロゲン様物質によるマウス胚性幹細胞の分化調節. 第 31 回 生体と金属・化学物質に関する研究会 (チョークトーク 2012) (2012 年 8 月 25 日, 広島)

⑦ Yoshinori Okamoto, 他 4 名, Disruption of undifferentiated state accompanied by DNA damage in murine embryonic stem cells induced by 7,12-dimethylbenz (*a*)anthracene. 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (2012 年 7 月 20 日, Sendai, Japan)

⑧ 岡本 誉士典, 他 4 名, マウス胚性幹細胞における 7,12-ジメチルベンズ (*a*)アントラセンの DNA 損傷が引き起こす未分化状態の破綻. 第 39 回日本毒性学会学術年会 (2012 年 7 月

18 日, 仙台)

⑨ 岡本 誉士典, 他 5 名, 化学発がん物質による DNA 損傷が引き起こす幹細胞の未分化状態のゆらぎ. 第 58 回日本薬学会東海支部総会・大会 (2012 年 7 月 7 日, 静岡)

⑩ 岡本 誉士典, 他 4 名, 多環芳香族炭化水素によるマウス胚性幹細胞への DNA 付加体形成と未分化状態への影響. 日本薬学会第 132 年会 (2012 年 3 月 31 日, 札幌)

⑪ 岡本 誉士典, 他 2 名, 遺伝子中のメチル化塩基の迅速・高感度測定法とその応用. 第 4 回名古屋大学「医学・バイオ系知財フェア」 (2011 年 12 月 16 日, 名古屋)

⑫ 岡本 誉士典, 他 4 名, DMBA 曝露によるマウス胚性幹細胞の DNA 損傷および異物代謝酵素発現. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2011 (2011 年 11 月 23 日, 名古屋)

⑬ 岡本 誉士典, 他 4 名, マウス胚性幹細胞において 7,12-ジメチルベンズ (*a*)アントラセンが引き起こす DNA 損傷—分化細胞との比較—。フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー (2011 年 10 月 28 日, 金沢)

⑭ Yoshinori Okamoto, 他 4 名, Induction of xenobiotic-metabolizing enzymes by 3-methylcholanthrene in murine embryonic stem cells. 47th Congress of the European societies of Toxicology (2011 年 8 月 29 日, Paris, France)

⑮ 岡本 誉士典, 他 4 名, マウス胚性幹細胞の 3-メチルコラントレン処理による異物代謝酵素誘導. 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011 年 7 月 11 日, 横浜)

⑯ 岡本 誉士典, 他 4 名, マウス胚性幹細胞の化学物質による異物代謝酵素発現誘導と DNA 損傷. 第 57 回日本薬学会東海支部総会・大会 (2011 年 7 月 9 日, 名古屋)

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: d C、m d C、及び/又は h m d C を測定する方法

発明者: 小嶋仲夫, 岡本 誉士典, 高田達之
権利者: 名城大学, 立命館大学 (共同出願)

種類: 特許

番号: 特開第 2012-233794 号

取得年月日: 平成 24 年 11 月 29 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

http://www-yaku.meijo-u.ac.jp/Research/Laboratory/hygie_chem/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 誉士典 (OKAMOTO YOSHINORI)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：50512323