

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501315

研究課題名(和文)低分子阻害剤スクリーニングに向けた癌幹細胞モデルライブラリーの作製と解析

研究課題名(英文)Generation of cancer stem cell library from iPS cells for development of drug screening system

研究代表者

水谷 昭文(Mizutani, Akifumi)

岡山大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：50598331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：がん幹細胞を中心に据えたがん研究、がん治療薬開発が日々展開されている。本研究ではマウスiPS細胞よりがん幹細胞モデル細胞を種々作成し、これを効果的に殺傷する薬剤スクリーニング系を構築した。また、薬剤をがん幹細胞に効果的に送達するシステム(ドラッグデリバリーシステム)の構築を目的として、がん幹細胞に高発現する遺伝子の探索と、マウス正常組織での発現解析を行い、組織別の標的候補を見出した。

研究成果の概要(英文)：In the study of cancer and development of new anticancer drug, cancer stem cells (CSCs) are now considered to be important targets. In this study, we developed a drug screening system using various mouse iPS-derived cancer stem model cells (miPS-CSCs). In addition, we analyzed the gene expression profiles of miPS-CSCs, which focus on cell surface protein to use targeted drug delivery system. Comparison with normal tissue distribution, we nominated several candidate genes for tissue specific targeting.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん幹細胞 薬剤スクリーニング iPS ドラッグデリバリー がん幹細胞ニッチ エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞の発見以来、この細胞はがん研究の中心を担うようになってきていた。しかしながら、その研究や、大規模な薬剤スクリーニングを行うには、がん幹細胞の希少性が大きな障害となっていた。これを克服するためには、試験管内で培養維持可能な、且つバラエティーに富んだがん幹細胞モデル細胞の樹立が必要であった。当研究室ではマウス人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を種々のがん細胞株培養上清中で培養することにより、miPS 細胞に、がん幹細胞様の性質を獲得させることを見出し、がん幹細胞モデル細胞 (miPS-CSCs) として、提唱してきた。本細胞を用いることで、がん幹細胞の成り立ちとともに、大規模な薬剤スクリーニング系の構築が可能となることが期待された

2. 研究の目的

本研究ではがん細胞が分泌する因子により誘導された miPS 細胞由来がん幹細胞モデル細胞を利用し、その特徴の解析を行う。これらを免疫不全マウスに移植して形成される腫瘍形態をもとに、種々のがん幹細胞モデル細胞の樹立、及び遺伝子発現、分化能を評価し、薬剤標的分子候補の選出を行う。また、低分子化合物ライブラリーを利用し、がん幹細胞に対する障害活性を有する分子のスクリーニング系を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) がん幹細胞モデル細胞の樹立

当研究室でこれまでに樹立してきたがん幹細胞モデル細胞に加え、本研究では新たに、がん細胞 (マウス肺がん細胞) が分泌するエクソソームの iPS 細胞がん幹細胞化への貢献を検証した。がん細胞由来のエクソソームは培養上清から超遠心分離により回収し、miPS 細胞の培養系へ添加し 4 週間培養を行った。この時、未分化維持に必要な LIF は、エクソソーム添加 3 日前から培養系からノ除いており、iPS 細胞は分化を始めている状態のものを用いた。エクソソーム処理期間中は LIF を添加していない。4 週間の培養後、エクソソーム非添加の条件で細胞を増殖させ、免疫不全マウス皮下に移植し、造腫瘍能を確認後、腫瘍より初代培養を行い、細胞株を樹立した。

(2) がん幹細胞モデル細胞が形成するニッチに関する解析

本研究室で作成した miPS-LLCcm 細胞 (マウス肺がん細胞の培養上清でがん幹細胞化) のがん幹細胞の自己複製制御機構について、スフェロイド形成能を指標として解析を行った。ここでは、がん幹細胞より分化してくるがん細胞や、血管内皮細胞からの分泌因子に着目し、miPS-LLCcm 細胞の培養上清をスフェロイド形成培地に添加し、がん幹細胞のスフェロイド形成数を測定した。また、

がん幹細胞集団を濃縮し培養した培養上清も同様にスフェロイド形成能に与える影響を検討した。また、がん幹細胞の自己複製に参与している Notch、Wnt、Hedgehog シグナル関与を、それぞれの阻害剤を用いて検証した。一方で、miPS-LLCcm の血管内皮細胞分化可能については、マトリゲル上での管腔様構造の形成 (tube formation) により評価した。

(3) がん幹細胞モデル細胞を用いた薬剤スクリーニング

種々のがん幹細胞モデル細胞を用いて、がん幹細胞の生育を阻害する化合物のスクリーニングを行った。化合物ライブラリーは文部科学省新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」化学療法基盤支援活動による標準阻害剤キットを用いた。細胞の生存率は MTT アッセイにより求めた。一次スクリーニングで効果が確認された化合物には、より詳細に阻害効果を検証し、IC50 値を算出した。また、細胞死がアポトーシスによるものか否かを、DNA ラダーの検出により評価した。

(4) 標的化薬剤 (DDS) に向けた細胞表面蛋白質遺伝子発現の解析

当研究室で作成している細胞表面蛋白質遺伝子に特化した DNA マイクロアレイデータより、miPS 細胞と miPS-CSC 細胞で発現量が変化している遺伝子を抽出した。ここの細胞における遺伝子の発現を RT-qPCR で確認するとともに、正常マウスの種々の組織における発現量を検証した。

4. 研究成果

(1) がん幹細胞モデル細胞の樹立

当研究室でこれまでに作成した種々の miPS-CSC 細胞を免疫不全マウスに移植し、腫瘍を形成させた後、初代培養を経て造腫瘍性細胞を濃縮した。一方で、肺がんエクソソーム処理を行って作成した細胞の形成する腫瘍を解析したところ、ピメンチン陽性で、脂肪細胞に富んでいる等、脂肪肉腫様の腫瘍であった。二次腫瘍の形成や、分化能、自己複製能の評価をとおして、本細胞は、脂肪肉腫を形成するがん幹細胞と結論した (図 1)。

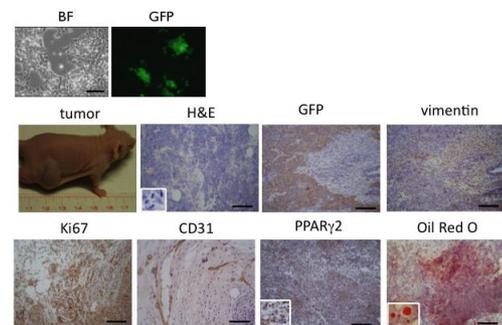


図1 エクソソーム処理により作成したiPS由来がん幹細胞が作成する脂肪肉腫

なお、これまでに報告してきた miPS-CSC は癌腫を形成する。本研究において癌腫、肉腫のがん幹細胞を試験管内で得ることができ、本細胞群は、がん幹細胞ライブラリーとして薬剤スクリーニング等、有用な材料となる。しかし、miPS 細胞からがん幹細胞への形質転換機構については未だ不明であり、この機構の解明が今後必須の課題である。

(2)がん幹細胞モデル細胞が形成するニッチに関する解析

miPS-CSC の代表的な細胞として miPS-LLCcm のがん幹細胞維持機構について、がん幹細胞と分化がん細胞との依存性に着目して解析を行った。本細胞の培養上清中は Notch、Wnt、Hedgehog シグナルを活性化し、がん幹細胞の自己複製を促進していることが明らかになった。ここで、Notch シグナルにさらに解析を進めると、この活性化は、分化がん細胞、特になん幹細胞から得られる血管内皮細胞様細胞が存在するときの培養上清にのみ見られた。しかし、典型的な Notch リガンドは膜タンパク質であり、さらにその発現はがん幹細胞にも確認されることから、本細胞系での Notch 活性化には新規の機構が存在すると推測された。

一方で、がん幹細胞の分化、及び分化の方向も、周囲のがん細胞集団からの因子により制御されていると考えられた。これらのことより、がん幹細胞は分化したがん細胞を生まだしつつ、自身を養う環境・がん幹細胞ニッチを形成していると結論した(図2)。このことはニッチの変化ががん幹細胞の性質の変化をもたらすことを示唆するものである。

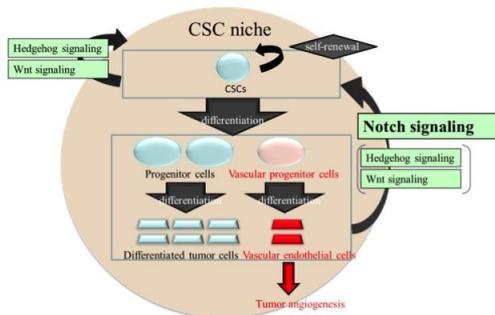


図2 miPS-LLCcm が形成するがん幹細胞ニッチ

がん幹細胞のニッチについては世界的に精力的な研究が進められており、その重要性が認知されてきている。がん幹細胞を対象とした薬剤スクリーニングを行う場合、ニッチを考慮したスクリーニング系の構築が必要であると考えられた。

(3)がん幹細胞モデル細胞を用いた薬剤スクリーニング

本研究に使用している miPS 細胞、miPS-CSC 細胞は Nanog promoter 制御下で GFP 遺伝子、

Puromycin 耐性遺伝子を発現する。したがって、GFP 陽性幹細胞集団の濃縮が可能であり、これを用いてがん幹細胞に対する薬剤のスクリーニング系を構築した。このとき前述(2)の結果をもとに、がん幹細胞ニッチを模倣すべく各々の培養上清をスクリーニング系に添加した。既知の阻害剤(1 μ M)192種類に対する一次スクリーニングから、daunorubicin、Bafilomycin A1 を得た。その後、両薬剤の miPS-CSC 細胞に対する IC50 値を求めたところ、両薬剤ともに数 nM か十数 nM で作用し、効果的に miPS-CSC 細胞に障害を与えた(表)。

表 daunorubicin, Bafilomycin A1 の miPS-CSC に対する IC₅₀ 値

薬剤	miPS-LLCcm		miPS-LLCcm		miPS-LLCcm		miPS-LLCcm		miPS-LLCcm		miPS-LLCcm		Bath/c373	miPS
	LLCcm	primary	LMT	LLCcm	LLCcmPT	LLCcmDT	B16m	P16m	MC-E120a	MC-E120a				
bulk 48h	9.83	11.8	18.7	10.4	14.9	11.4	14.9	10.9	10.9	10.9	10.9	-	x	
bulk 72h	13.3	24.6	25.3	18.5	15.6	11.4	7.53	17.9	12.9	12.9	12.9	-	x	
CSC 48h	3.45	21	8.77	6.87	12.7	14.1	7.42	9.13	10.74	10.74	10.74	x	13.4	
CSC 72h	2.05	26.7	8.89	5.25	12.2	10.9	7.53	23.1	14.58	14.58	14.58	x	14.3	

Bafilomycin A1

薬剤	miPS-LLCcm		miPS-LLCcm		miPS-LLCcm		miPS-LLCcm		miPS-LLCcm		miPS-LLCcm		Bath/c373	miPS
	LLCcm	primary	LMT	LLCcm	LLCcmPT	LLCcmDT	B16m	P16m	MC-E120a	MC-E120a				
bulk 48h	1.38	1.34	1.8	1.14	2.76	2.08	1.62	2.43	3.21	3.21	3.21	-	x	
bulk 72h	1.51	1.78	1.82	1.87	3.08	2.82	1.17	2.49	1.34	3.87	3.87	x	x	
CSC 48h	0.984	2.19	2.28	2.44	2.28	3.04	1.37	3.24	1.44	1.44	1.44	x	1.97	
CSC 72h	0.801	1.88	2.7	2.26	2.9	3.25	1.48	1.78	1.27	1.27	1.27	x	2.14	

両薬剤の誘導する細胞死は DNA ラダーの検出から、アポトーシスが関与していることが見出された。Daunorubicin はその類自体 doxorubicin とともに、抗がん剤として知られており、DNA 障害からアポトーシスを誘導するが、V-ATPase 阻害剤である Bafilomycin A1 がいかにしてアポトーシスを誘導するかは明らかではない。この機構の解析は、がん幹細胞の生存機構を明らかとするとともに、新規がん幹細胞標的分子の開発に貢献するものと思われる。

(4)標的化薬剤(DDS)に向けた細胞表面蛋白質遺伝子発現の解析

がん幹細胞を標的とする DDS の開発に向けて、がん幹細胞表面蛋白質の遺伝子の発現解析を、DNA マイクロアレイを用いて行った。

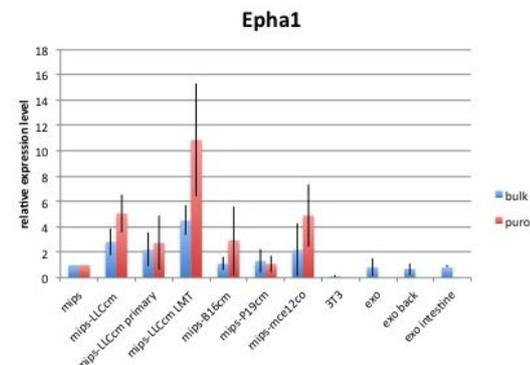


図3 miPS-CSCにおけるEphA1遺伝子の発現

miPS 細胞と比較してそのシグナルが増加している遺伝子を数種選出し、リアルタイム PCR により発現量を求めた。一例を図 3 に示す。

がん幹細胞マーカーや標的分子の同程では、がん細胞とがん幹細胞との比較がよくなされているが、治療を想定した場合、正常組織、正常細胞との比較は必須と思われる。本研究で得られた候補遺伝子の正常組織での発現を検証したところ、幾つかの遺伝子に関しては有為な発現が確認された(表)。

表 標的候補遺伝子の正常組織での発現

	brain	liver	kidney	spleen	lung
EphA1	-	++	+	-	++
EphA2	-	+	-	-	++
Sema4d	+	-	+	++	++
Dll1	+	+	+	++	++

一般に DDS では、腫瘍に特徴的な欠陥構造を利用した EPR 効果により、正常組織への薬剤送達は最小限にとどまることが期待されるが、腫瘍が形成された組織でより発現量が少ない遺伝子を利用することは、副作用をより低減させ、がん患者の QOL の向上に貢献できるものと思われる。

本研究では、miPS 細胞より種々のがん幹細胞モデル細胞を作成し、この細胞を利用したがん幹細胞標的薬剤のスクリーニング系の構築、及び DDS 化を想定した標的遺伝子発現解析を行った。今後、各 miPS-CSC の性質のより詳細な解明とともに、ヒトがん幹細胞との相違点、類似点の解析、薬剤スクリーニングの規模の拡大、候補薬剤 DDS 化が課題である。

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 2 件)

Yan T, Mizutani A, Chen L, Takaki M, Hiramoto Y, Matsuda S, Shigehiro T, Kasai T, Kudoh T, Murakami H, Masuda J, Hendrix MJ, Strizzi L, Salomon DS, Fu L, Seno M. Characterization of cancer stem-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cells transformed by tumor-derived extracellular vesicles. J Cancer, 査読あり Vol.5, No.7, pp.572-584 (2014) doi: 10.7150/jca.8865.

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. Cancer stem cells maintain a hierarchy of differentiation by creating their niche. Int J Cancer, 査読あり Vol.135, No.1, pp.27-36 (2014) doi: 10.1002/ijc.28648

〔学会発表〕(計 10 件)

平本祐樹、渡邊直哉、松田修一、Yan T, Marta P Vila, 水谷昭文、村上宏、笠井智成、妹尾昌治 がん幹細胞ニッチにおけるがん幹細胞の自己複製制御機構の解析 第37 回日本分子生物学会年会 11.25-11.27 (2014) 横浜

Yan T, Mizutani A, Chen L, Murakami H, Seno M. Tumor derived

exosome/microvesicles convert mouse iPS cells to cancer stem-like cells. 第37 回日本癌学会学術総会 9.25-27(2014)横浜

Yan T, Mizutani A, Chen L, Murakami H, Seno M. Tumor derived exosomes/microvesicles convert mouse induced pluripotent stem cells to cancer stem cells. Exosomes & Single cell Analysis Summit 9.18-19(2014)SanDiego USA.

Mizutani A, Matsuda S, Yan T, Prieto-Vila M, Chen L, Satoh A, Kasai T, Masuda J, Kudoh T, Murakami H, Fu L, Salomon DS, Seno M. Cancer stem cells maintain a hierarchy of differentiation by creating their niche. AACR Annual meeting 2014 4.5-9 SanDiego USA

Yan T, Masuda J, Mizutani A, Chen L, Shigehiro T, Matsuda S, Kasai T, Kudoh T, Murakami H, Hendrix MJ, Strizzi L, Salomon DS, Seno M. Characterization of cancer stem-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cells transformed by tumor-derived exosomes/microvesicles. AACR Annual meeting 2014 4.5-9 SanDiego USA.

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. AACR Annual Meeting 2013. 2013.4.6-10 Washington DC. USA.

〔図書〕(計 2 件)

A cancer stem cell model: an insight into the conversion of induced pluripotent stem cells to cancer stem-like cells. Mizutani A, Chen L, Kasai T, Kudoh T, Murakami H, Fu L, Seno M. In “Cancer Stem Cells (Ed. Rajasekhar K. Vinagolu)”, Wiley-Blackwell, 79-88, 2014.

Cancer stem cells derived from mouse induced pluripotent stem cells. Murakami H, Mizutani A, Chen L, Kasai T, Kudoh T, Fu L, Seno M. In “Stem cells and cancer stem cells Volume 11 (Ed. M.A. Hayat)”, Springer. 127-133, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：がん幹細胞及びその用途
発明者：妹尾昌治、水谷昭文、笠井智成
権利者：岡山大学
種類：特許
番号：特願 2014-14778
出願年月日：26 年 1 月 29 日
国内外の別：国内

名称：がん幹細胞を含む細胞集団を得る方法
発明者：妹尾昌治、水谷昭文、笠井智成
権利者：岡山大学、LSIP ファンド運営合同会社
種類：特許
番号：PCT/JP2014/057572
出願年月日：26 年 3 月 19 日
国内外の別：国外

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：