

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501317

研究課題名(和文) 真の癌幹細胞マーカーは、未分化細胞特異的転写因子Oct-3/4であることの証明

研究課題名(英文) Oct-3/4, a member of the family of POU-domain transcriptional factors can be the promising markers for cancer stem cells.

研究代表者

窪田 直子 (Kubota, Naoko)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：40569810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：真の癌幹細胞(cancer stem cell; CSC)マーカーはOct-3/4であると考え、ヒト膵臓癌細胞株であるPANC-1細胞を用いて検証した。

PANC-1細胞でanti-Oct-3/4抗体による染色を行ったところ、23%がOct-3/4陽性だった。一方、PANC-1細胞に環状pOEINプラスミド(マウスOct-3/4プロモーター、EGFP cDNA、neomycin耐性遺伝子発現ユニットを内蔵)を遺伝子導入した結果、一部にEGFP蛍光を示す細胞が確認された。以上から、ヒト膵臓癌細胞株の集団中には真のCSCと考えられるOct-3/4発現細胞が少数ながら存在することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We consider that Oct-3/4, a member of the family of POU-domain transcriptional factors, and alkaline phosphatase (ALP) can be the promising markers for cancer stem cells (CSCs).

Herein, we examined expression of Oct-3/4 and ALP using 6 established human pancreatic carcinoma cell lines. RT-PCR analysis revealed expression of these two mRNAs in those cells. Immunocytochemical and cytochemical staining revealed that these proteins are mosaically present in PANC-1 cell line, one of those 6 cell lines (23% and 19%, respectively). However, Oct-3/4-positive PANC-1 cells did not exhibit overt ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2) activity, as revealed by Hoechst 33342 dye exclusion assay. Transfection of PANC-1 cells with an Oct-3/4 promoter-directed, enhanced green fluorescent protein (EGFP) construct confirmed the presence of Oct-3/4-positive cells. These findings indicate that in PANC-1 cells there are at least 2 subset populations, namely Oct-3/4-positive and ALP-positive cells.

研究分野：小児歯科

キーワード：癌幹細胞 Oct-3/4 遺伝子工学的処理

1. 研究開始当初の背景

癌が幹細胞の性質をもったごく少数の細胞を起源とする仮説は、150年ほど前から既に存在したが、幹細胞の存在自体の証明が難しく、1960年代になり骨髄組織に体性幹細胞が存在することが初めて発見されて以来、癌における幹細胞の同定が盛んになった。特に、flow cytometry の発展により、血液の癌である白血病で、CD133等の幹細胞マーカーを発現する癌幹細胞 (CSC) の存在が証明された。その後、これらマーカーを用いて乳癌、脳腫瘍、大腸癌等で CSC が発見された。

CSC の特徴として、高い増殖性 (自己複製能) 多分化能性等が挙げられる。更に、一部の CSC は抗癌剤への耐性が高いとされ、制癌の主なターゲットとなっている。これまでに単離された乳癌、脳腫瘍、大腸癌等の CSC は確かに前述の criteria を満たすものであったが、少なくとも膵臓癌細胞株を用いて上記マーカーを検索した限りでは、CSC の特徴を見いだせなかった。

これまでの CSC 研究では、CD133, CD44 等の表面抗原マーカーを用いて CSC を単離しているが、上記マーカーは発生学的には着床直後の胚あるいはそれ以降の胚期に発現する抗原である。CSC は自己複製能と多分化能を示すという特徴から発生初期の胚に含まれる未分化な細胞に似ると考えられる。そこで、体性幹細胞などに発現する上記マーカーよりもさらに上位に発現する、いわゆる胚発生のごく初期に発現する分子が CSC のマーカーとなりうるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

未分化細胞特異的転写因子 Oct-3/4 は ES/iPS 細胞、着床前胚 (特に胚盤胞期の内部細胞塊) 着床後初期の円筒胚期の胚性外胚葉、始原生殖細胞、精原細胞等の未分化な細胞にのみ発現し、分化細胞にはほとんど発現が見られないが、体性幹細胞にも Oct-3/4 は発現している。Oct-3/4 は単に未熟な幹細胞に発現するだけでなく、機能的にも重要で、それが無いと発生初期で胚の発生が停止する。また、Oct-3/4 単独で分化細胞である皮膚ケラチノサイトに強制発現させると、未分化な ES 細胞様に脱分化する。ヒトの神経幹細胞の場合、Oct-3/4 過剰発現のみで iPS 細胞が樹立できる。これらの知見は、Oct-3/4 の持続的発現が細胞の未分化状態を維持するのに重要であることを意味する。Chen らの報告では、CD133 陽性非小細胞肺癌由来細胞は、増殖性が高く、抗癌剤への抵抗性を示したが、さらに Oct-3/4 を強発現していた。これは CD133 陽性細胞集団の中に Oct-3/4 陽性細胞が含まれることを意味し、Oct-3/4 陽性細胞が真の CSC という点を示唆する。一方、Sajithlal らによると乳癌細胞株に Oct-3/4-GFP 構築体を遺伝子導入して得られた GFP 蛍光を発する細胞群は、CSC が濃縮された集団であることを見出した。この集

団は抗癌剤にも抵抗性を示し、in vivo 移植後の造腫瘍活性も高かった。

このような観点から、Oct-3/4 を発現する癌細胞が未分化状態を維持したまま増殖し、且つ分化細胞を生む細胞である可能性があり、真の CSC ではないかと考えるに至った。そこで、本申請では、ヒト膵臓癌細胞株集団から Oct-3/4 陽性細胞を濃縮し、それが CSC としての特徴を充たすかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では Oct-3/4 陽性細胞と陰性細胞との集団から成るヒト膵臓癌細胞株 PANC-1 細胞に着目し、それに遺伝子工学的処理を加え、Oct-3/4 陽性株と陰性株を得る。次いで、in vitro での細胞の増殖性、分裂様式、多分化能性、in vivo での造腫瘍性、抗癌剤への抵抗性等を検討し、Oct-3/4 陽性株が CSC としての特徴を備えることを見出す。

1) pOEIN プラスミドのヒト膵臓癌細胞株への遺伝子導入による薬剤耐性クローンの取得

直鎖化 pOEIN プラスミド (Oct-3/4 promoter + EGFP cDNA + poly(A) sites + インスレーター + neomycin 耐性遺伝子発現ユニット [neo] から構成) を PANC-1 細胞株へ遺伝子導入する。遺伝子導入後、細胞を G418 下で選別することで、組み換え細胞を得る。これらは EGFP 発現を指標とした場合、EGFP(+) と (-) を示す細胞に大別期待される。前者では、導入された pOEIN 内の Oct-3/4 プロモーターが働き、下流側の EGFP cDNA の発現を促した結果、EGFP 蛍光を発現するに至った、いわゆる Oct-3/4 陽性株である。後者の場合、pOEIN が組込まれた宿主染色体の部位は活性化領域にあるが、本来的に内在性 Oct-3/4 が発現しておらず、pOEIN 内の Oct-3/4 プロモーターを駆動する細胞質因子が不足していると予想される細胞か、Oct-3/4 promoter 自体が何らかの要因で破壊されていると見られる。以後、Oct-3/4 陽性株 (EGFP 陽性) と Oct-3/4 陰性株 (EGFP 陰性) を実験に用いる。

2) 細胞の増殖性と分裂様式の解析、生化学的、分子生物学的、免疫細胞化学的解析

Oct-3/4 陽性株と Oct-3/4 陰性株に対し、in vitro での増殖速度の検討と、細胞分裂パターンの経時的観察を行う。また、5か月以上の継続培養を行い、Oct-3/4 陽性株が分化細胞である Oct-3/4 陰性細胞に分化するかどうかを検討することで、CSC の特性に合致するか検証する一方で、Oct-3/4 陰性株は陽性株になり得るか、その可能性も模索し、分化細胞から脱分化し、癌になるという脱分化説の検証も行う。

さらに、in vivo での造腫瘍性の検証や、RT-PCR 解析を行い、Oct-3/4 以外の幹細胞や初期胚細胞で発現される分子群についての発現状況を調べる。

3) 他の膵臓癌細胞株についての検討

PANC-1 以外の他のヒト膵臓癌細胞株でも 1-2) 項の解析を行い、Oct-3/4 陽性株と陰性株との間に差があるかどうかを検討する。

4) 特定抗癌剤への抵抗性に関する検討

ABC transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein; Bcrp1) の活性が高い CSC は抗癌剤を積極的に排出するため、抗癌剤の影響を受けにくいと考えられている。一方、Oct-3/4 発現はシスプラチン、ドクソルピシン等の物質の排除に関係があるとされ、それは ABCG2 活性とも相関するとされる。PANC-1 株についても ABCG2 発現レベルが Oct-3/4 陽性株と陰性株の間で異なる可能性があるため、定量的 RT-PCR を用いて ABCG2 mRNA レベルを解析する。

5) 逆遺伝学的手法による検討

内在性の Oct-3/4 mRNA の発現を抑えるための siRNA 発現ベクターを構築し、これを Oct-3/4 陽性株に遺伝子導入し、安定株を得て、この細胞がどの程度 CSC としての特性を失っているかを 2) 項の解析に準じ、検討する。

4. 研究成果

まず初めに、6 種類の膵臓癌細胞株について、Oct-3/4、Sox2、Stellar、Rex-1、アルカリフォスファターゼ (ALP)、ABCG2 の発現を RT-PCR で検証した。その結果、本実験でターゲットとしている PANC-1 細胞には Oct-3/4、Sox2、Stellar、ALP、ABCG2 の発現が認められた (図 1)。

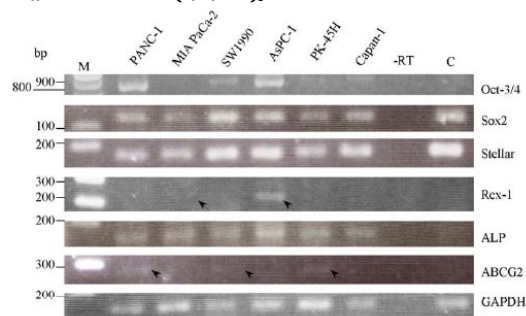


図 1 : 膵臓癌細胞株の遺伝子発現

CSC は癌細胞中では数%しかなく、CSC と非 CSC とが混合した、いわゆるモザイク状態にあるものと考えられる。そこで、細胞化学的手法を用い、PANC-1 細胞での Oct-3/4 と ALP のモザイク的発現状況を検討した。PANC-1 細胞の anti-Oct-3/4 抗体を用いた免疫細胞化学的染色では、23%が Oct-3/4 陽性であった。また、ALP 染色では、19%が ALP 陽性だった。ポジティブコントロールとしてマウス ES 細胞株である F9 を、ネガティブコントロールとしてマウスの胎児皮膚細胞である NIH3T3 を使用した (図 2)。

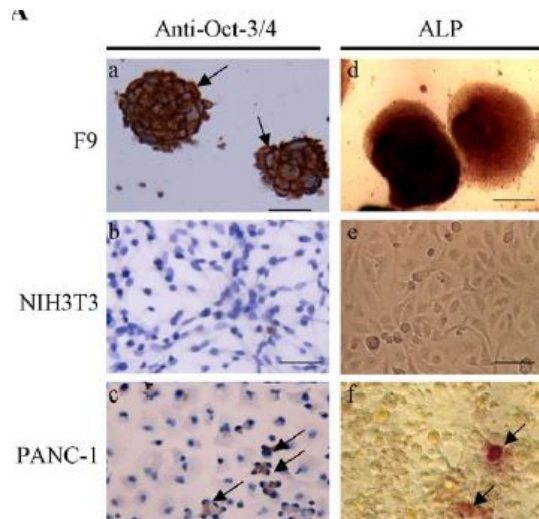


図 2 : 各細胞の ALP 染色

ABCG2 の活性が高い場合、抗癌剤を積極的に排出するため、細胞は抗癌剤の影響を受けにくい。細胞核を特異的に染色する蛍光色素である Hoechst 33342 も ABCG2 の作用を受け、ABCG2 活性の高い細胞 (特に体性幹細胞等 side population と呼ばれる細胞) では、Hoechst 33342 による核染の程度が弱くなる。anti-Oct-3/4 抗体を用いた PANC-1 細胞の免疫細胞化学的染色では、60%が Oct-3/4 陽性であった。しかし、幹細胞 (side population) の特性となる弱い Hoechst 33342 染色性は見られなかった (図 3)。

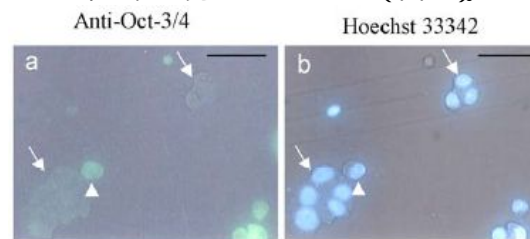


図 3 : PANC-1 細胞 Oct-3/4 染色と Hoechst 33342 染色

Oct-3/4 陽性 PANC-1 細胞を単離すべく、PANC-1 細胞に環状 pOEIN プラスミドを遺伝子導入した。その結果、ごく一部であるが、EGFP 蛍光を示す細胞が確認された。ポジティブコントロールとして F9、ネガティブコントロールとして NIH3T3 にも同様に遺伝子導入を行った結果、F9 のみ、EGFP 蛍光を示す細胞が確認された。以上のことから、PANC-1 細胞の一部 (CSC と目される) は内在性の Oct-3/4 を機能的に発現しているものと考えられた (図 4)。

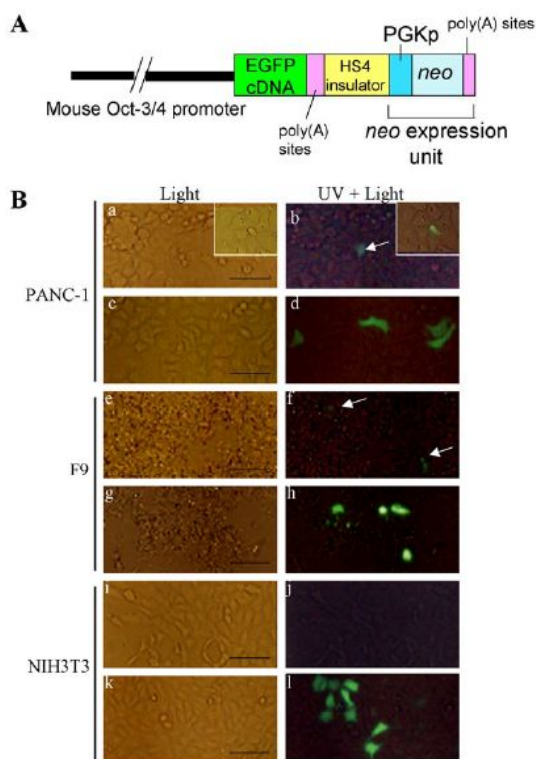


図 4 : PANC-1 細胞への p0EIN プラスミド導入

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 2 件)

1. Sato M, Inada E, Saitoh I, Matsumoto Y, Ohtsuka M, Miura H, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: A combination of targeted toxin technology and the *piggyBac*-mediated gene transfer system enables efficient isolation of stable transfectants in nonhuman mammalian cells. *Biotechnology Journal* 10, 143-153, 2015 DOI: 10.1002/biot.201400283. (査読有)

2. Sato M, Inada E, Saitoh I, Matsumoto Y: An efficient and convenient method for MiniPrep analysis of recombinant plasmids. *Journal of Biomedical Science and Engineering*. 7, 105-107, 2014 DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/jbise.2014.73013> (査読有)

3. Sato M, Maeda S, Inada E, Saitoh I, Kubota N: Mosaic expression of pluripotency-related proteins Oct-3/4 and alkaline phosphatase in human pancreatic carcinoma cell PANC-1. *Advanced Studies in Biology* 5, 157-172, 2013 <http://www.doaj.org/doaj?func=issueTOC&isId=150538&uiLanguage=en> (査読有)

4. Sato M, Kubota N, Inada E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: Hela cells consist of two cell types, as evidenced by

cytochemical staining for alkaline phosphatase activity: A possible model for cancer stem cell study. *Advances in Stem Cells* Article ID 208514, 15 pages, 2013 DOI:10.5171/2013.208514 (査読有)

5. Sato M, Akasaka E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: Targeted toxin-based selectable drug-free enrichment of mammalian cells with high transgene expression. *Biology* 2, 341-355, 2013 DOI:10.3390/biology2010341 (査読有)

6. Sato M, Inada E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: Site-targeted non-viral gene delivery by direct DNA injection into the pancreatic parenchyma and subsequent in vivo electroporation in mice. *Biotechnology Journal* 8, 1355-1361, 2013 DOI:10.1002/biot.201300169 (査読有)

7. Murakami T, Saitoh I, Inada E, Kurosawa M, Iwase Y, Noguchi H, Terao Y, Yamasaki Y, Hayasaki H, Sato M: STO feeder cells are useful for propagation of primarily cultured human deciduous dental pulp cells in view of elimination of contaminated bacteria and promotion of cellular outgrowth. *Cell Medicine* 6, 75-81, 2013 DOI:<http://dx.doi.org/10.3727/215517913X674234> (査読有)

8. Sato M, Inada E, Saitoh I, Matsumoto Y: Microbial and enzyme technology: an efficient and convenient method for MiniPrep analysis of recombinant plasmids. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 7, 105-107, 2013 DOI:10.4236/jbise.2014.73013 (査読有)

9. Takashi K, Noguchi H, Saitoh I, Kataoka H, Watanabe M, Noguchi Y, Fujiwara T: Isolation efficiency of mouse pancreatic stem cells is age-dependent. *Cell Medicine*, 5, 69-73, 2013 DOI:<http://dx.doi.org/10.3727/215517913X666503> (査読有)

10. Sato M, Akasaka E, Saitoh I, Ohtsuka M, Watanabe S: Development of a technique for efficient gene transfer to antral follicular cells in the mouse ovary. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58, 136-141, 2012 DOI:10.3109/19396368.2012.656796. (査読有)

11. Ohtsuka M, Miura H, Nakaoka H, Kimura M, Sato M, Inoko H: Targeted transgenesis through pronuclear injection of improved vectors into *in vitro* fertilized eggs. *Transgenic Research*, 21, 225-226, 2012 DOI:10.1007/s11248-011-9505-y. (査読有)

12. Chi H, Sato M, Yoshida M, Miyoshi K: Expression analysis of a α -1,3-galactosyltransferase, an enzyme that creates xenotransplantation-related α -Gal epitope, in pig preimplantation embryos. *Animal Science Journal*, 83, 88-93, 2012 DOI:10.1111/j.1740-0929.2011.00964.x. (査読有)

13. Chi H., Shinohara M., Yokomine T., Sato M., Takao S., Yoshida M., Miyoshi K: Successful suppression of endogenous α -1,3-galactosyltransferase expression by RNA interference in pig embryos generated in vitro. *Journal of Reproduction and Development*, 58, 69-76, 2012 DOI:http://dx.doi.org/10.1262/jrd.10-165M(査読有)

14. Sato M, Akasaka E, Saitoh I, Ohtsuka M, Watanabe S: *In vivo* gene transfer in mouse preimplantation embryos after intraoviductal injection of plasmid DNA and subsequent *in vivo* electroporation. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, Posted online on, 58, 275-287, 2012 DOI:10.3109/19396368.2012.688088. (査読有)

15. Sato M, Ohtsuka M, Miura H, Miyoshi K, Watanabe S: Determination of the optimal concentration of several selective drugs useful for generating multi-transgenic porcine embryonic fibroblasts. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 759-765, 2012 DOI:10.1111/j.1439-0531.2011.01964.x (査読有)

16. Abe K, Araki K, Tanigawa M, Semba K, Ando T, Sato M, Sakai D, Hiyama A, Mochida J, Yamamura K-I: A Cre knock-in mouse line on the Sickletail locus induces recombination in the notochord and intervertebral disks. *Genesis*, Article first published online, 50, 758-765, 2012 DOI:10.1002/dvg.22035 (査読有)

17. Ohnami N, Nakamura A, Miyado M, Sato M, Kawano N, Yoshida K, Harada Y, Takezawa Y, Kanai S, Ono C, Takahashi Y, Kimura K, Shida T, Miyado K, Umezawa A: CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biology Open*, 1, 640-647, 2012 DOI:10.1242/bio.20121420 (査読有)

18. Sato M, Akasaka E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: A simplified protocol for the semi-large scale recovery of plasmids from *Escherichia coli* grown on agar plates. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 5, 406-408, 2012

DOI.org/10.4236/jbise.2012.57051. (査読有)

19. Sato M, Akasaka E, Saitoh I, Ohtsuka M, Watanabe S: Development of a technique for efficient gene transfer to antral follicular cells in the mouse ovary. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58, 136-141, 2012 DOI:10.3109/19396368.2012.656796. (査読有)

20. Saitoh I, Sato M, Iwase Y, Akasaka E, Yamasaki Y, Noguchi H: Generation of a set of mouse STO feeder cell lines that confer resistance to several types of selective drugs. *Cell Medicine*, 3, 97-102, 2012 DOI:http://dx.doi.org/10.3727/215517912X639414 (査読有)

21. Ohtsuka M, Miura H, Sato M, Kimura M, Inoko H, Gurumurthy CB: PITT : Pronuclear injection-based targeted transgenesis, a reliable transgene expression method in mice, *Experimental animals* 61, 489-502, 2012 DOI: 10.1538/expanim.61.489 (査読有)

22. Ohtsuka M, Miura H, Gurumurthy CB, Kimura M, Inoko H, Yoshimura S, Sato M: Fluorescent transgenic mice suitable for multi-color aggregation chimera studies. *Cell and Tissue Research*, 350, 251-260, 2012 DOI: 10.1007/s00441-012-1470-0. (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

1. Soda M, Saitoh I, Inada E, Murakami T, Iwase Y, Kubota N, Sawami T, Matsumoto Y, Yamasaki Y, Hayasaki H, Ohshima H, Sato M: piggyback transposon mediated gene delivery efficiently generates stable transfectants from HDDPCs and HDDPC derived iPSCs. IADR, Boston, USA, March, 2015

2. 稲田絵美, 齋藤一誠, 窪田直子, 松本祐子, 村上智哉, 澤味規, 山崎要一: PiggyBac トランスポゾンによるヒト乳歯髓細胞からの遺伝子導入安定株の効率的取得、第 52 回日本小児歯科学会、2014 年 5 月 (東京)

3. Murakami T, Saitoh I, Iwase Y, Inada E, Mastuyama J, Ohshima H, Hayasaki H, Sato M: Multipotency of juvenile human buccal epithelial cells. AADR, North Carolina, USA, March, 2014

4. 渡部 聡、梶原景正、麥倉真一郎、桜井敬之、中村伸吾、木村穰、佐藤正宏: gcr2 タンパクは糖鎖を介して I 型 BMP 受容体と結合しシグナル伝達制御に関与する、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 (神戸)

5. 佐藤正宏、三好和睦、長尾洋三、西洋平、大塚正人、中村伸吾、桜井敬之、渡部聡: RISPR/Cas9 による遺伝子編集と標的毒素法

との組み合わせは、 α -1,3-galactosyltransferase 遺伝子を完全に KO したブタ胎仔性線維芽細胞の効率的作製に有効である、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 (神戸)

6. 中村伸吾、前原正明、渡部聡、石原雅之、佐藤正宏：ハイドロダイナミクスに基づく生体内遺伝子導入における外来遺伝子発現のマウス系統差および肝臓ローブ間の差、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 (神戸)

7. Tada N, Kanai F, Nakamura E, Lu H, Saito M, Sato M: Syngenic grafting of a whole male juvenile gonadal tissue into the adult testes confers successful spermatogenesis in mice. The 3rd World Congress of the International Society for Fertility Preservation, Valencia, Spain, 7-9 November, 2013

8. 郡山美優、稲田絵美、齋藤一誠、三浦浩美、大塚正人、中村伸吾、桜井敬之、渡部聡、三好和睦、佐藤正宏、トランスポゾン PiggyBac システムによる複数遺伝子のブタ細胞への同時導入、第 106 回日本繁殖生物学会、2013 年 9 月 (東京)

9. 村上智哉、齋藤一誠、稲田絵美、岩瀬陽子、長谷川大子、窪田直子、松本祐子、大島邦子、岡 暁子、山崎要一、早崎治明、ヒト乳歯歯髓由来 iPS 細胞樹立におけるフィーダー細胞選択の重要性、第 51 回日本小児歯科学会、2013 年 5 月 (岐阜)

10. Sato M, Akasaka E, Ssaito I, Ohtsuka M, Watanabe S, Attempts to produce transgenic mice by a novel in vivo method, as an alternative to the pre-existing pronuclear microinjection- based transgenesis., 11th Transgenic Technology Meeting, Guangzhou City, China, Feb, 2013

11. 佐藤正宏、赤坂恵理、齋藤一誠、大塚正人、渡部聡：マウス成熟卵胞細胞への生体内遺伝子導入法の開発、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月(福岡)

12. 乃村俊樹、齋藤一誠、稲田絵美、長谷川大子、松本祐子、窪田直子、山崎要一、初代ヒト乳歯歯髓細胞における幹細胞特異的遺伝子発現の探索、第 30 回日本小児歯科学会九州地方会大会、2012 年 11 月 (長崎)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田 直子 (KUBOTA, Naoko)
鹿児島大学・歯学総合研究科・助教
研究者番号：40569810

(2) 研究分担者

佐藤 正宏 (SATO, Masahiro)
鹿児島大学・医用ミニブタ先端開発研究センター・教授
研究者番号：30287099

野口 洋文 (NOGUCHI, Hirofumi)
琉球大学医学部・教授
研究者番号：50378733

齋藤 一誠 (SAITOH, Issei)
新潟大学・歯学総合研究科・准教授
研究者番号：90404540

稲田 絵美 (INADA, Emi)
鹿児島大学病院・教授
研究者番号：30448568

齋藤 陽子 (SAITOH, Yoko)
新潟大学・歯学総合研究科・助教
研究者番号：30404487