

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640089

研究課題名(和文) iPS細胞由来の原始下部消化管幹細胞を用いた培養下発がん研究系の開発

研究課題名(英文) Development of in vitro assay system for carcinogenesis using iPS-derived intestinal epithelial stem cells

研究代表者

武藤 倫弘 (Mutoh, Michihiro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・社会と健康研究センター・室長

研究者番号：30392335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：複雑な発がん過程を、正常細胞からの確率的な変化過程として捉え、in vitro環境下で実験的に再現可能かどうかを検証することが本研究の目的である。そのため、iPS細胞として樹立され、既に原始下部消化管幹細胞にまで分化誘導されていると推定される細胞集団に対して長期培養を試み、維持培地による長期培養に成功した。さらに、53継代培養後の細胞において、5 Gyの放射線照射を行ったところ、細胞分化マーカーや腸上皮細胞のマーカーの減少及び、上皮間葉変換した細胞集団を得ることに成功した。現在、細胞における腫瘍性変化の検証を進めている。

研究成果の概要(英文)：<Aim> The processes of carcinogenesis are so complex that they are difficult to reproduce in a cell system. However, establishment of a simple model may accelerate our knowledge of carcinogenetic processes. In the present study, we tried to reproduce carcinogenetic processes by the induction of stochastic changes in vitro. <Methods & Results> We first obtained stem cells from the lower digestive tract derived from iPS cells. The maintenance medium allowed us to culture the cells for more than a half-year without any neoplastic feature changes. We next tried to induce somatic mutation by treating 53-passage-cells with 5 Gy radiation. Five months later, the cells were obviously changed in shape to spindle formation. The molecular markers of differentiation and intestinal epithelium were down-regulated, and we obtained epithelial-mesenchymal transformed cells. <Future plan> We are now evaluating the neoplastic characters using a xenograft model.

研究分野：がん予防学

キーワード：大腸がん iPS 放射線照射 上皮間葉変換

1. 研究開始当初の背景

発がん及びその予防の研究はこれまで主に実験動物と培養細胞株を用いて行われてきた。実験動物を利用した系では、生体に起こる実際の発がん過程類似の段階を経ると推定されるが、不透明な体内環境で過程が進むため、経時的な観察が出来ない。また、実験動物を用いての事象であるために、ヒトでの臨床的な応用については種差に関する検討が必要である。一方、培養細胞を利用する系は、発がん過程におけるシグナル伝達の素過程や分子の挙動の解析には優れた系ではあるが、多くの細胞はがん細胞株を用いて行われている。正常細胞由来の細胞を用いたものでも株化された培養細胞を利用する 경우가多く、不死化細胞という点ではある意味既にがん化している材料と受け取るべきで、文字通りの発がん過程の再現研究にはそぐわない。

申請者はこれまで上記の実験動物 / 培養細胞を利用したがん予防実験研究を一貫して行ってきた (Mutoh M, et al. Cancer Res 2002, 2005; J Biol Chem 2004; Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 2005; Gastroenterology 2011)。がん化学予防剤の開発を含め、動物実験 / 培養細胞実験、それぞれに多くの利点はあるものの、がん化がヒト生体内で正常細胞からの変化として起こる事実を正確に再現しているとは言い切れず、その点が積年呻吟してきた課題であった。ごく最近になって、名古屋市立大学の松永教授のグループが下部消化管幹細胞類似の状態にまで iPS 細胞を安定的に分化させることに成功した。この事実は、長年探し求めていた *in vitro* における正常細胞からの発がん過程解析に適した系が確立できることを示している。

そこで当研究では、近年関連研究の発展が目覚ましい iPS 細胞に特殊な培養処理を

行う事で既に原始下部消化管幹細胞にまで分化誘導されていると推定される細胞集団を利用し、正常細胞からの発がん過程を、経時的な観察可能で、各種実験処理なども行い易い *in vitro* の培養環境下で再現することをではないかと考え、共同研究のもと今回の研究計画を立案した。

当研究の学術的特色と予想される結果 / 意義であるが、従来の発がん研究と比較しての当研究の特色は、正常細胞として iPS 細胞から分化が幾分進んだ原始下部消化管幹細胞を利用することにある。この系が完成すれば、今迄夢物語であった正常細胞からの発がん過程全てを経時的に観察し、様々な処理を人為的に行える実験系が (大腸発がんについてはあるが) 樹立されることになる。これは正常細胞培養が困難で、発がん原因が多岐にわたる固形がんの発がん研究の大きな進歩であり、これまでの発がん研究やがん予防研究手法を一変させる可能性を秘めていると期待される。

2. 研究の目的

本研究は複雑な発がん過程を、正常細胞からの確率的な変化過程として捉え、*in vitro* 環境下で実験的に再現可能かどうかを検証するものである。(1,2) iPS 細胞として樹立され、既に原始下部消化管幹細胞にまで分化誘導されていると推定される細胞集団を長期培養すること (平成 26 年度の達成目標) (3) さらに各種の変異誘発処理 (化学発がん剤投与 / 放射線照射など) を行うことで、生体外培養環境下での発がんを、腫瘍学的各種実験が遂行可能なレベルの確率で起こしうる系を作成すること (平成 27 年度の達成目標) を目的としている。さらにこの培養実験系に各種の環境因子処理を加える事で、発がん確率を有意に下げること (平成 27 年度の達成目標) が可能か、の検討を行う。

3. 研究の方法

<平成26年度の計画>

(1) まずは培養前処理によって原始下部消化管幹細胞にまで分化を誘導した iPS 細胞を入手することから実験を開始する。各種成長因子/サイトカイン/細胞外基質の処理を施すことで、安定的に iPS 細胞を原始下部消化管幹細胞まで分化させうる系は、連携研究者である名古屋市立大学薬学部の松永教授/岩尾助教が既に確立している。この分化誘導済みの原始下部消化管幹細胞集団を分与・入手後、まずは一ヶ月以上の長期にわたっての維持が可能かどうかを検討する。

(2) 同時に、長期培養した際にこの原始下部消化管幹細胞としての性質が維持されるのか、さらにはその中で (spontaneous な DNA レベルでの変異が起こり) がん化が起こりうるのかどうか、ということは未確認なため、現在の培養条件や、組成や環境を一部改変した環境下で長期培養した時に、発がん事象が低頻度でも起こりうるのかを検証する。発がん事象の確認には、コロニー作成やポリープ類似な立体構造の構築といった培養細胞形態観察レベルの肉眼視確認や 大腸がん分子マーカー蛋白質発現のウェスタンブロットや免疫染色による確認に加え、大腸がん発がんの初期過程である Wnt/beta-catenin シグナル伝達系の下流として特に重要と考えられている Tcf/LEF 転写因子依存的な発現をレポーター遺伝子発現系の利用によって確認することを想定している。

(3) 発がん事象の確認が取れた場合には、その条件を詰めると共に、上記にあげた検証やその他の検証 (Q-RT-PCR や *in situ* hybridization による RNA レベルでのマーカー分子発現、細胞生物学的微細構造や増

殖の検証、など)を多方面から行うことで、発がん事象認定精度の向上も計る。

<平成27年度の計画>

(4) 前年度の計画進行具合に大きく依存するものの、平成26年度の時点で低頻度でも発がん事象が確認されれば、平成27年度からはより高頻度/高確率に人為的処理下での発がん事象を起こすべく、化学発がん剤投与/放射線照射による確率向上を試みる。この頻度を上げる処理として、以下の方法を順次組み合わせて行く。

DNA レベルの突然変異頻度上昇処理

大腸発がん実験でよく利用されている化学発がん剤 Azoxymethan(AOM)、2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine(PhIP)、1,2-Dimethyl-hydrazine(DMH)などの添加、放射線照射、さらにはより強力な突然変異誘発試薬添加など

環境レベルの細胞活性化処理

強い活性化処理として炎症性サイトカインや成長因子などの各種リガンド類の培養液への添加、シグナル細胞外基質などシグナル誘起性を持った環境要因の変化、同じく弱い細胞活性化要因として培養液の栄養状態変化(高栄養化/高脂質化)や、各種細胞との共培養など

特定の遺伝子や機能抑制核酸の導入

薬剤依存的に特定のがん遺伝子の発現を誘導可能になるよう構築したベクターの導入や、同様に特定のがん抑制遺伝子に対するノックダウン核酸(shRNA やアンチセンス核酸など)の発現。

(5) 高頻度/高確率での発がん実験系を用いた大腸発がんを抑制するがん化学予防剤の検証。介入試験などで高いがん予防効果が認められているアスピリンなどの抗炎

症薬が、大腸がん予防に機能する機構について検討する。

4. 研究成果

平成 26 年度では、まず連携研究者の研究室で原始下部消化管株細胞にまで分化過程を進めた細胞集団の分与を受けた。(1)この細胞集団では iPS 細胞で発現の高い未分化細胞マーカー分子の発現の大幅な低下と並行して、下部消化管分化マーカーの発現が 1000 倍以上に上昇していた。また、消化管上皮細胞に必須の細胞極性も備えていた。細胞形態の肉眼観察でも、幹細胞様の形態と同時に、分化済細胞に特徴的な形態を示す細胞が存在しており、いくつかの細胞集団が混在しながら安定的に増殖維持が可能な、且つ消化管上皮細胞に特徴的なリサイクリング機構を兼ね備えていると考えられた。次に、この細胞を用いて通常培養条件や一部改変した条件下での長期培養を行った。その結果、2 ヶ月以上の長期維持に成功した。維持培地における FBS など生存に必須の因子を 2 因子明らかにした。(2)長期維持による細胞分化度を評価するための LRP5/6 等のマーカーを 3 つ選別した。(3)また、長期間の培養中、継代を重ねると形態変化が観察されたが、これらに於ける発がん事象を確認する実験系の確立がまだ不十分なまま本年度が終了した。

平成 27 年度では、引き続き原始下部消化管株細胞にまで分化過程を進めた細胞を長期培養したが、コロニー作成やポリープ類似な立体構造の構築といった培養細胞形態観察レベルにおいては、腫瘍性変化を認めなかった。また、接触依存性増殖阻害や免疫不全動物への細胞移植ができないことなど、細胞はがん化していないことを確認した。

(4)より高頻度/高確率に人為的処手下での発がん事象を起こすべく、放射線照射による確率向上を目的に、53 継代培養後

の細胞において、5 Gy の放射線照射を行った。その結果、照射 5 ヶ月後より、紡錘形の明らかな細胞形態変化が見られ始めた。その為、前年度に選別したマーカーを検討した所、非照射細胞と比べ幹細胞に関連する HES1 の著明な低下が観察された。腸上皮細胞のマーカーである CDX2、腸幹細胞マーカーである LGR5 も低下したが、c-Myc や cyclin D1 などの Wnt/beta-catenin シグナル伝達の下流の因子は変動が無かった。また、上皮マーカーである CEACAM1 や CDH1 の低下を認めた。そのため、現在、上皮間葉変換に関わる分子挙動を検索すると同時に免疫不全動物への細胞移植による腫瘍性の評価を進めている。(5)結果が良好であった場合、この系を用い、がん化学予防剤などの添加により、発がん事象頻度を減少できるかどうか(発がん予防が可能かどうか)の検証を行う予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

武藤 倫弘 (MUTOH Michihiro)
国立研究開発法人 国立がん研究センター
社会と健康研究センター 予防研究部
予防研究室 室長
研究者番号：30392335