

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08196

研究課題名(和文) ハイドロゲルによるがん幹細胞誘導システムによる悪性中皮腫の幹細胞マーカーの同定

研究課題名(英文) Identification of cancer stem cell markers in malignant mesothelioma using stemness induction on hydrogel

研究代表者

杉野 弘和 (Sugino, Hirokazu)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医員

研究者番号：50802667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ハイドロゲルを用いて悪性中皮腫のがん幹細胞マーカーの探索を行った。悪性中皮腫の細胞株をハイドロゲル上で培養すると、一般的な幹細胞マーカーとして知られる遺伝子のmRNA発現が亢進した。この結果からハイドロゲルによる幹細胞性誘導法は悪性中皮腫にも応用可能であることが示唆された。ハイドロゲルと網羅的な遺伝子発現解析から、悪性中皮腫のがん幹細胞マーカー分子として、SLC13A5を同定した。さらにSLC13A5は治療抵抗性、酸化リン酸化に関与している可能性があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ハイドロゲルを用いて悪性中皮腫のがん幹細胞マーカーの探索を行い、候補遺伝子としてSLC13A5を同定した。SLC13A5は、クエン酸ナトリウム共輸送体をコードする遺伝子として知られるが、これまでに悪性中皮腫との関連は報告がない。本研究では、幹細胞性や治療抵抗性に関与している可能性を見出しており、新たな治療標的となる可能性が期待される。また本研究で用いた手法は、他のがんにも応用できる可能性があり、がん幹細胞マーカーを見るための新しい手法として、様々な癌腫の治療標的の探索に貢献できる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：We explored cancer stem cell markers in malignant mesothelioma on hydrogel. We found that the mRNA expression of pan-stem cell markers were upregulated by culturing mesothelioma cell lines on hydrogel, indicating that mesothelioma stem cell-like cells could be induced. Microarray analysis of these mesothelioma stem cell-like cells identified SLC13A5 as a candidate gene for cancer stem cell markers of mesothelioma. SLC13A5 is known as a gene encoding the sodium/citrate cotransporter. HEK293T cells with SLC13A5 overexpression showed increased protein expression of SOX2. Furthermore, HEK293T cells with SLC13A5 overexpression exhibited resistance to cisplatin and increased oxidative phosphorylation.

研究分野：中皮腫

キーワード：悪性中皮腫 ハイドロゲル がん幹細胞

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は中皮細胞の悪性腫瘍で、70-80%がアスベスト曝露との関連と言われている。アスベスト曝露から発症までは25-50年とされ、現在も発症数は増加の一途を辿っており、発症のピークは2030年頃と言われている。治療の進歩により多くの癌の年齢調整死亡率が減少にあるが、悪性中皮腫は5年生存率15%と予後不良である。治療の問題点は再発、転移を来し、予後の改善に至らないことにある。

がん幹細胞は、自己複製能と多分化能を有するがん細胞であり、一部の腫瘍はがん幹細胞からなる少数の集団により腫瘍の成長が維持されていると考えられている。また、がん幹細胞は再発、転移、薬剤耐性の獲得にも関与しているとも言われている。しかし、がん幹細胞は腫瘍中に少数しか存在しないため同定が難しく、解析が進まないのが現状である。

申請者らは、北海道大学で独自に開発されたハイドロゲルを用いて、24時間という極めて短時間でがん幹細胞性を誘導することに成功した (**Nature Biomedical Engineering**, 2021, 5(8), 914-925、特許第7115749号、国際出願番号JP2018005884)。具体的にはポリアクリルアミドを基盤とした2種類のポリマーゲルをネットワーク化したDouble-Networkゲル(DNゲル)上に癌細胞を播種すると、直後から急速に細胞の凝集がはじまり24時間で球体形成(スフィア形成)が起こり、SOX2、NANOG、OCT3/4などの幹細胞性マーカー遺伝子発現が増加する。このハイドロゲルによるがん幹細胞性の誘導法は、がん幹細胞の解析への応用が期待されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ハイドロゲルを利用したがん幹細胞性誘導法により、悪性中皮腫のがん幹細胞性を誘導し、がん幹細胞の分子マーカーを同定することである。特にがん幹細胞の細胞表面に特異的に発現するタンパク質に着目し、抗体治療の標的分子を得るための基盤を創出する。これまで悪性中皮腫においてもがん幹細胞を同定する試みが行われてきたが、治療標的はいまだに見つかっていない。これまでの研究ではフローサイトメトリーを用いたside population法が利用されている。特定の分子や細胞のサイズなどに着目し、分布が異なる細胞分画を取得し、がん幹細胞の性質の有無を検討する方法である。本研究で用いるハイドロゲルによるがん幹細胞性の誘導法は、これまでと異なるアプローチの方法であり、新規の分子マーカーの同定が期待される。

3. 研究の方法

(1) 候補分子の選定

- ①ハイドロゲルによる悪性中皮腫細胞株の培養: ハイドロゲルとして、DNゲル、PCDME (poly(N-carboxymethyl-N, N-dimethyl-2-methacryloyloxy ethanaminium))、PNaSS (poly(sodium p-styrene sulfonate)) を用いた。DNゲルは、PAMPS (poly(2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid))とPDMAAm (poly(N, N'-dimethylacrylamide))で構成される。悪性中皮腫の培養細胞(211H, H2052, ACC-MESO-4, H28)をハイドロゲル上で培養し、形態変化と一般的な幹細胞マーカーとされるSOX2, Nanog, Oct3/4のmRNAの発現を調べた。DNゲル上での培養時間と、各mRNAの発現の関係をreal time PCR法で調べた。
- ②マイクロアレイ: DNゲル、polystyrene (PS) dish、ultra-low attachment surface dishの3条件でACC-MESO-4を培養し、遺伝子発現解析マイクロアレイによりRNA発現を調べた。
- ③タンパク質の発現・局在の確認: マイクロアレイで同定した候補分子について、ウエスタンブロッティング法、免疫細胞化学、免疫蛍光染色により、タンパク質発現を検討した。

(2) 癌幹細胞性の検討

- ①DNゲル上培養細胞のXenograft (皮下移植モデル): PS dish、DN gel上で3日間培養したMeso4細胞 1.0×10^5 個、 1.0×10^4 個、 1.0×10^3 個をヌードマウスの背部皮下に移植した。
- ②PNaSSゲル上細胞のXenograft (腹壁移植モデル): tdTOMATO-Luc2発現MST0-211H細胞(1×10^3 個)をPNaSSゲルで3日間培養した。腹膜直下の腹壁にPS dish、PNaSSゲル上培養したACC-MESO-4細胞 5×10^4 個、MST0-211H細胞 1×10^3 個をそれぞれ移植した。腹腔内の腫瘍形成は、in vivo ルシフェリンを腹腔内投与し、IVIS imaging systemにて発光強度(total photon数)を計測することにより評価した。

(3) 候補分子の機能解析

- ①SLC13A5過剰発現によるシグナル伝達解析: HEK293Tに3xFlag-SLC13A5を導入し、SLC13A5の一過性過剰発現細胞を作製した。SLC13A5の下流分子として報告されているタンパク質や中皮腫幹細胞との関連が報告されているタンパク質などの発現をウエスタンブロット法で調べた。
- ②SLC13A5過剰発現による代謝解析: 基礎呼吸をアッセイ培地(1 mM ピルビン酸ナトリウム、

10 mM グルコース、2 mM グルタミン) 中で測定後、オリゴマイシン (1 μ M) を添加し、XFp extracellular flux analyzer (Agilent Technologies, Inc.) により ATP 産生関連呼吸を測定した。続いて、結合阻害剤 Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP, 1 μ M) を添加し、最大呼吸を測定した。最後に、ロテノンとアンチマイシン A (各 0.5 μ M) を併用し、非ミトコンドリア呼吸を測定した。

③SLC13A5 過剰発現による薬剤耐性評価: SLC13A5 を過剰発現させた HEK293T をシスプラチン添加培地で 24 時間培養し、生存率を測定した。

4. 研究成果

(1) 候補分子の選定

①ハイドロゲルによる悪性中皮腫細胞株の培養:

悪性中皮腫の細胞株を DN ゲル上で培養すると、すべての細胞株で腫瘍細胞が集塊を形成した。一般的な幹細胞マーカーとして知られる SOX2、NANOG、OCT3/4 の mRNA を qPCR 法で調べると、SOX2、NANOG、OCT3/4 の発現増加を認めた。これにより DN ゲルによる癌幹細胞性誘導法は、悪性中皮腫の細胞株にも応用可能であることが示唆される。

北大医学研究院腫瘍病理学教室において、DN gel 以外のハイドロゲルである PCDME (poly(N-carboxymethyl-N, N-dimethyl-2-methacryloyloxy ethanaminium))、PNaSS (poly(sodium p-styrene sulfonate)) による幹細胞性誘導の有用性を示す結果が出ていることを受け、本研究でも PCDME と PNaSS を検討することにした(これらのハイドロゲルを使用する可能性は当初から計画していた)。PCDME ゲル、PNaSS ゲルで培養すると培養細胞はゲルに接着し、PS dish 上に比べて突起の長い双極性または芒星状の形態を示した。

②マイクロアレイ: Polystyrene dish や ultra-low attachment surface dish で培養した比較対照群に対して、20 倍以上の遺伝子発現増加を示す 23 遺伝子を同定した。細胞膜への局在が予測されている 8 遺伝子に着目し、qPCR 法で遺伝子発現の増加が確認できたのは 4 遺伝子であった。ACC-MESO-4 以外の細胞株 (211H, H2052, H2452, H28) でも 4 遺伝子の発現を qPCR 法で調べ、発現増加を示した 3 遺伝子 (*SLC13A5*、*TMEM151B*、*HCRTR2*) を候補とした。PCDME、PNaSS による培養でも候補 3 分子の遺伝子発現が有意に増加した。また、Gene Set Enrichment Analysis では、DN ゲル培養条件ではクエン酸回路に関わる遺伝子群の発現亢進が示唆された。

③タンパク質の発現・局在の確認: 3 候補分子について、各種ゲル上で 1×10^5 個/mL の密度で 3 日間培養した ACC-MESO-4 細胞のウェスタンブロッティングを行ったところ、*SLC13A5* のタンパク質の発現増加を認めた。*TMEM151B*、*HCRTR2* については、PS dish 上細胞と各種ゲル上細胞との間に明らかな変化は認めなかった。免疫組織化学染色では PS ディッシュに対して DN ゲル、PCDME ゲル、PNaSS ゲル上培養細胞において、細胞膜および細胞質に *SLC13A5* の染色性増強を認めた。免疫蛍光染色では、PS dish に対していずれのゲル上でも高い蛍光強度を示す細胞が確認された。免疫細胞化学染色および免疫蛍光染色の結果から、ハイドロゲル上で培養することにより、*SLC13A5* 蛋白の発現が誘導されることが示唆された。

(2) 癌幹細胞性の検討

①DN ゲル上培養細胞の Xenograft (皮下移植モデル): DN ゲル上で培養した ACC-MESO-4 を用いてマウス Xenograft を行い、In vivo 腫瘍形成能を評価した。 1.0×10^5 個を移植した場合、DN ゲル上培養+粒子状 DN ゲルを混注したマウス 2 匹いずれにも腫瘍形成を認め、PS dish では 1 匹に腫瘍形成を認めた。

②PNaSS ゲル上細胞の Xenograft (腹壁移植モデル): PNaSS ゲル上 MST0-211H 細胞で有意な発光強度の増加を認めた。その結果、ACC-MESO-4 細胞では 5 週目に PS ディッシュで 2/4 匹、PNaSS ゲルで 3/4 匹に発光強度の増加が認められた。また、MST0-211H 細胞は 7 週目に PNaSS ゲルで 2/4 匹の発光増強を認めた。PS ディッシュには発光は認められなかった。このことから、PNaSS ゲル上培養細胞は PS ディッシュ上培養細胞と比較して早期の腫瘍形成を可能にすることが示唆された。

(3) 候補分子の機能解析

①SLC13A5 過剰発現によるシグナル伝達解析: SLC13A5 過剰発現により、コントロールと比較して phospho-ERK1/2 と SOX2、phospho-YAP の発現が増加することが示唆された。

②SLC13A5 過剰発現による代謝解析: 過剰発現細胞において、基礎呼吸活性と最大呼吸活性の有意な亢進を認め、OCR/ECAR 比も有意に増加し酸化的リン酸化 (OXPHOS) へのシフトが見られた。

③SLC13A5 過剰発現による薬剤耐性評価: 結果、過剰発現群はコントロール群よりも高い IC50 を示し、シスプラチンに対する抵抗性を示した。

ハイドロゲルを用いて悪性中皮腫のがん幹細胞マーカーの探索を行った。ハイドロゲルとして DN ゲルを用いることを研究計画の基盤としているが、研究計画の途中で、新規開発されたハイドロゲルである PCDME、PNaSS の有用性を示す知見が、北海道大学腫瘍病理学教室で得られたため、本研究でも PCDME、PNaSS を研究計画に取り入れた。PCDME、PNaSS の有用性が見出された場合に、これらのハイドロゲルを利用することは当初から計画していた。

悪性中皮腫のがん幹細胞マーカーの候補遺伝子として *SCL13A5* を見出し、*SCL13A5* が幹細胞性の誘導や 治療抵抗性に関与する可能性や、酸化的リン酸化へのシフトに関与している可能性を示した。第 112 回日本病理学会総会で研究成果を発表し、現在は論文化を目指している。ハイドロゲルを用いるがん幹細胞性誘導は、既存の手法とは異なるアプローチであり、がん幹細胞マーカー探索の新しい方法の一つとなり、研究成果が社会に還元されることを期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ukeba Daisuke, Yamada Katsuhisa, Suyama Takashi, Lebl Darren R., Tsujimoto Takeru, Nonoyama Takayuki, Sugino Hirokazu, Iwasaki Norimasa, Watanabe Masatoki, Matsuzaki Yumi, Sudo Hideki	4. 巻 76
2. 論文標題 Combination of ultra-purified stem cells with an in situ-forming bioresorbable gel enhances intervertebral disc regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eBioMedicine	6. 最初と最後の頁 103845 ~ 103845
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom.2022.103845	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yanpeng Sun, Masumi Tsuda, Lei Wang, Hirokazu Sugino, Jian Ping Gong, Shinya Tanaka
2. 発表標題 Effect of scaffold stiffness on hydrogel-induced cancer stemness of cancer model cells
3. 学会等名 The 39th Sapporo International Cancer Symposium（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	津田 真寿美 (Tsuda Masumi) (30431307)	北海道大学・医学研究院・准教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------