

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640079

研究課題名(和文)人工多能性幹細胞をがん幹細胞へ誘導する分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms involved in the conversion of iPSs into cancer stem cells

研究代表者

妹尾 昌治 (Seno, Masaharu)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：90243493

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)：人工多能性幹細胞から自然発生的にがん幹細胞を誘導する過程において、いかなる細胞内の変化が惹起されるかを求めた。細胞外の刺激を伝達する様々な細胞内経路の阻害剤を添加し、がん幹細胞化に必要な経路を求めたところ、GSK3beta阻害、MEK阻害ががん幹細胞化を促進する事が明らかとなった。さらに、がん幹細胞化に伴う遺伝子発現変化、遺伝子変異以外のがん幹細胞化の特徴を求め、がん幹細胞を生み出す細胞内変化の知見を得た。

研究成果の概要(英文)：During the process of cancer stem cells (CSC) generation from induced pluripotent stem cells (iPS), we investigated which signaling pathways were involved in the CSC generation. By screening from various signal inhibitors, we found that the GSK3beta and MEK inhibition promoted CSC generation. In addition, we performed the comprehensive gene expression and epigenetic analysis to find out the intracellular change(s), and nominated candidate genes that might be contributing to the CSC generation.

研究分野：総合生物

キーワード：iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

がん細胞の内、ごく少数細胞のみが自己複製能と、造腫瘍性が低い欠けている細胞群を造成する能力を持ち(がん幹細胞)これが増殖することによって多様性を持つ腫瘍が形成されるという「がん幹細胞」説は、広く認識されるようになった。がん幹細胞の存在は種々な形で示される一方で、外来遺伝子導入以外の、自然発生的ながん幹細胞発生のメカニズムについては、未だ報告が無い。

がん幹細胞の自然発生的なメカニズムは、根源的ながんの治療に結びつく事は明らかである。がん幹細胞の根源を幹細胞に求めれば、遺伝子導入などのリプログラミングに依らず、幹細胞からがん幹細胞を生み出すニッチにより、多くのがん化を再現して新たな研究に取り組む事が可能になると考え、我々は、がん由来細胞株の培養液をニッチに見立てて iPS 細胞を培養し、未分化な状態を保って増殖する細胞群を得てがん幹細胞モデルとして発表した。半世紀近くに及び重点的な研究対象であったがんに対して、依然として決定的な治療方法が見出せていない現状を打開し、根本的に観点を改めてがん研究を見直す原点となる研究である。

2. 研究の目的

人工多能性幹細胞(iPS細胞)からがん幹細胞を誘導する過程に於いて、誘起される細胞内の変化に着目し、これを網羅的に解析して、がん幹細胞が誘導されるメカニズムを解明する。我々は iPS 細胞をがん由来細胞の培養液を用いて培養するとがん幹細胞様の性質をもつ細胞が得られることを世界で初めて報告した。本研究では、がん由来細胞の培養液とともに iPS 細胞からがん幹細胞を誘導する化合物を探索する。見つかる化合物の中から非変異原性の化合物を中心に選択して iPS 細胞内に誘起される変化を種々の手法により網羅的に解析する。これにより iPS 細胞からがん幹細胞が生成する機序を詳細に記述する。

本研究でがん幹細胞発生のメカニズムが証明できれば、がんの根治を目指す新しい方向性を与える事ができる。

3. 研究の方法

iPS 細胞ががん幹細胞へ分化する過程における細胞の変化を網羅的に解析して、がん幹細胞生成のメカニズムを明らかにする為、「がん由来細胞株の培養上清」の効果に影響を示す非変異原性化合物の探索を行った。選出された候補化合物存在下での iPS 細胞に引き起こされる変化を遺伝子発現プロファイル、エピジェネティクスの面からがん幹細胞化の時系列を含めて検討して、iPS 細胞ががん幹細胞へ変化していくメカニズムの解明を試みた。

(1) iPS 細胞のがん幹細胞化に影響を及ぼす化合物の検索。

化合物による幹細胞のがん幹細胞化の影響を評価するにあたり、これまでがん幹細胞作成の実績がある miPS 細胞と LLC 細胞培養上精(CM)の組み合わせでがん幹細胞化を誘導した。この時キナーゼ阻害剤、増殖・分化に関わる種々のシグナル伝達経路阻害剤を添加し、その細胞形体や、GFP 蛍光をレポーターとした Nanog 遺伝子発現のモニタリングを指標として培養を行った。化合物を添加することでより GFP 蛍光が見られるものを、がん幹細胞化促進物質、GFP 蛍光を減少させるものをがん幹細胞化抑制物質の候補化合物として選出した。選出した化合物存在化で iPS 細胞の CM によるがん幹細胞化を行い、造腫瘍能を免疫不全マウス皮下移植系で確認した。

(2) iPS 細胞のがん幹細胞化での網羅的遺伝子発現解析、がん幹細胞のエピジェネティック解析。

化合物添加条件でがん幹細胞誘導した細胞(6日間の培養)についての網羅的遺伝子発現解析を、DNA マイクロアレイにより行った。また、解析には球面自己組織化マップ(sSOM)を利用し、その遺伝子発現プロファイルと化合物(阻害剤)の作用点からがん幹細胞化に関与するシグナル経路を推定した。

また、これまで作成したがん幹細胞株のエピジェネティック解析を行い、親株 iPS 細胞との比較を通してゲノムメチル化が変化している領域の同定を試みた。

(3) 化合物作用点からの in silico がん幹細胞化パスウェイの解析。

がん幹細胞化に影響を与える化合物、影響を与えなかった化合物の作用点を化合物データベース Pubchem より検索し、作用標的候補リストを作成した。これらの関与するパスウェイ解析を行い、がん幹細胞化に関係するシグナル伝達経路の推定を行った。

また、既知キナーゼ阻害剤とキナーゼ構造とのドッキングシミュレーション、sSOM を利用した化合物のクラスタリングを行った。

4. 研究成果

(1) 化合物による幹細胞のがん幹細胞化の影響を評価するにあたり、これまでがん幹細胞作成の実績がある miPS 細胞と LLC 細胞培養上精(CM)の組み合わせで造腫瘍性、幹細胞マーカー遺伝子発現の経時変化を確認した。最短一週間の CM 処理で外因の LIF 非依存的に継代可能な細胞が取得できるが、造腫瘍性獲得には4週間の CM 処理が必要であった。この時2週間目から親株 miPS 細胞と比較して Nanog の高発現が確認された。多くのがん、がん幹細胞で Nanog の高発現が報告されている。したがって、GFP 発現をレポーターとして Nanog 発現を指標とし、約10日の CM 処

理中の GFP 蛍光を変化させる化合物を検索した。その結果、MEK 阻害剤、GSK3beta 阻害剤ががん幹細胞化を促進する物質として得られた。これらの化合物存在下での CM 処理により iPS 細胞の造腫瘍能獲得も 3 週間で確認され、早期にがん幹細胞化が起きていることが確認された。今回見出された阻害剤は正常幹細胞では幹細胞性維持に関わるものとして知られている。本実験系においては、がん幹細胞化は細胞分化の極初期に起きているものと推測された。さらに、GSK3beta の阻害は Wnt シグナルの活性化を推測させるものであるが、大腸癌等の発生初期に APC 変異による Wnt シグナル更新を考えると、癌幹細胞の発生に Wnt シグナルが大きく貢献していることが考えられた。

本研究では上記阻害剤以外、複数の候補化合物を得ている。今後、これらの化合物に対しての解析に努め、がん幹細胞発生にかかるシグナル伝達経路の解明を進める予定である。一方で、がん幹細胞化に対し抑制的に働く化合物も得られており、これらは幹細胞の分化を促進するものとして知られている。この知見はがん幹細胞の分化誘導療法に大きく貢献するものと思われ、こちらの解析も重要な課題となっている。

(2) iPS 細胞のがん幹細胞化での網羅的遺伝子発現解析、がん幹細胞のエピジェネティック解析。

幹細胞からがん幹細胞に変化する過程で発現変動する遺伝子を、網羅的解析、sSOM を通じて同定を試みた。本研究では先の解析でがん幹細胞化促進効果が見られた MEK 阻害剤存在下、がん幹細胞化の極初期の変化を見出すため、培養 6 日目のサンプルを調整し、親株 iPS 細胞、化合物非添加条件等で比較した。その結果、CM 処理によりがん幹細胞化の初期では 158 種の遺伝子が高発現し、100 種類の遺伝子が抑制されていた。個々の遺伝子の詳細な解析は今後の課題であるが、MEK 阻害剤存在下でも共通して発現している 11 遺伝子を見出した。RT-PCR で遺伝子発現変動の確認できたもの（ケモカインの一種）に関して、がん幹細胞化過程での経事変化を確認すると、MEK 阻害剤存在下ではその発現は早期に検出されることがわかった。

本遺伝子発現と MEK 経路との関連は明らかではないが、ケモカイン/ケモカインレセプターの経路ががん幹細胞化に寄与している可能性が見出された。興味深いことに、この遺伝子の発現は、同様にがん幹細胞化促進効果がみられた GSK3beta 活性状態下ではことなる発現パターンを示していた。このことは、がん幹細胞化のプロセスにおいて異なるシグナル伝達経路の活性化（抑制）により異なる種類のがん幹細胞が生じる可能性、或いは同一がん幹細胞が異なるプロセスで生み出される可能性を示唆するものである。

本研究では、遺伝子発現解析と合わせて、

エピジェネティック解析も行った。親株 iPS 細胞と比較して CM 処理で作成したがん幹細胞のゲノム DNA 状態を比較すると、hypomethylation 領域が多数見られた。現在これらの領域の詳細な解析を進めている。あわせて、遺伝子発現解析結果との比較、照合を進める予定である。

今後は、メタボロミクス、プロテオミクスといった網羅的解析を行い、本研究で得られた知見を統合し総合的なパスウェイ解析を進めることで、がん幹細胞化関連シグナル同定、マップ化が可能と思われる。これより得られる知見は、新規がん治療標的の発見にも大きく貢献すると考えられる。

(3) 化合物作用点からの in silico がん幹細胞化パスウェイの解析。

iPS 細胞からがん幹細胞化に関連するタンパク質、シグナル伝達経路の詳細な解析と選択するシグナル阻害剤の妥当性を検証する為、in silico での検討を行った。前述の細胞を用いた化合物評価から、がん幹細胞化には多数のキナーゼが関与することが推測された。そこでキナーゼの酵素活性ポケット構造を sSOM 解析によりクラスタリングを行い、その分類と低分子化合物のドッキングシミュレーションをするアプローチを検討した。現在のところクラスタリング精度改善の必要性が見受けられるものの、この解析を進めることにより、キナーゼ阻害剤の未知の標的が明らかになることが期待される。

一方で、化合物データベース Pubchem を利用して、化合物評価実験の結果をもとに、がん化抑制化合物作用標的リストを作成した。ここでは 123 種類の作用標的候補が得られ、これらより 12 種類の候補パスウェイを見出した。この結果より、より効果の高いがん幹細胞化抑制化合物を見出すことが期待される。

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 15 件)

Calle AS, Nair N, Oo AK, Prieto-Vila M, Koga M, Khayrani AC, Hussein M, Hurley L, Vaidyanath A, Seno A, Iwasaki Y, Calle M, Kasai T, Seno M, A new PDAC mouse model originated from iPSCs-converted pancreatic cancer stem cells (CSCcm), Am J Cancer Res, 査読有, 6 巻, 2016, pp2799-2815, <http://www.ajcr.us/files/ajcr0043435.pdf>

Seno A, Kasai T, Ikeda M, Vaidyanath A, Masuda J, Mizutani A, Murakami H, Ishikawa T, Seno M, Characterization of Gene Expression Patterns among Artificially Developed Cancer Stem Cells Using Spherical Self-Organizing Map、

Cancer Inform. 査読有、15 巻、2016、pp163-178、DOI: 10.4137/CIN.S39839

Y. Sugii, T. Kasai, M. Ikeda, A. Vaidyanath, K. Kumon, A. Mizutani, A. Seno, H. Tokutaka, T. Kudoh, M. Seno, A Unique Procedure to Identify Cell Surface Markers Through a Spherical Self-Organizing Map Applied to DNA Microarray Analysis、Biomarkers in Cancer、査読有、8 巻、2016、pp17-23、10.4137/BIC.S33542.

工藤 孝幸、妹尾昌治、球面自己組織化マップを用いたキナーゼパネルアッセイデータのクラスタリング、日本化学会情報化学部会誌、査読無、34 巻、2016、pp2-5、<http://doi.org/10.11546/cicsj.34.2>

M. Ikeda, K. Kumon, K. Omoto, Y. Sugii, A. Mizutani, A. Vaidyanath, T. Kudoh, T. Kasai, S. Masuda, M. Seno, Spherical Self-organizing Map Detects MYBL1 as Candidate Gene for Triple-Negative Breast Cancer、Neuroscience and Biomedical Engineering、査読有、3 巻、2015、pp94-101、10.2174/2213385203666151026235610

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、Journal of Cancer、7 巻、2014、572-584、10.7150/jca.8865

Kasai T, Chen L, Mizutani A, Kudoh T, Murakami H, Fu L, Seno M, Cancer stem cells converted from pluripotent stem cells and the cancerous niche、Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine、査読有、1 巻、2014、pp2-7、<http://www.pubstemcell.com/monthly/uploads/010010200002.pdf>

Ogawa M, Umeda IO, Kosugi M, Kawai A, Hamaya Y, Takashima M, Yin H, Kudoh T, Seno M, Magata Y, Development of ¹¹¹In-labeled liposomes for vulnerable atherosclerotic plaque imaging、Journal of Nuclear Medicine、査読有、1 巻、2014、pp115-20、10.2967/jnumed.113.123158

〔学会発表〕(計 2 4 件)

松本 拓馬、佐々田 沙紀、池田 雅志、Anna Sanchez Calle、笠井 智成、妹尾 昌治、化学物質によるがん幹細胞誘導性メカニズムの解明、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜(横浜)

五味 真知、星川 健太、岩崎 良章、笠井 智成、妹尾 昌治、ヒト iPS 細胞から作製するがん幹細胞モデル、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パ

シフィコ横浜(横浜)

古賀 めぐみ、Anna Sanchez Calle、岩崎 良章、笠井 智成、妹尾 昌治、胚様体形成させた iPS 細胞から誘導するがん幹細胞、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜(横浜)

Seno A, Kasai T, Vaidyanath A, Masuda J, Mizutani A, Murakami H, Ishikawa T, Seno M, Gene expression analysis of artificially developed cancer stem cells using spherical self-organization map. 第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 6-8 日、パシフィコ横浜(横浜)

Takayuki Kudoh, Saki Sasada, Junko Masuda, Masashi Ikeda, Takuma Matsumoto, Anna Sanchez Calle, Neha Nair, Mami Asakura, Tomonari Kasai, Masaharu Seno, Exploration of Target Molecules and Related Pathways Affecting the Conversion of iPSCs into Cancer Stem Cells by Chemical Compounds、第 5 回生命医薬情報学連合大会、2016.9.29-10.1、東京国際交流プラザ平成(東京)

Anna Sanchez Calle, Kenta Hoshikawa, Neha Nair, Marta Prieto-Vila, Arun Vaidyanath, Tomonari Kasai, Masaharu Seno, The significance of c-Kit proto-oncogene in iCSC-derived PDAC model、AACR Annual meeting 2016、2016.4.16-20、ニューオリンズ(アメリカ)

Neha Nair, Arun Vaidyanath, Kenta Hoshikawa, Anna Sanchez Calle, Tomonari Kasai, Masaharu Seno, Cancer stem cells as the novel origin of cancer-associated fibroblast-like cells、AACR Annual meeting 2016、2016.4.16-20、ニューオリンズ(アメリカ)

佐々田沙紀、星川健太、松本拓馬、Anna Sanchez Calle、Arun Vaidyanath、増田潤子、笠井智成、妹尾昌治、化学物質のがん幹細胞誘導性に関する in vitro における簡易評価技術の開発、日本動物実験代替法学会 第 28 回大会、2015 年 12 月 10-12 日、横浜

佐々田沙紀、星川健太、松本拓馬、Anna Sanchez Calle、水谷昭文、Arun Vaidyanath、増田潤子、笠井智成、妹尾昌治、シグナル伝達阻害剤によるがん幹細胞誘導メカニズムの解析、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1-4 日、神戸

池田雅志、Arun Vaidyanath、公文一輝、水谷昭文、妹尾彬正、工藤孝幸、笠井智成、妹尾昌治、乳癌と正常組織を識別する遺伝子セットの網羅的探索、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1-4 日、神戸

Takayuki Kudoh, Tomonari Kasai, Saki Sasada, Kenta Hoshikawa, Takuma Matsumoto, Anna Sanchez Calle, Arun Vaidyanath, Masaharu Seno, Exploration of Target Molecules Affecting the Conversion of iPSC Cells into Cancer Stem Cells Using

Chemical Compound Library、CBI 学会 2015 年大会、2015 年 10 月 27-29 日、東京

Prieto Vila M, Shigehiro T, Sanchez Calle A, Kasai T, Murakami H, Mizutani A, Seno M、Acquisition of immortalization prior to malignancy during the miPS-CSC generation、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8-10 日、名古屋

笠井智成、パイディナードアルン、竹尻崇人、村上知加恵、ナイルネハ、サンチェスカレ アンナ、妹尾彬正、水谷昭文、工藤孝幸、陳凌、妹尾昌治、多能性幹細胞から作るがん幹細胞モデル、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8-10 日、名古屋

笠井智成、水谷昭文、工藤孝幸、佐藤あやの、陳凌、妹尾昌治、ヒト iPS 細胞から作るがん幹細胞、第 37 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25-27 日、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、2014 年 9 月 18-19 日、サンディエゴ (アメリカ)

〔図書〕(計 1 件)

Mizutani A, Yan T, Vaidyanath A, Masuda J, Seno A, Kasai T, Murakami H, Seno M、Insight into Cancer Stem Cell Niche; Lessons from Cancer Stem Cell Models Generated In Vitro、Stem Cell Biology and Regenerative Medicine (Springer International Publishing)、査読有、1 巻、2015、pp211-226、https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-21702-4_10

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

村上 宏 (MURAKAMI, Hiroshi)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号 : 90260174

笠井 智成 (KASAI, Tomonari)

岡山大学・大学院自然科学研究科・講師

研究者番号 : 30530191

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

工藤 孝幸 (KUDOH, Takayuki)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号 : 00346412

増田 潤子 (MASUDA, Junko)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号 : 20424674