

令和元年6月2日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07116

研究課題名(和文)人工多能性幹細胞を用いた肝がん幹細胞動物モデルの確立と応用

研究課題名(英文) Establishment and application of animal model of liver cancer stem cell using induced pluripotent stem cells

研究代表者

岩崎 良章 (IWASAKI, Yoshiaki)

岡山大学・保健管理センター・教授

研究者番号：00314667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：われわれがこれまで確立した手法を用いて、マウスiPS細胞からヒト肝がん細胞株の上清によりがん幹細胞を誘導した。この細胞を免疫不全マウスに移植することにより腫瘍の形成を認めた。さらに、この腫瘍から作製した初代培養細胞を一連の成長因子により肝細胞系に分化誘導し、肝がん幹細胞様の細胞を作製した。この細胞を免疫不全マウスの肝臓に直接移植することにより形成された腫瘍は、肝がんの特異的なマーカーを示すとともに幹細胞性に関連した因子の発現も認められた。しかし、肝細胞系への分化を示す細胞は腫瘍の一部のみであり、肝がん幹細胞の詳細な解析のために、より効率的な肝がん幹細胞の動物モデルの確立が今後必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行肝がんの化学療法や放射線治療に対する治療抵抗性の原因としてのがん幹細胞の存在と、それを標的とした治療法の開発が注目されている。しかし、がん幹細胞をがん組織検体から分離して長期に維持することが難しく、そのため、がん幹細胞の詳細な解析は従来困難であった。本研究では、遺伝子操作を用いることなく、より自然な条件下で肝がん幹細胞モデルを作製することが出来た。さらに、iPS細胞を出発材料とすることから、種々の遺伝的背景を持つ試料の安定供給が可能となった。今後、より効率的な動物モデル作製法の開発により、がん幹細胞の詳細な病態解析及び薬剤耐性機序の解明に基づいた創薬が期待される。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells were induced from mouse iPS cells by culturing in the presence of conditioned medium prepared from human hepatoma cell lines using a method that we have established. The cancer stem cells exhibited high tumorigenicity with rapid growth in immunodeficient mice. Primary cultured cells derived from this tumor were induced to differentiate into hepatocytes by a series of growth factors to produce liver cancer stem cell-like cells. Tumors formed by directly transplanting these cells into the livers of immunodeficient mice showed markers specific to liver cancer cells and also expression of factors related to stemness. However, only a part of tumors show differentiation to hepatocyte lineage, and it is necessary to establish more efficient animal models of liver cancer stem cells for detailed analysis of these cells.

研究分野：がん幹細胞

キーワード：肝がん がん幹細胞 実験動物モデル 人工多能性幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 多発の転移や再発を来した進行肝細胞がんでは化学療法や放射線治療が主体となるが、根治にいたることは極めてまれであり、最終的には再発して不幸な転帰をとる。これは、治療に抵抗性を示す肝がん幹細胞の存在が原因と考えられおり、肝がん幹細胞を標的とした治療法の開発が喫緊の課題である。

(2) 肝細胞がんにおいては、従来、一般的な幹細胞マーカーとされる分子、あるいは確立された株化肝がん細胞を用いて見出された分子が治療標的候補として提唱されてきた。しかし、前者は正常な組織幹細胞に共通するため、実際の治療に際して副作用が問題となる。一方、後者では株化されたがん細胞で見出されたものであり、臨床的に遭遇する一般的な肝がんに普遍的に応用できるかについては問題が残る。そのため、肝がん組織由来の肝がん幹細胞そのものの詳細な解析が待たれる。

(3) しかしながら、治療標的となる肝がん幹細胞に特異的なマーカーの解析をはじめとして、肝がん幹細胞について詳しく解析することは、がん幹細胞の性質から困難な状況にある。この問題を解決するために、肝がん幹細胞モデルの確立とそれを用いた肝がん幹細胞動物モデルの作製を着想した。

(4) われわれは、これまでマウス¹⁾およびヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)に対して遺伝子操作を加えることなく、培養がん細胞の上清を用いることにより、がん幹細胞を作製できることを報告してきた²⁾。

2. 研究の目的

(1) われわれが確立したiPS細胞からがん幹細胞モデルを作製する手法を用いて、これまで多様ながん幹細胞を作製しており、この手法をもとにiPS細胞から誘導したがん幹細胞モデルを作製し、続いて一連の成長因子を用いて肝細胞系への分化を誘導することにより、肝がんの幹細胞モデルを作製する。

(2) 肝がんの幹細胞モデルを用いて肝がん幹細胞動物モデルを作製し、それより樹立した肝がん幹細胞由来の腫瘍について、特異的に発現されている分子、転移・浸潤の機序ならびに薬剤耐性機序を解析する。これにより、がん幹細胞を特異的な標的とした肝がんに対する新規治療開発への手がかりを得る。

3. 研究の方法

(1) ヒト肝がん細胞株の上清を用いてマウスiPS細胞からがん幹細胞を誘導し、それより樹立したがん細胞株を、幹細胞から肝細胞への分化を誘導する一連の成長因子を用いて培養し、肝がん幹細胞モデルを作製する。

(2) 肝がん幹細胞モデルを免疫不全マウスに移植し、肝がん幹細胞動物モデルを作成する。さらに形成された腫瘍から肝がん幹細胞株を樹立する。

(3) 肝がん幹細胞について、幹細胞性を示す因子の遺伝子発現、肝がん特異的な腫瘍マーカー遺伝子の発現、特異的な抗原の組織学的解析による腫瘍中の局在について解析を行い、治療の標的としての可能性を探求する。

4. 研究成果

(1) マウスのiPS細胞¹⁾を、ヒト肝がん細胞株(Huh-7, HepG2, PLC/PRF/5)の培養上清を用いて培養することにより、がん幹細胞を誘導した²⁾。このがん幹細胞は、ヌードマウスの皮下に移植することにより腫瘍形成能を示した。同腫瘍の免疫組織学的解析によりNanogプロモータ制御下に発現するマーカー遺伝子(GFP)陽性の幹細胞を含む胚細胞性腫瘍の組織像と、そこから様々に分化したと考えられる腫瘍組織の形成を確認した。さらに同腫瘍より得られた初代培養細胞の解析により、胚様体形成能および幹細胞マーカー(Nanog, Oct3/4)の発現を認め、がん幹細胞モデルの樹立を確認した。

(2) 本研究で確立されたがん幹細胞を、一連の成長因子(アクチビン、FGF2、HGF)を用いて肝細胞系へと分化誘導した細胞において、肝細胞特異的な遺伝子の発現(AFP、アルブミン)を確認した。続いて、この肝細胞系へと分化誘導した細胞をヌードマウスの腸管に移植することにより、マウスの腸間膜及び肝に腫瘍形成を認めた。形成された腫瘍から作成した初代培養細胞において胚様体形成能および幹細胞マーカー発現を認め、がん幹細胞の存在を確認した。しかし、形成された腫瘍の組織解析では腺管上皮を含む種々の分化した組織を認めたが、高度に分化した肝細胞様の組織には乏しかった。

(3) 上記の知見を踏まえ、がん幹細胞の分化過程において、胚様体、胚体内胚葉、肝細胞様細

胞の各分化過程において肝がん細胞株の培養上清を用いて培養し、肝細胞様に分化したがん幹細胞を効率的に得られる方法を検討した。その結果、胚体内胚葉からの肝がん細胞株培養上清の添加での培養が最も適していることを見出した。

(4) さらに分化誘導した細胞から肝がん幹細胞表面マーカー(CD133)を用いて、特異的に選別・濃縮した細胞集団をヌードマウスの門脈を介して移植することにより、肝及び腹腔内に腫瘍形成を認めた。同腫瘍より得られた初代培養細胞の解析により胚様体形成能および幹細胞マーカーの発現、すなわちがん幹細胞の性質を有することを確認した。形成された腫瘍は組織学的に胚細胞性腫瘍と上皮系細胞を含めた三胚葉系に由来する細胞が主体であった。

(5) そこで、これら腫瘍の初代培養細胞及び新たに肝がん細胞株の培養上清を用いて誘導したがん幹細胞をヌードマウスの肝臓に直接移植した。その結果、マウスの肝臓に腫瘍形成が得られ、形成された腫瘍から初代培養細胞を調整して再びマウスの肝臓に直接移植し、これを繰り返してマウスの肝臓に腫瘍を形成させた。得られた腫瘍について、遺伝子発現並びに免疫組織学的解析を行った結果、腫瘍内に Glypican-3 及び AFP 発現する細胞集団を認め、肝細胞様細胞への分化が示唆された。さらに、Nanog, Oct3/4 の遺伝子発現も認められたことより、幹細胞性を示す可能性が考えられ、肝がん幹細胞の形成を示唆させる所見が得られた。

(6) 本研究では、遺伝子操作を用いることなく、iPS 細胞より初めて肝がん幹細胞モデルを作製することが出来た。肝がんの幹細胞に関しては、従来、肝がん培養細胞株を用いて、マーカーとなる特異的分子の同定とその基礎的・臨床的意義を解析した報告が中心で、肝がん幹細胞そのものの分離、培養・維持については困難とされてきた。特に、iPS 細胞を用いたもの、さらには発癌化学物質の使用や遺伝子操作を用いないで作製されたものについては、これまで報告がない。

(7) 本研究において肝がん幹細胞モデルをヌードマウスの肝臓に直接移植することにより、腫瘍の形成を認めた。しかし、肝細胞系の細胞は腫瘍の一部に見られるのみであり、腫瘍の主体は種々の胚葉系由来の細胞により形成されていた。肝がん幹細胞における特異的な遺伝子発現や幹細胞性に関わる因子の発現の解析、さらには薬剤感受性や耐性の試験やそれらの機序解明と、それに基づいた創薬に結びつけるためには、肝細胞様細胞あるいは肝がん幹細胞を主体とする腫瘍形成が安定的かつ効率的に得られるモデルを作製する必要がある。今後、オルガノイド作製技術の応用などの更なる改善を行い、iPS 細胞由来の内胚葉系ないしは肝細胞系への分化を示した細胞によるがん幹細胞モデルの作製が望まれる。

< 引用文献 >

Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007;448:313-7.

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. *J Stem Cells Regen Med*. 2014;10:2-7.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Aung Ko Ko Oo, Anna Sanchez Calle, Neha Nair, Hafizah Mahmud, Arun Vaidyanath, Junya Yamauchi, Apriliana Cahya Khayrani, Juan Du, Md Jahangir Alam, Akimasa Seno, Akiyumi Mizutani, Hiroshi Murakami, Yoshiaki Iwasaki, Ling Chen, Tomonari Kasai, Masaharu Seno, Up-Regulation of PI 3-Kinases and the Activation of PI3K-Akt Signaling Pathway in Cancer Stem-Like Cells Through DNA Hypomethylation Mediated by the Cancer Microenvironment, *Transl Oncol*, 査読有, Vol. 11, No. 3, p. 653-663, 2018.
DOI: 10.1016/j.tranon.2018.03.001

Neha Nair, Anna Sanchez Calle, Maram Hussein Zahra, Marta Prieto-Vila, Aung Ko Ko Oo, Laura Hurley, Arun Vaidyanath, Akimasa Seno, Junko Masuda, Yoshiaki Iwasaki, Hiromi Tanaka, Tomonari Kasai, Masaharu Seno, A cancer stem cell model as the point of origin of cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment, *Sci Rep*, 査読有, Vol. 7, No. 1, p. 6838, 2017.
DOI: 10.1038/s41598-017-07144-5

Anna Sanchez Calle, Neha Nair, Aung KoKo Oo, Marta Prieto-Vila, Megumi Koga, Apriliana Cahya Khayrani, Maram Hussein, Laura Hurley, Arun Vaidyanath, Akimasa Seno, Yoshiaki Iwasaki, Malu Calle, Tomonari Kasai, and Masaharu Seno, A new PDAC mouse model originated from iPSCs-converted pancreatic cancer stem cells (CSCcm), *Am J Cancer Res*, 査読有, Vol. 6, No. 12, 2016, p. 2799-2815, 2016.
PMID: 28042501, PMCID: PMC5199755

〔学会発表〕(計2件)

五味 真知 他、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

古賀 めぐみ 他、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

取得状況 (計 1 件)

名称：がんの非ヒトモデル動物及びその作製方法、がん幹細胞及びその製造方法

発明者：妹尾昌治、笠井智成、岩崎良章、大原利章、廣畑 聡、加来田博貴

権利者：国立大学法人 岡山大学

種類：特許

番号：第 6 1 6 1 8 2 8 号

取得年：平成 2 9 年

国内外の別： 国内

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：笠井 智成

ローマ字氏名：(KASAI, Tomonari)

所属研究機関名：東京工科大学

部局名：応用生物学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁): 30530191

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。