

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15243

研究課題名（和文）エンドセリン1によるがん幹細胞様細胞誘導とその受容体阻害剤を用いたがん治療予測

研究課題名（英文）Induction of cancer stem cell-like cells by endothelin 1 and prediction of cancer treatment using its receptor inhibitor

研究代表者

妹尾 彬正（Seno, Akimasa）

岡山大学・ヘルスシステム統合科学学域・助教

研究者番号：10759210

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,400,000円

研究成果の概要（和文）：正常なiPS細胞の培養培地にごん細胞の培養上清を添加して培養し続けることでがん幹細胞を誘導できることが明らかにされている。過去に行ったマイクロアレイデータ解析から、がん細胞の分泌物のうちiPS細胞をがん幹細胞に誘導する物質としてエンドセリン1（ET1）が示唆されていた。実際にごん幹細胞を誘導できたがん細胞培養上清にもET1が含まれていることが確認され、がん細胞の培養上清で誘導したがん幹細胞でエンドセリン受容体の1つであるEDNRB遺伝子の発現が元のiPS細胞よりも上がっていた。そこで、ET1を添加してiPS細胞を培養したところ、造腫瘍能がもとのiPS細胞よりも亢進することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの発症原因には様々なものがあるが、直接の原因は遺伝子変異により起こるとされることが多い。しかしながら、正常な末梢細胞が培養条件により生じることと同様にごん細胞もその分化にふさわしい培養条件があることを示す研究も存在している。本研究もそのような研究の1つであり、未だ全容が明らかとならないがんの発症原因究明の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：It has been shown that cancer stem cells can be induced by adding the culture supernatant of cancer cells to the culture medium of normal iPS cells and continuing the culture for a month. From the microarray data analysis results, endothelin 1 (ET1) was suggested as a substance among the secreted products of cancer cells, which induces iPS cells to become cancer stem cells. It was confirmed that ET1 is contained in the culture supernatant of cancer cells that could actually induce cancer stem cells, and the expression of the EDNRB gene, one of the endothelin receptors, was higher in cancer stem cells induced with the culture supernatant of cancer cells than in the original iPS cells. Moreover, when iPS cells were cultured with ET1, their tumorigenic potential was found to be enhanced compared to that of the original iPS cells.

研究分野：腫瘍学

キーワード：がん幹細胞 エンドセリン1

## 1. 研究開始当初の背景

昭和 56 年から今日まで、我が国においてがんの死因別死亡率が第 1 位となっている。この間に研究者たちにより様々な研究が行われ、その原因遺伝子や治療標的として様々な遺伝子が特定されてきたにも関わらず、である。確かに、それらの遺伝子を標的とする薬は特定のがんに対して著効を示し、多くの患者を救ってきた。しかし、近年の分子生物学の急速な発展とは裏腹にその死亡率は増加の一途を辿っている。これは、すべてのがんが特定の遺伝子変異に因るものであるという仮説に誤りがあることに起因していないだろうか。例えば、結核のように抗生物質の発見に伴い死亡率が激減するということが期待できる余地は無いだろうか。約 100 年前に東京帝国大学医学部教授の山極勝三郎により世界で初めて人工的ながんが作成された。彼はウサギの耳にコールタールを塗擦することで悪性腫瘍の作成に成功した。現代の遺伝子工学の発展は 1970 年代以降のことであるので、当然当時では遺伝子操作の術はなく腫瘍が作成されたのは健康なウサギの耳であった。このことから推察されることは、がんが遺伝子変異により生じる前に、微小環境によりがんが生じるという考えも成り立つということである。

近年の研究において慢性炎症によりがんが生じるという報告も多く、それらの因果関係が注目されてきている。この中で、幹細胞から細胞が分化していく過程において、細胞の可塑性に対する微小環境の影響が重要であると考えられるようになった。つまり、微小環境から影響を受けることで幹細胞は分化するのである。このことから、がん細胞も幹細胞から誘導可能という考えに基づき、がん細胞を培養した培地を混合した培地で幹細胞を培養することにより悪性腫瘍形成能を持つがん幹細胞様の細胞を作成することに成功している。この細胞はがん組織の中にごく少数存在しているがん幹細胞と同じく「自己複製能」「多分化能」を有しており、がん細胞誘導時に用いたがん細胞と同じ部位に移植するとその組織にがんを形成することも示されている。さらに分化誘導に用いるがん細胞の種類を増やすことで多種のがんの作成にも成功している。しかし、がん細胞培養培地には様々な物質が含まれており、がん幹細胞を実際に誘導している物質が何であるのかは未だ特定されていない。

## 2. 研究の目的

以前の研究において、申請者は誘導したがん幹細胞様細胞の遺伝子発現データを用いて、他の細胞との遺伝子発現比較解析を行い、エンドセリン 1 (ET1) ががん幹細胞に共通して高い発現が見られるということを明らかにしていた。ET1 はがん組織において自己分泌または傍分泌によりがん細胞やがん組織の維持に重要であり (Laura Rosanò, et al., Nature Reviews Cancer, 2013)、幹細胞の維持においても重要である (Pourjafar M, et al., Clin Exp Pharmacol Physiol., 2016) ということが知られているものの、がん幹細胞を誘導する物質であるかどうかは明らかとされていない。そこで、本研究の目的は ET1 ががん細胞の維持だけでなく、がんの大本となりうるがん幹細胞の発生や維持にも重要であるかどうかを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

そこで各種がん細胞の培地中にどの程度の ET1 が存在しているのかを計測した。次に、ET1 が幹細胞にどの程度影響を及ぼしうるのかを検討するため、ヒト iPS 細胞と誘導後のがん幹細胞でどの程度 ET1 の受容体発現や影響を及ぼしうる遺伝子の発現に差があるのかを測定した。がん細胞の培養上清に含まれる最大量と考えられた 10 pg/mL から 1 ng/mL の ET1 で細胞を培養した際の細胞を観察した。さらに、1 ng/mL の ET1 で 1 ヶ月以上培養を行ったヒト iPS 細胞を NOD/SCID マウスの両肩に皮下移植することで誘導したがん幹細胞の造腫瘍能について調べた。

## 4. 研究成果

ET1 が傍分泌により他の細胞に影響を及ぼすことや、がん細胞が ET1 を分泌しているということはこれまでも報告されていることから、まずがん細胞の培養上清に含まれる ET1 の濃度を ELISA にて測定した。すると、10~1000 pg/mL 程度の ET1 が存在していることが確認された。次にヒト iPS 細胞とがん細胞培養上清を用いて誘導したがん幹細胞における ET1 の受容体である EDNRA、EDNRB の発現を調べたところ、EDNRB 遺伝子の発現が元の iPS 細胞よりも上がっていたが、タンパク質の発現は検出できなかった。後者については、本当に検出ができないのか使用する抗体について今後も検討が必要である。さらに、低用量の ET1 では iPS 細胞に大きな差は見られず、エンドセリン受容体 EDNRA/B 双方に対するアンタゴニストである Bosentan を添加した培養実験でも優位な差が見られなかったことから、iPS 細胞上の受容体の発現が低すぎるということが考えられた。最後に、がん細胞の培養上清に含まれる最大量であった 1 ng/mL の ET1 をヒト iPS 細胞の培養培地に添加して 1 ヶ月以上培養を行った。この際、コントロールとして同時に培養していた bFGF を添加する通常のプロトコルで培養した hiPS 細胞に比べて、bFGF と ET1 の両方を添加して培養した hiPS (+bFGF+ET1) 細胞、ET1 のみを添加して培養した hiPS (+ET1)

細胞、そして何も添加せずに培養した hiPS (w/o GFs) 細胞の幹細胞関連遺伝子の発現を比較したが、ここでも大きな差は見られなかった上、ET1 遺伝子の発現は検出できなかった。これらの細胞を  $2 \times 10^6$  個ずつ NOD/SCID マウスの皮下に移入したところ、いずれの細胞も腫瘍を形成したが、+ET1 細胞がすべての移入箇所ですべて腫瘍を発症するという結果が得られた。この結果から、ET1 が腫瘍の発症を促進する可能性が示唆された。しかしながら、そのメカニズムはまだ不明な点が多く、より詳細に解析する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Akimasa Seno, Ira Winer, Manohar Ratnam, and Masaharu Seno
2. 発表標題 The effect of endothelin 1 on cancer stem cell development
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------