

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16309

研究課題名（和文）大腸癌臨床サンプルからの再発細胞（スーパー癌幹細胞）の同定

研究課題名（英文）Identification of super cancer stem cells from patient-derived cancer cells

研究代表者

森本 祥悠（Morimoto, Yoshihiro）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20781735

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）：本研究の目的は、患者さんから切除した癌細胞を培養し、その中から治療が効きにくく、再発の原因となる癌幹細胞を同定し、その性質を解明することである。2年間で13人の患者さんから癌細胞を安定して培養することができた。そのうち8例において、癌幹細胞を色素でマーキングすることが可能となり、マーキングされていない普通の癌細胞と遺伝子発現様式を比較することができた。さらにそのマーキングされた癌幹細胞が、実際に腫瘍を作りやすいことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療抵抗性の原因と考えられている癌幹細胞の困り込みには、一般的には幹細胞マーカーが使用される。一方、化学療法が良く効く人と効かない人がいるように、癌細胞は患者ごとに性質が異なり、癌幹細胞も同様に患者ごとに異なると考えられた。そのため本研究では、特定の幹細胞マーカーで癌幹細胞を特定するのではなく、少数の細胞から腫瘍を形成する能力がある細胞を癌幹細胞として捉えた。さらに、癌幹細胞のみをマーキングすることに成功し、癌幹細胞と非癌幹細胞を正確に比較可能となり、患者ごとに癌幹細胞の性質が異なることを実際に確認した。今後、患者ごとに最も効果的な治療を選択する際の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to culture cancer cells derived from patients, and identify the cancer stem cells among them. We were able to culture cancer cells stably for 13 patients in two years. Cancer stem cells from 8 patients were traced with a staining marker, which enabled us to compare the gene expression profiles of marked cancer stem cells and unmarked normal cancer cells. Furthermore, we confirmed that the marked cancer stem cells had high sphere formation abilities.

研究分野：分子生物学

キーワード：癌幹細胞 大腸癌 臨床検体 初代培養 治療抵抗性 マーキング RNAシーケンス

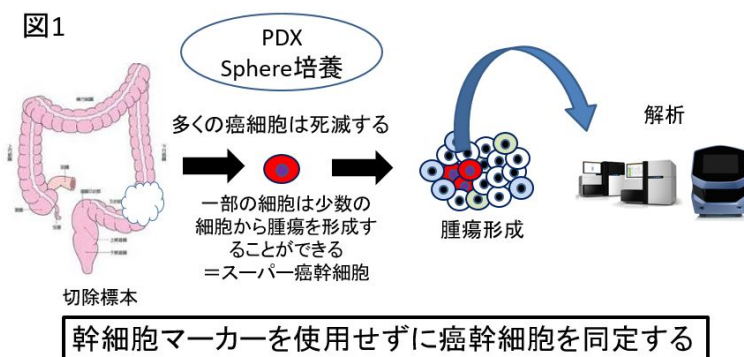
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における大腸癌の部位別死亡率は、男性で第3位、女性で第1位であり、さらなる対策が急務である。近年、固形癌において自己複製能と多分化能を有し、腫瘍の階層性を生み出す癌幹細胞という概念が注目されている。癌幹細胞は強い化学療法耐性や造腫瘍性を持つため、再発や転移の原因となるので、癌幹細胞を駆除することが癌の根治につながると信じられていた。しかし、大腸癌の癌幹細胞マーカーである LGR5 を標的とした治療戦略が思いのほか効果に乏しいという報告がなされた(Shimokawa M et al. Nature 2017)。組織幹細胞マーカーの報告は多いが、癌の幹細胞で明瞭なエビデンスに基づくものは他に DCLK1 が報告されているのみであり未だ限定的である。一方、大腸癌の多彩な遺伝子異常やゲノム不安定性を考えると、癌幹細胞にも多様性があっても全くおかしくない。個々の患者さんにとって病態の根幹をなす癌幹細胞が異なり、それを見つけて治療することが重要であると考えた。

2. 研究の目的

従来、CD44 や CD133 などの細胞表面マーカーが癌幹細胞の困い込みに利用されているが、その精度は高くなく、これらのマーカーの陽性細胞をもってしてもマウス皮下腫瘍を造るには 100 個-1000 個程度の細胞数を要することが通常である。大腸癌の手術検体から癌細胞を単離し、マウス皮下移植～培養、継代の過程でほとんどの癌細胞が死滅する中、少数の細胞で腫瘍を形成する能力を有する細胞を見出すことができれば、その細胞は将来再発する細胞である可能性が高く、極めて生存能力に長けた組織由来のスーパー癌幹細胞といえる(図1)。本研究の目的は、手術によって切除された大腸癌組織の中から、スーパー癌幹細胞を同定し、その性質を解明することである。スーパー癌幹細胞から得られた遺伝子情報と、原発巣の遺伝子プロファイルと比較することで、その本態に迫ることができる。また、癌細胞を long retaining marker でマーキングした後に sphere を形成させることで、マーキングが残存するスーパー癌幹細胞と、分化してマーカーを失った娘細胞の遺伝子発現様式の比較が可能になると考えた。



3. 研究の方法

(1) PDX の作成

大腸癌患者から摘出した臨床腫瘍検体を 2mm 以下に切り刻み、CB17.Cg-Prkdc^{scid}Lyst^{bg-^j}/CrlCrlj(SCID Beige)マウスの背部皮下に2か所移植した。1か月程度で腫瘍が形成された後、摘出した。

(2) Sphere 単位でのマウス皮下腫瘍のセレクション

摘出した腫瘍を 1mm 程度に刻んだ後、dissociator(GentleMACS Dissociator)を用いて分離し、マトリゲルと混和して sphere を形成させた。これを sphere 単位で 1-3 個ずつ免疫不全マウスの背部に 1 匹あたり 9 か所ずつ皮下移植した。多くの sphere は腫瘍を造らず死滅したが一部の sphere は腫瘍を形成した。

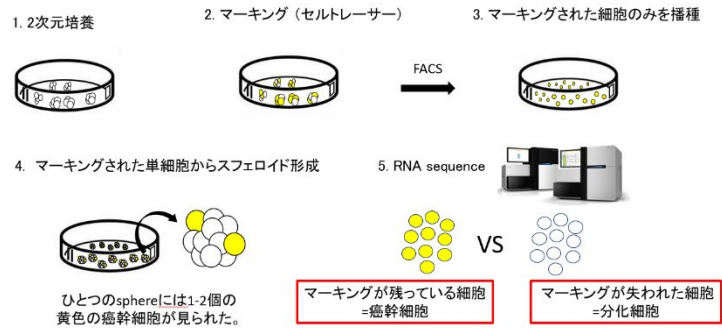
(3) スーパー癌幹細胞からなるマウス皮下腫瘍と原発巣の比較

Sphere 単位で皮下移植して形成された腫瘍は悪性度の高い細胞群からできた腫瘍であり、その遺伝子発現様式を RNA sequence により原発巣と比較した。

(4) スーパー癌幹細胞のマーキング

(3)と並行して独自の二次元培養を行い、long retaining marker (セルトレーサー) でマーキングをし、マーキングされた細胞のみを FACS を用いてシングルセルで播種し、2週間かけて再び sphere を形成させた (図2)。大多数の細胞は細胞分裂を繰り返した結果色素を失

図2



うが、癌幹細胞はほとんど分裂をしないために色素が維持される。その結果色素が維持された幹細胞性の高い細胞 (スーパー癌幹細胞) とマーキングが消えた分裂回数の多い分化した細胞を区別することが可能となり、RNA sequence を行い両者の遺伝子プロファイルと比較した。また、スーパー癌幹細胞が非癌幹細胞と比較して幹細胞性が高いことを、sphere 形成能を比較することで確認した。

4. 研究成果

(1) 臨床検体を用いた sphere 培養は、合計 13 例において安定して継代することができ、全例においてストックが可能となった (図3)。マウスの PDX モデルを介して培養しているため、形成した sphere がヒトの細胞からなるのか、マウスの細胞からなるのかを、HLA と EpCAM の発現を FACS を用いて評価した。その結果 9 例においてはヒトの細胞からなる sphere であったが、4 例においてマウスの細胞のみからなる sphere となっていた (図4)。通常のマウスのリンパ球や線維芽細胞ではスフェロイドを形成することはない。ヒトの癌(幹)細胞の分泌するサイトカインやエクソソームの影響によって、腫瘍の間質を形成していたマウス由来の細胞 (線維芽細胞、脂肪細胞や血球成分が最も考えられる) に幹細胞性が付与され、スフェロイドを形成した可能性が考えられる。本研究ではこれ以上の検討は行っていないが、今後ヒトの癌細胞による周囲の微小環境への影響の本態 (癌が自己の増殖・生存に都合のよい腫瘍間質を造りあげるメカニズム) にも迫ることが可能であると考えられる。

図3

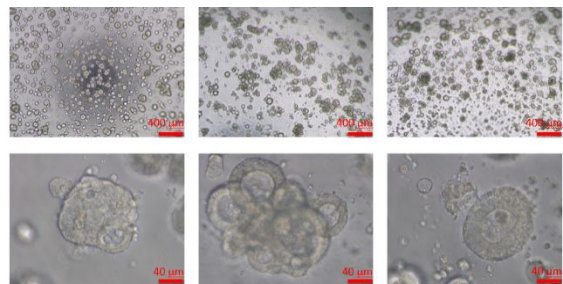


図4

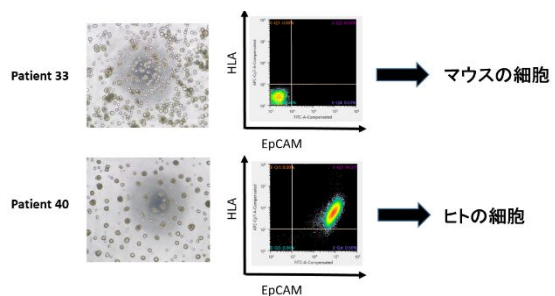
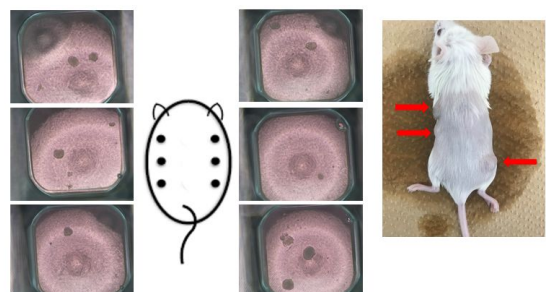


図5

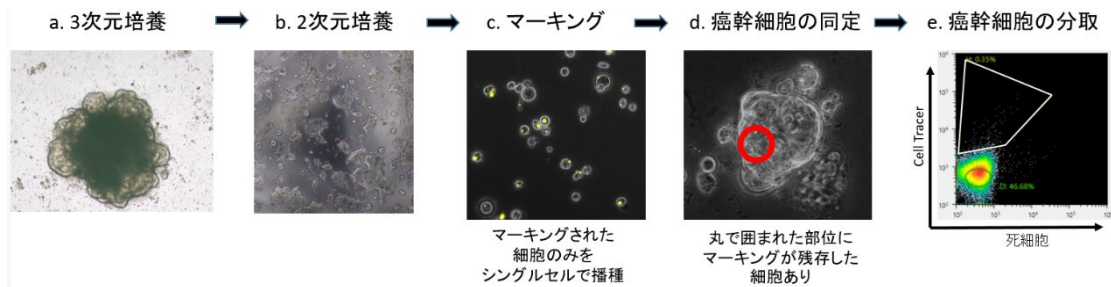


(2) ヒトの細胞からなる sphere を 1 個~3 個の単位でマウスに皮下移植し、腫瘍を形成さ

せ(図5)、3例においてRNA sequenceを行った。その結果少数の sphere から形成された腫瘍は、原発巣と比較し、SOX2などの幹細胞性に強くかかわる遺伝子を高発現していることが分かった。

(3) ヒトの細胞からなる8例の sphere を用いて、セルトレーサーでマーキングされた幹細胞性の高い細胞 (=スーパー癌幹細胞)とマーキングが消えた分裂回数の多い分化した細胞 (=非癌幹細胞)を分取することができた(図6)。

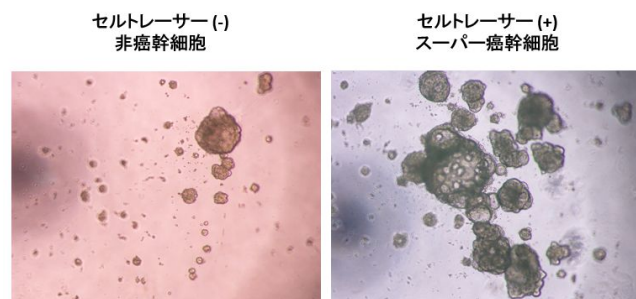
図6



スーパー癌幹細胞と非癌幹細胞の sphere 形成能を比較したところ、スーパー癌幹細胞はより強い sphere 形成能を有していることが確認できた。(図7)。

さらに、RNA sequence により両者の遺伝子プロファイルと比較したところ、複数の症例においてマーキングされたスーパー癌幹細胞において既知の幹細胞マーカーの発現が亢進していることを確認でき、さらに、発現亢進している幹細胞マーカーは症例により異なることが分かった。

図7



本研究の目的は、手術によって切除された大腸癌組織の中から、少数の細胞で腫瘍を形成する能力を有するスーパー癌幹細胞を同定し、その性質を解明することである。上記 sequence の結果から、この実験系において幹細胞性の高い細胞を同定できていることが示され、さらにその発現亢進している幹細胞マーカーのパターンは症例により異なることが分かった。今後は各症例の正常粘膜上皮・原発巣・マーキング前の sphere の sequence 結果も加えて、スーパー癌幹細胞独特な遺伝子発現プロファイルを深く解析することで、患者個々の癌幹細胞マーカーの同定につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----