

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19560782

研究課題名（和文） 幹細胞のがん化（形質転換）を阻止する新規培養プロセスの構築

研究課題名（英文） Development of a new culture process to prevent an oncogenic transformation of the stem cells

研究代表者

松下 琢（MATSUSHITA TAKU）

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：10209538

研究成果の概要（和文）：本研究では、肝幹細胞の安全な再生医療への応用を目標に、初めに形質転換（がん化）した肝幹細胞を識別するための3つの評価法を確立した。次にこの評価法を用いて、肝幹細胞の大量培養に最適な培養担体について検討し、ハイドロキシアパタイト多孔質担体が適当であり、この担体の孔のサイズや凹凸が、細胞のがん化の抑制や肝機能発現に重要であることを見出した。さらに、培養した肝幹細胞の中から、独自に開発したハイブリッドリポソームを用いて、がん化した肝幹細胞を選択的に除去する培養法の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research is to develop a new culture process to prevent an oncogenic transformation of hepatic stem cells for their safety application to regenerative medicine. First, we established three estimation methods for the oncogenic transformation of the stem cells. Second, we found that the porous hydroxyapatite culture carrier was suitable for mass culture of the stem cells, and the pore size and raggedness of the surface were important to prevent the oncogenic transformation and enhance the hepatic activity of the stem cells. Third, we succeeded in the selective elimination of transformed cells in the cultivated stem cells by using hybrid liposomes, which originally developed in our research.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：再生医療、幹細胞、がん化、形質転換、培養担体、ハイドロキシアパタイト、ハイブリッドリポソーム

1. 研究開始当初の背景

21世紀の新しい医療として、近年再生医療の実現が期待されている。再生医療では、幹細胞を生体外に必要な量までに増殖させてから、細胞移植の方法で不全臓器の治療に用いられるが、もし増殖させた幹細胞が形質転換していたら、生体に移植した後に異常増殖してがん化するリスクがある。これまで、この幹細胞の培養研究は主に幹細胞の分化能力の維持に焦点が絞られ、この幹細胞の形質転換(がん化)の防止とリスク評価に関してはあまり検討が行われてこなかった。ところが最近、白血病などの治療のために移植した骨髄や臍帯血の細胞が移植患者の体内でがん化した例が国内で報告(2004年4月25日共同通信)されるとともに、腫瘍原性のないES細胞やiPS細胞の樹立に向けた試みも始まっている(奥田、生化学、78:433, 2006)。しかし、これらの取組みは、幹細胞のがん化に関わる遺伝子の同定とそれを欠損させる研究がほとんどで、培養工学的観点の研究は非常に少ないのが現状である。

2. 研究の目的

上述したように、幹細胞に限らず、初代細胞は、増殖培養中に細胞が形質転換を起こし、性状が変化することは、しばしば見られる現象である。特に、幹細胞の場合、形質転換してがん化する可能性のある細胞が1個でも混入した場合、細胞移植後に体内で腫瘍ができる可能性がある。そこで本研究は、培養工学的観点から幹細胞の形質転換を防止するための新規培養プロセスの構築を目指す。主に次の3点を研究目的とした。

- (1) 形質転換した幹細胞を識別するための評価法の確立
- (2) 幹細胞の形質転換を抑制し、分化誘導にも有効な培養担体についての検討
- (3) 正常な幹細胞とがん化した幹細胞を識別し、選択的にがん化した幹細胞を排除するための培養方法の開発

3. 研究の方法

幹細胞としては、研究代表者らが、独自に開発した培養法によって、ヒト胎児肝細胞より誘導した肝芽細胞(肝幹細胞の一種)を用いた。上記3点の研究目的に対して、各々次のような手法で行った。

- (1) 肝幹細胞の形質転換の評価法としては、腫瘍マーカーであるPIVKA-IIの細胞当りの分泌速度、in situハイブリダイゼーション法によるがん遺伝子(c-fos)の発現検出、軟寒天コロニー形成法による形質転換細胞数の評価の3種類で行

った。

- (2) ハイドロキシアパタイトを主原料とする多孔質担体を独自に作製し、その孔径を種々変化させて、形質転換と細胞機能の発現に与える影響を検討した。
- (3) 研究分担者の上岡教授らが開発したハイブリッドリボソームは、正常細胞には作用せず、がん細胞にだけ選択的に融合蓄積して、アポトーシス細胞死を引き起こす副作用の無い制がん剤である。本研究では、このハイブリッドリボソームががん化した細胞にのみ作用する性質を利用して、正常な幹細胞の中に存在する形質転換(がん化)した細胞を選択的に排除することを試みた。

4. 研究成果

再生医療では、ES細胞やiPS細胞、体性幹細胞などの利用が注目されているが、これらの細胞が培養中に、形質転換(がん化)を引き起こすリスクが指摘されている。これを防ぐためには、形質転換幹細胞を選択的に排除する方法の開発が必要である。そこで本研究課題では、研究代表者らが、独自に誘導培養法を確立した肝幹細胞を用いて、次の3点に焦点を絞り、重点的に研究を行った。

- (1) 形質転換した肝幹細胞を識別するための評価法の確立

肝がん腫瘍マーカーで、臨床で用いられているPIVKA-II(異常プロトロンビン)検査法を、細胞培養液で測定できるように改良を行った。これによって、形質転換の程度を定量的に評価できるようになった。また、肝がんにおけるがん遺伝子(c-fos)のin situハイブリダイゼーション法を確立し、形質転換した正常ヒト肝芽細胞の可視化を可能にした。さらに、軟寒天コロニー形成法を用いて、これらの形質転換細胞数の増減を定量的に評価できるようにした。また、これらの手法を用いて同時に肝幹細胞の形質転換の評価を行ったところ、同様な傾向が得られることを確認した。

- (2) 肝幹細胞の形質転換を抑制し、分化誘導にも有効な培養担体についての検討

肝幹細胞を大量に培養するには、高密度培養のための担体が必要となる。そこで初めに、種々の材質の市販の培養担体を用い、肝幹細胞の機能発現と形質転換に与える担体の影響を検討した。その結果、機能発現にはハイドロキシアパタイトが良好で、また担体表面の凹凸が肝芽細胞のがん化(形質転換)に影響していることを示唆する結果を得た。

そこで、次に、ハイドロキシアパタイトを主原料とした独自の担体を制作し、その孔径や凹凸が、肝幹細胞に与える影

響について検討した。その結果、特に細孔径分布の中で、直径約1 μmのマイクロ孔が肝幹細胞のがん化防止と機能発現に重要であることを見出した。

- (3) 正常な幹細胞とがん化した幹細胞を識別し、選択的にがん化した幹細胞を排除するための培養方法の開発

これまでに研究分担者の上岡教授は、正常細胞とがん細胞を識別して、がん細胞だけにアポトーシスを誘導するハイブリッドリポソームを開発し、現在新しいがん治療薬として臨床応用を進めている。このハイブリッドリポソームを肝幹細胞の培養液に添加し、形質転換（がん化）した肝幹細胞のアポトーシス細胞死誘導について検討を行った結果、細胞増殖の定常期に、0.3mMのハイブリッドリポソームを96時間処理することで、肝がん腫瘍マーカーのPIVKA-II産出速度を減少させ、軟寒天法によるコロニー形成率をほぼゼロにできることを確認した。また、その再現性も得られた。

以上の結果から、肝幹細胞を大量に培養するために、以下のような新規培養プロセスが考えられる。すなわち、培養担体としては、ハイドロキシアパタイトを材料とした直径約1 μmのマイクロ孔を有する多孔質担体を用い、培養液には、ハイブリッドリポソームを添加した培養液を用いることで、肝幹細胞の形質転換を防止しつつ、かつ肝機能発現を向上できるものと思われる。このハイブリッドリポソームの利用によって、形質転換細胞の積極的除去が可能となり、将来の、幹細胞の品質保持のためにも、重要な培養プロセスになるものと期待される。

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6件)

- ① T. Towata, Y. Komizu, S. Suzu, R. Ueoka, S. Okada, Highly Selective Fusion and Accumulation of Hybrid Liposomes into Primary Effusion Lymphoma Cells along with Induction of Apoptosis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, Vol.393, No.3, 2010, pp.445-448.
- ② H. Ijima, H. Mizumoto, K. Nakazawa, T. Kajiwara, T. Matsushita, K. Funatsu, Hepatocyte Growth Factor and Epidermal Growth Factor Promote Spheroid Formation in Polyurethane Foam/Hepatocyte Culture and Improve Expression and Maintenance of

Albumin Production, *Biochemical Engineering Journal*, 査読有, Vol.47, 2009, pp.19-26.

- ③ R. Tomoshige, K. Niitsu, T. Sekiguchi, K. Oikawa, K. Ishida, Some Tribological Properties of SHS-Produced Chromium Sulfide, *International Journal of Self-Propagating High-Temperature Synthesis*, 査読有, Vol. 18, No. 4, 2009, pp.287-292.
- ④ 船本幸太, 市原英明, 松下 琢, 松本陽子, 上岡龍一, ハイブリッドリポソームを用いた大腸がんの肝転移抑制に関する基礎研究, *YAKUGAKU ZASSHI*, 査読有, Vol.129, No.4, 2009, pp.465-473.
- ⑤ 松下 琢, 清田章文, 上岡龍一, 人工肝臓開発のための基礎研究～新しいヒト肝幹細胞培養技術と肝機能発現に関する研究～, *BIO九州*, 査読無, No.187, 2008, pp.3-11.
- ⑥ A. Kiyota, T. Matsushita, R. Ueoka, Induction and High Density Culture of Human Hepatoblasts from Fetal Hepatocytes with Suppressing Transformation, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Vol.30, No.12, 2007, pp.2308-2311.

[学会発表] (計7件)

- ① 押方 歩, 三次元培養を利用した肝がん細胞の高い薬物排出活性の発現とその応用に関する研究, 化学工学会第75年会, 2010年3月20日, 鹿児島
- ② 松下 琢, ナノテクノロジーを利用した組織形成装置の開発とこれを用いた肝幹細胞からの肝組織形成ならびに肝がん細胞からの腫瘍組織形成, 理化学研究所バイオアーキテクト合同ミーティング, 2010年2月26日, 静岡.
- ③ 松下 琢, 正常ヒト胎児肝細胞からの肝芽細胞誘導と複合脂質膜を用いた形質転換細胞の選択的排除, 第8回日本再生医療学会総会, 2009年3月5日, 東京.
- ④ 清田章文, ヒト肝芽細胞の形質転換を抑制した誘導と高密度培養に関する研究, 化学工学会九州支部沖縄大会, 2008年8月8日, 沖縄.
- ⑤ 松下 琢, 極微小流量を制御できる組織形成装置の開発と肝細胞を用いた生体外組織形成, 第15回肝細胞研究会, 2008年6月27日, 静岡.
- ⑥ 松下 琢, 正常ヒト胎児肝細胞からの形質転換を抑制した肝芽細胞の誘導と高密

度培養, 第 7 回日本再生医療学会総会,
2008 年 3 月 13 日, 名古屋.

- ⑦ 松下 琢, 極微小流量を制御できる組織
形成装置を用いた肝がん細胞からの腫瘍
組織形成と制がん剤開発への応用, 化学
工学会第 39 回秋季大会, 2007 年 9 月 13
日, 札幌.

[その他]

ホームページ等

<http://www.life.sojo-u.ac.jp/biomed/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 琢 (MATSUSHITA TAKU)
崇城大学・生物生命学部・教授
研究者番号: 10209538

(2) 研究分担者

上岡 龍一 (UEOKA RYUICHI)
崇城大学・生物生命学部・教授
研究者番号: 70099076
友重 竜一 (TOMOSHIGE RYUICHI)
崇城大学・工学部・教授
研究者番号: 90258640