

機関番号：13501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791140

研究課題名 (和文) 卵およびES細胞質を用いたがん細胞の初期化・再分化療法の確立に向けての基礎的検討

研究課題名 (英文) The basic study of the "reprogramming therapy of cancer using the cytosol of oocytes and ES cells.

研究代表者

深澤 宏子 (FUKASAWA HIROKO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：60362068

研究成果の概要 (和文)：卵細胞質内には分化の終了した体細胞さえ初期化して、体細胞クローン動物を作り出せるほどの初期化因子が存在する。この初期化因子を用いたがんのリプログラミング療法を展望して、初期化因子の特性を検討するためには大量の卵細胞質が必要となる。そこで、卵細胞質の凍結保存が可能か、凍結保存した場合の初期化因子への影響について検討したところ、凍結によりクローン胚の発生率は低くなるものの、生仔を得られることから卵細胞質の初期化能は維持されることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：Although the rate of development of cloned embryos to the blastocyst stage using the treated oocytes was lower than that obtained using fresh oocytes, three live pups were delivered after embryo transfer into pseudopregnant females (0.4% of the oocytes used). Thus, although cryopreservation reduces the potential of oocytes, these cells retain the ability to support the full-term development of cloned embryos.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：癌、体細胞核移植、クローン胚、ES細胞、ntES細胞

1. 研究開始当初の背景

がんに対する治療は、手術療法、抗がん剤を用いる化学療法、ならびに放射線療法のいずれか、またはそれらの組み合わせが基本である。このうち、化学療法や放射線療法は、副作用や耐性の点から治療効果に限界のあることが少なくない。がん細胞への特異性が高く、しかも耐性が生じにくい化学療法剤の開発や、がんの浸潤・転移機構を解明してこれを防止するための研究が進められているが、進行癌や再発癌を克服する決定的な方法

は確立しておらず、そのことが現在もなお、がんを我が国の死因の第一位に押し上げているといっても過言ではない。

細胞の増殖は細胞の内外から受け取る正または負のシグナルのバランスにより制御されている。特定のシグナルに対する反応性が欠如したり、反応性が増強したりすると、細胞は通常なら増殖を防ぐような他のシグナルをも無視して増殖することになる。これは、おそらくシグナルを誤って伝える遺伝子欠損があるか、または細胞周期にしたがって、

細胞の動きを促進するあるいは阻害する分子のアンバランスによるものと考えられる。がんにおいてこのような障害を起こす要因として、遺伝子そのものの変異であるジェネティックな異常とともに、遺伝子の変異を伴わないエピジェネティックな変化があることが明らかにされている。

エピジェネティクスとはゲノムに書かれた遺伝情報を変更することなく、個体発生や細胞分化の過程において、遺伝子発現を制御する現象の総称として使われている。近年、体細胞の核を除核卵細胞内に移植して作出された体細胞クローン動物は、分化が終了した体細胞がいったん脱分化し、それが再び種々の細胞に分化して形成されたものであり、この体細胞クローン動物の誕生において明らかなように、遺伝子のエピジェネティックな修飾は可逆的に書き換え可能である。がんの治療という観点では、このエピジェネティックな変化の可塑性は新たな治療を模索する上で非常に興味深いと考えられた。

2. 研究の目的

体細胞クローン動物の作出の成功という実験事実から、卵細胞質内には分化終了細胞を未分化な状態にする初期化因子および、再び種々の方向に分化させる分化因子が存在することは確実である。申請者はこれらの因子を用いてがんの新たな治療法を開発することを着想した。しかしながら、これらの因子の本態が現在のところ不明であること、また、卵細胞質は十分な量を確保することが難しいことなどからこれまで卵細胞質を研究材料として研究を遂行することは困難であった。そこで本研究では ES 細胞の細胞質を用いて RF, DF の本態を解明し、それらを用いたがんの初期化・分化療法確立に向けた基礎的検討を行うことを企図した。

これまで、エピジェネティックな異常を変化させる薬剤の、がん治療への応用の試みは数多くなされてきた。メチル化阻害剤は抗腫瘍効果が報告されており、今後、他の化学療法剤との併用により、より強い効果が期待されている。また、ヒストン脱アセチル化阻害剤が、肝がん細胞の増殖を抑制すると同時に、同細胞において AFP 発現を修飾することが明らかにされている。これらの薬剤は、アポトーシス関連遺伝子プロモータの脱メチル化やアセチル化により、これらの遺伝子の発現を誘導することでがん細胞にアポトーシスを誘導するという観点から効果が期待されている。これに対して、本研究はがん細胞を初期化並びに再分化させて治療を行うこと、すなわち、がん細胞核をリプログラミングすることを目標としている点で極めて独創的なものであり、本研究の遂行により、がんに対する「リプログラミング療法」とでも

いべき新たな治療法の確立への基礎的検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マイクロマニピュレータを用いて、マウス未受精卵を除核したのち、ドナー細胞であるがん細胞の核を核移植して、その後の胚発生を観察し、さらに形成された胚盤胞から得られた内細胞塊より ES 細胞株 (ntES 細胞) の樹立を行った。

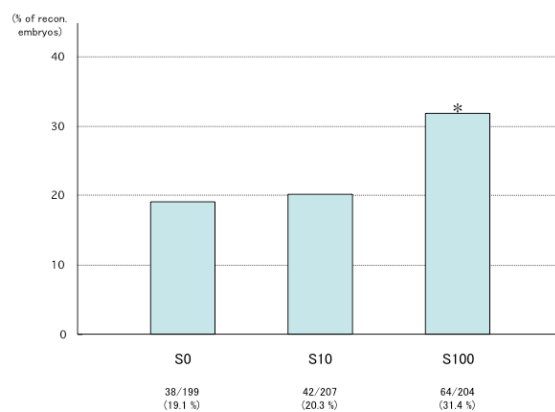
(2) Streptolysin O (SLO) を用いた薬物穿孔法により、細胞質抽出液を他の生細胞に微量注入する方法がすでに確立しており、この方法を用いて、まず、既に核移植の手法を用いて、初期化が起こることを確認した、マウス卵細胞質で薬物穿孔法による初期化を試みた。

(3) マウス未受精卵の細胞質を vitrification 法を用いて凍結した。24 時間以上液体窒素中で保存した後、融解して体細胞核移植に用い、その発生を検討した。

(4) 卵細胞質や ES 細胞質による培養がん細胞のリプログラミングを判断する目的で、未分化マーカーを定量的 PCR 法を用いて検討する実験系を確立した。

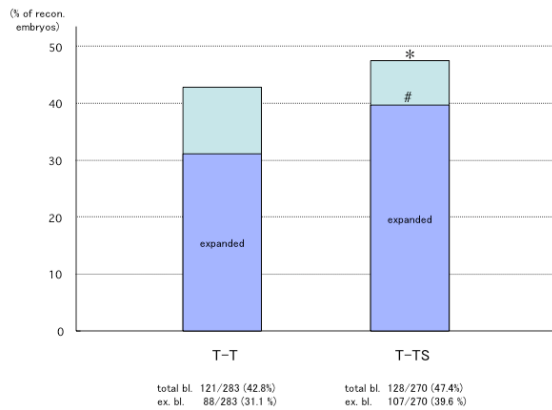
4. 研究成果

(1) すでに ntES 細胞株を樹立し得たマウスの teratocarcinoma に加えて、マウス肝がん細胞株、大腸がん細胞株などのいくつかの培養がん細胞株を用いて検討を行ったが、がん細胞核移植胚の発生は非常に低率で、それぞれの細胞株によって、胚発生の状態も異なることが明らかになった。いくつかの細胞株において低率ではあるが胚盤胞まで到達することは明らかとなり、RF, DF によるリプログラミングががん細胞にも普遍的に影響を与える可能性が示唆された。しかし、さらなる核移植技術の向上と、それぞれのがん細胞株に適した条件を細かく設定する必要があると考えられた。そこで、まず、発生率の向上を目的として、ヒストン脱アセチル化阻害剤の一つである surtinol を用いて体細胞核移植胚の発生率の検討を行った。Surtinol



* S100 > S10, S0 ($p < 0.01$)

単独でも、マウス体細胞核移植胚の発生率は良くなる傾向にあったが、すでに体細胞核移植胚の発生率の改善に寄与することが証明されている同じヒストン脱アセチル化阻害剤の TSA を同時に用いることで、より発生率が良くなることを明らかにした。今後、この方法を用いて検討を行うことで、がん細胞の ntES 細胞株樹立が確実となり、普遍性についての検討も行えると考えられた。



(2) Streptolysin O (SLO) を用いた薬物穿孔法により、まず、マウス除核未受精卵で初期化を試みた。マウス卵細胞質抽出液を培養がん細胞に薬物穿孔法で微量注入して変化を観察したところ、核移植法で生じた様な細胞増殖速度の変化や形態の変化は全く認められなかった。用いる細胞質の量を増やして行っても同様であり、このことから、体細胞に変化をもたらすためには、Xenopus の卵細胞質のような大量の細胞質が必要であろうと考えた。薬物穿孔法で小さな生細胞に注入するには限界がある量であり、やはり RF、DF の抽出が必要と考えられた。少なくとも、RF、DF が多く含まれる細胞質分画を同定する必要があり、そのためには RF、DF が確実に存在する卵細胞質を用いた検討が必要であるが、マウス卵細胞質を研究に用いる場合、量的制約を解決しなくてはならず、そのための手法としてマウス未受精卵の凍結保存が可能であるかを vitrification 法を用いて検討した。一度に大量に vitrification 法を用いて凍結したマウス凍結除核卵細胞に体細胞核移植を行った。その結果、非凍結卵細胞質への体細胞核移植の胚盤胞到達率 46.8% に対して凍結除核卵細胞への体細胞核移植胚は 15.7% と有意に低かった。しかし、得られた胚を偽妊娠マウスに胚移植したところ、生仔が 3 匹 (生仔獲得率 0.4%) 得られた。この結果から、凍結-融解によっても RF、DF の初期化能は維持されることが明らかになった。凍結後の発生率の低下の原因を詳細に検討することは、より良い凍結保存法の開発に結びつくと考えられたため、核と卵細胞質のそれぞれに対する凍結の影響を独立して検討

することのできる MESI (Metaphase II spindle injection) 法を確立した。

将来的に大量の卵細胞質を用いた RF や DF の分離・精製を念頭に置き、この方法論を用いて、これらの因子が凍結により受ける影響の詳細な検討や、より良い保存法を確立することが、卵細胞質内の RF や DF の特性の解析や将来的にその分離同定に繋がると確信する。

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 4 件)

- 1) Hirata S, Fukasawa H, Wakayama S, Wakayama T, Hoshi K: Generation of healthy cloned mice using enucleated eggs preserved oocytes. Cell Reprogram 査読有 Feb;13(1):7-11, 2011
- 2) Tagaya H, Fukasawa H, Shoda T, Hirata S, Hoshi K: Novel alpha fetoprotein-V mRNA isoform in human. Reprod Sci 査読有 16(8):794-801, 2009.
- 3) 深澤宏子, 多賀谷光, 正田朋子, 笠井剛, 平田修司, 星和彦: 未受精卵の細胞質に凍結が及ぼす影響-凍結除核未受精卵を用いた体細胞クローン胚による検討. 日本生殖医学会雑誌 査読無 53(4):99(223), 2008.(シンポジウム)
- 4) Hirata S, Fukasawa H, Tagaya H, Shoda T, Wakayama T, Hoshi K: Effects of sirtinol on early development of the cloned murine embryo. Yamanashi Med J 査読有 23(4):97-107, 2008.

[学会発表] (計 4 件)

- 1) Fukasawa H, Fujie M, Mabuchi T, Hirata S: Spindle replacement of oocyte by metaphase II spindle injection (MESI). The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicin and The 10th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicin. 2010/12 Fukuoka
- 2) 深澤宏子, 藤江道子, 平田修司: MESI 法を用いた 1-day-old 卵の紡錘体ならびに細胞質の機能の検討. 第 55 回日本生殖医学会学術講演会 2010 年 11 月 徳島
- 3) 深澤宏子, 藤江道子, 平田修司, 星和彦: 未受精卵の核および細胞質に凍結-融解が与える影響. 第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会 2010 年 4 月 東京
- 4) 深澤宏子, 多賀谷光, 正田朋子, 笠井剛,

平田修司, 星和彦: 未受精卵の細胞質に凍結が及ぼす影響-凍結除核未受精卵を用いた体細胞クローン胚による検討. 第 53 回日本生殖医学会学術講演会・総会 2008/10/23-25 神戸 (シンポジウム)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深澤 宏子 (FUKASAWA HIROKO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号 : 60362608

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし