

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07155

研究課題名(和文) 腫瘍血管の構造解析に基づいたがん幹細胞への新規薬物送達法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel drug delivery system for targeting cancer stem cells based on the structural analysis of tumor blood vessels.

研究代表者

丸山 正人 (Maruyama, Masato)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：00399445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウス乳がん由来4T1細胞から幹細胞の培養方法であるスフェア培養法を用いて樹立した複数のクローン細胞株を樹立し、その中から、既知のがん幹細胞マーカーであるCD44変異体が高発現していること、*in vivo* 腫瘍形成能や幹細胞関連遺伝子の発現量が高いこと、ドキソルビシンに対する抵抗性が高いことなど、がん幹細胞様の特徴を有するモデル細胞株を樹立することができた。さらに、ドキソルビシンに対する抵抗性には、MRP1が寄与している可能性を示した。以上より、樹立した細胞株は、がん幹細胞を標的とした新規治療法を開発するために重要な役割を果たすものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん幹細胞は、がんの再発や転移に重要であることが知られているものの、ヒトの腫瘍組織から作成することが多く、市販されているものがほとんど無いため、実験材料を得ることすら難しい。本研究において、マウス乳がん由来4T1細胞からがん幹細胞様の特性をもつモデル細胞株を樹立することに成功したため、今後は、薬物送達に利用できる新規細胞表面抗原の探索研究、がん幹細胞に有効な薬剤のスクリーニング研究など、がん幹細胞を標的とした新規治療法の開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have established subclones from single cell of mouse 4T1 breast cancer cell line by sphere culture in stem cell medium. Then, we found that established subclones showed cancer stem-like properties such as high expression of CD44 variant, a cancer stem cell marker, *in vivo* high tumorigenicity, high expression of stem cell-related genes, and resistance to doxorubicin. Furthermore, we suggested that MRP1 would contribute to the doxorubicin resistance. These results indicated that established cancer stem cell clones would be useful for investigating the cancer stem cell-targeting therapy.

研究分野：薬剤学

キーワード：がん幹細胞 スフェア培養 乳がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍治療後の再発・転移の原因として、がん幹細胞の存在が注目されている。がん幹細胞は、腫瘍組織内にごく少数しか存在しない細胞であるが、化学療法剤や放射線治療に対して抵抗性を有し、また自己複製と分化を繰り返して腫瘍組織を形成することができる。従来の治療法は、腫瘍組織全体をターゲットとしていたため、抗がん剤や放射線に対して抵抗性を有するがん幹細胞に対しては有効ではなく、残存したがん幹細胞が再発の要因になると考えられるようになってきた。そのため、最近では、がん幹細胞をターゲットとした治療法が有効であると考えられており、がん幹細胞特異的に発現するバイオマーカーの探索や、幹細胞性維持・自己複製のメカニズム解明など、がん幹細胞における治療標的分子の探索研究が活発に行われている。しかし一方で、がん幹細胞に対する有効な治療薬が見出されたとしても、薬物が、がん幹細胞に到達しなければ、薬効が十分に発揮されないという新たな課題が考えられた。そこで、がん幹細胞を標的とした治療法を確立するためには、薬物をがん幹細胞へと送達させるシステムを確立することが重要であると考えられた。

#### 2. 研究の目的

これまでの研究は、がん幹細胞の治療標的分子の探索や腫瘍組織への薬物送達法に焦点をあてており、がん幹細胞を標的とした薬物送達法の研究は、ほとんど進んでない。そこで、本研究では、がん幹細胞のモデル細胞株を樹立し、その特性を解析することで、がん幹細胞への新規薬物送達法を確立するために必要な基礎的知見を得る。延いては、がん幹細胞の腫瘍内における局在性と、その周辺に存在する血管の構造及び機能を解析し、得られた結果に基づいた最適な薬物送達法の確立を目指す。

#### 3. 研究の方法

##### (1) がん幹細胞のモデル細胞株の樹立

マウス乳がん由来 4T1 細胞を 96 ウェルプレートにシングルセルとなるように播種し、上皮細胞増殖因子 (EGF) と塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を含有する無血清培地 (幹細胞用培地) 中で浮遊培養した。培地には 2 日に 1 回、bFGF と EGF を終濃度 20 ng/mL になるように添加し、各ウェルにおいて増殖した細胞をクローン株としてストックした。

##### (2) 既知のがん幹細胞マーカーの発現解析

既知のがん幹細胞マーカー分子である Aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) 及び CD44 variant (CD44v) の mRNA 発現を、RT-PCR 法あるいはリアルタイム PCR 法により解析した。さらに、ALDH 活性について ALDEFLUOR assay Kit を用いて解析し、CD44v のタンパクレベルの発現について特異抗体を用いて、フローサイトメーターにより解析した。

##### (3) 腫瘍形成能の解析

BALB/c 雌性マウスの皮下に  $0.5 \times 10^6$  あるいは  $1 \times 10^6$  個の細胞を移植し、経日的に腫瘍径を測定し、腫瘍体積を算出した。

##### (4) ドキソルビシン耐性の評価

細胞を 96 ウェルプレートに播種して 24 時間後、各ウェルに様々な濃度のドキソルビシンを添加した。さらに、24 時間後、Cell Counting Kit-8 を用いて細胞毒性アッセイを行い、マイクロプレートリーダーで吸収波長 450 nm における吸光度を測定した。

##### (5) 統計解析

有意差検定は、統計解析ソフト EZR あるいは GraphPad Prism4 を用いて解析した。

#### 4. 研究成果

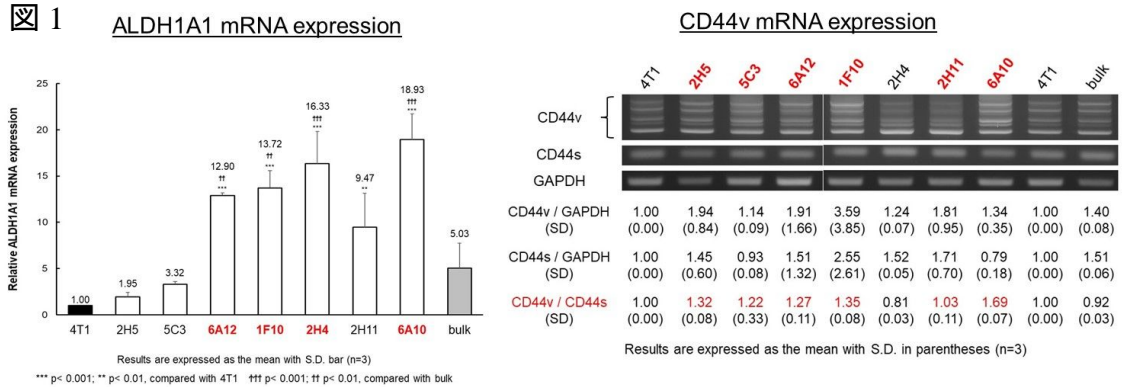
##### (1) がん幹細胞のモデル細胞株の樹立

がん幹細胞は、患者から抽出した腫瘍組織から単離・培養して研究に用いられることが多いものの、現実には入手が困難である。さらに、普遍的ながん幹細胞マーカーが存在しないことなどから、腫瘍組織中にごく少数しか存在しないがん幹細胞を単離することも容易ではないため、がん幹細胞のモデル細胞が必要とされている。そこで初めに、マウス乳がん由来 4T1 細胞を用いて、がん幹細胞のモデル細胞樹立に取り組んだ。一般に、幹細胞は無血清培地中で浮遊培養させても増殖可能であるが、分化した細胞は増殖に足場を必要とするため、浮遊培養させるとアポトーシスが誘導されることが知られている。そこで、4T1 細胞を 96 ウェルプレートにシングルセルとなるように播種し、幹細胞用培地中で浮遊培養させ、増殖したクローン株を複数樹立した。

##### (2) がん幹細胞マーカーの mRNA 発現解析

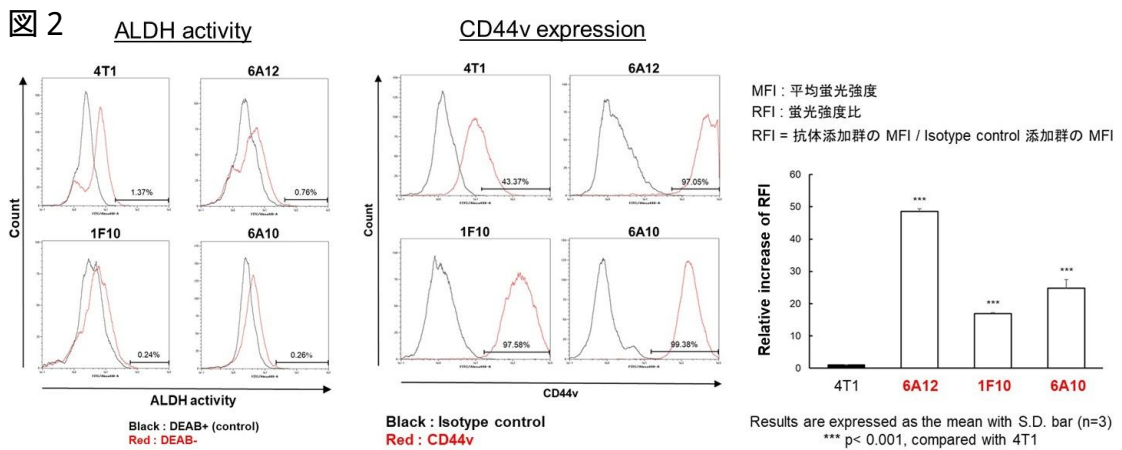
次に樹立したクローン株において、既知の CSC マーカーである Aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) 及び CD44 variant (CD44v) の mRNA 発現を、RT-PCR 法あるいはリアルタイム PCR

法により解析した。ALDH1A1 は乳がん組織のごく一部の細胞で発現が確認されることや、ALDH1A1 の発現と乳がんの予後が逆相関することが報告されている。CD44 ファミリーには正常組織で高発現する標準型アイソフォームである CD44 standard (CD44s) に加え、variant エクソンを含むアイソフォーム CD44v が複数存在することが知られており、CD44v/CD44s 比が高いほど肺転移能が高くなることが報告されている。そこで、樹立した各クローンにおける ALDH1A1 mRNA 発現量及び CD44v/CD44s 比を解析した(図1)。その結果、1F10、6A10、6A12 の3種類のクローン株が、親株である 4T1 細胞よりも、ALDH1A1 mRNA 発現量、CD44v/CD44s 比が高いことが示されたため、CSC モデル細胞株の候補として以降の検討に用いた。



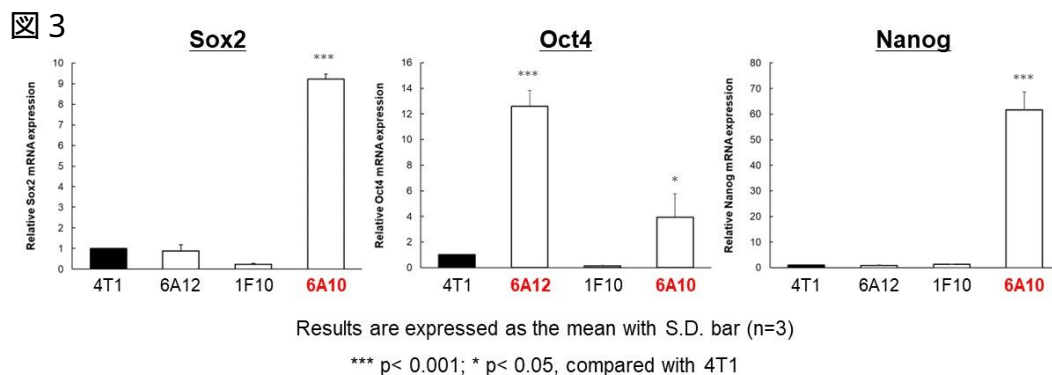
### (3) がん幹細胞マーカーのタンパク発現解析

次に、選択したクローン株におけるがん幹細胞マーカーのタンパク発現を解析した。ALDH1A1 の発現は ALDH の酵素活性を指標にして、CD44v の発現は特異抗体を用いて、フローサイトメーターにより解析した。その結果、親株である 4T1 細胞と比べて、1F10、6A10、6A12 の3種類のクローン株は、いずれも ALDH 陽性細胞数に増加は見られなかったが、ほとんどの細胞表面に CD44v を発現していることが確認され、その発現量は 6A12 で最も高く、次いで 6A10、1F10 の順であった(図2)。



### (4) 樹立したクローン株の幹細胞性の評価

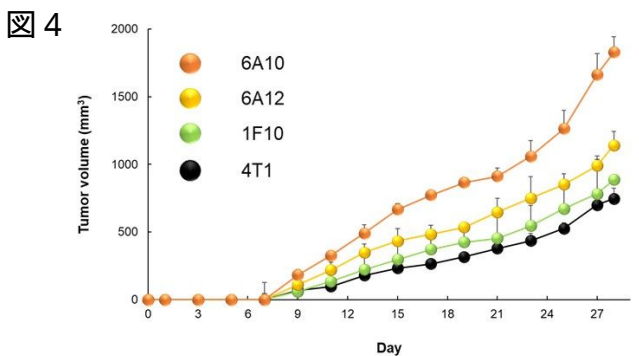
樹立した3種類のクローン株(1F10、6A10、6A12)の幹細胞性について調べるため、幹細胞関連遺伝子である Sox2、Oct4、Nanog の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法を用いて解析した。その結果、4T1 細胞と比べて、6A10 細胞において Sox2、Oct4、Nanog 遺伝子が、6A12 細胞



において Oct4 遺伝子が有意に発現していたことから、これらのクローン株は幹細胞性を有していることが示唆された ( 図 3 )。

(5) 樹立したクローン株の腫瘍形成能の評価

がん幹細胞における重要な特性は、in vivo での高い腫瘍形成能を有することである。そこで、1F10、6A10、6A12 の 3 種類のクローン株と 4T1 細胞を、BALB/c マウスの皮下に移植し、腫瘍体積を経日的に測定することで in vivo 腫瘍形成能を評価した。その結果、6A10 次いで 6A12 細胞移植群において、4T1 細胞移植群に比して有意に高い in vivo 腫瘍形成能が認められた ( 図 4 )。

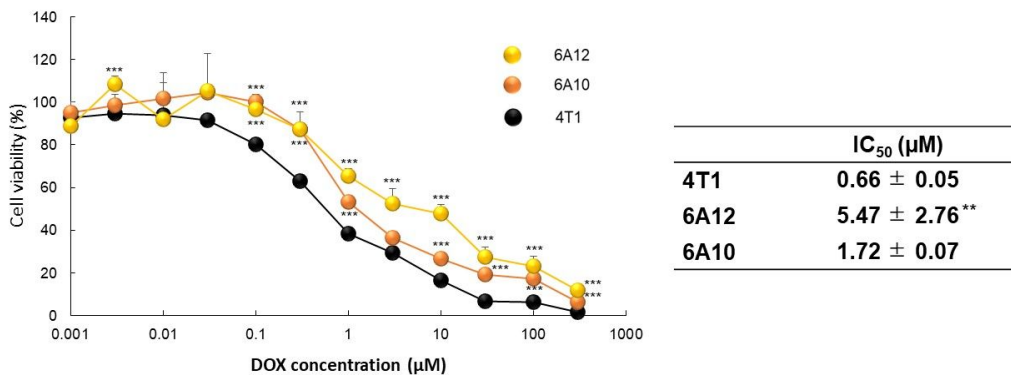


Each point represents the mean tumor volume with S.D. bar (n=3-5)  
\*\*\* p< 0.001; \*\* p< 0.01; \* p< 0.05, compared with 4T1.

(6) 樹立したクローン株のドキソルビシン耐性の評価

さらに、6A10、6A12、4T1 細胞において、抗がん剤ドキソルビシン添加時の細胞生存率を調べた結果、6A10 及び 6A12 細胞は、4T1 細胞と比べて IC50 値が、それぞれ 2.5 倍及び 8 倍高いことが示され、ドキソルビシンに対して耐性を有することが明らかとなった。( 図 5 )

図 5

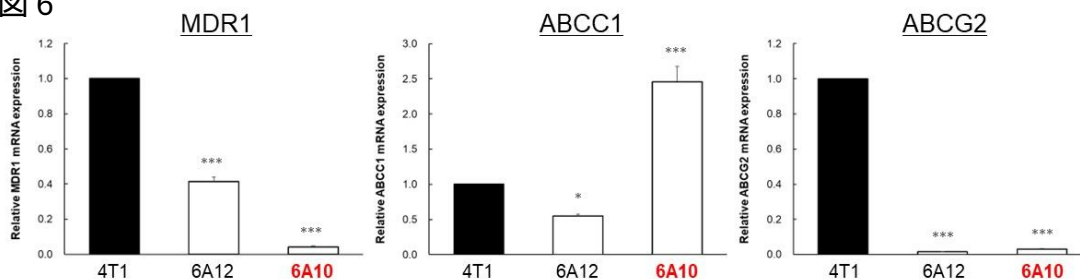


Results are expressed as the mean with S.D. bar (n=5)  
\*\*\* p< 0.001; \*\* p< 0.01, compared with 4T1

(7) 樹立したクローン株における薬剤排出トランスポーターの発現解析

( 6 ) で 6A12 細胞に薬剤耐性が生じた原因を調べるため、各クローン株における薬剤排出トランスポーター遺伝子の発現解析を行った。その結果、6A10 細胞において、ABCC1 遺伝子の高い発現が見られたため、6A10 細胞のドキソルビシン耐性の原因として、MRP1 が関与していることが示唆された ( 図 6 )。

図 6



Results are expressed as the mean with S.D. bar (n=3)  
\*\*\* p< 0.001; \* p< 0.05, compared with 4T1

以上より、4T1 細胞から樹立した 2 種類のクローン株 (6A10、6A12)において、有意に高いがん幹細胞マーカーCD44v の発現、幹細胞性、in vivo 腫瘍形成能、ドキソルビシン耐性が認められたため、樹立した細胞株はがん幹細胞のモデル細胞として、がん幹細胞を標的とした薬物送達法の確立、更には有効な治療法の確立に重要な役割を果たすものと考えられた。さらに、本研究において樹立したがん幹細胞株は、がん幹細胞の自己複製・幹細胞性維持・薬剤耐性に関わるメカニズムの解明や、薬物送達に利用できる新規細胞表面抗原の探索研究、がん幹細胞に対して有効な薬物のスクリーニング研究など、がん幹細胞を標的とした創薬研究にも広く応用できる新たなバイオリソースとしても有用であると考えられる。

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 0件）

1. 発表者名 瀬口 実穂、丸山 正人、檜垣 和孝
2. 発表標題 マウス乳がん由来4T1細胞におけるがん幹細胞様のモデル細胞株樹立に関する研究
3. 学会等名 第38回日本DDS学会
4. 発表年 2022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
研究分担者	檜垣 和孝  (Higaki Kazutaka)  (60284080)	岡山大学・医歯薬学域・教授    (15301)	

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