

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18725

研究課題名(和文) 癌の微小環境を模倣する口腔癌細胞培養上清によるヒトiPS細胞からの癌幹細胞誘導

研究課題名(英文) Induction of cancer stem cells from human iPS cells by oral cancer cell culture supernatant that mimics the cancer microenvironment

研究代表者

中瀬 洋司 (Nakase, Yoji)

広島大学・医系科学研究科(歯)・専門研究員

研究者番号：30826839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：「正常幹細胞が癌微小環境の影響を受けることで癌幹細胞が発生する」という仮説の下、iPS細胞を“正常幹細胞”、口腔癌細胞由来無血清培養上清を“癌微小環境”に見立て、口腔癌細胞由来無血清培養上清を添加してiPS細胞を無血清条件下で培養することで癌幹細胞様細胞を誘導する研究を行った。また、口腔癌細胞由来無血清培養上清から抽出したエクソソームを添加して無血清条件下でiPS細胞を培養して癌幹細胞様細胞を誘導する実験を行った。

誘導した細胞は上皮系マーカーが上昇していることに加え、未分化マーカーの発現を維持する細胞株もあり、誘導細胞が癌幹細胞様の細胞である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年エクソソーム研究が盛んに行われているが、その多くが血清添加条件下で培養した細胞の培養上清より回収しており血清由来のエクソソームや不確定因子混入の可能性が排除できない。本研究ではiPS細胞の樹立から培養上清回収用の癌細胞培養に至るまですべての工程を無血清条件下で行うため、外来種エクソソームの混入がなく、細胞を分化誘導する因子やメカニズムの解明には有利であると考えられる。

誘導した癌幹細胞様細胞の機能や発生メカニズムを解析することで、口腔癌の新規治療法の開発に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Under the hypothesis that "normal stem cells are affected by the cancer microenvironment to generate cancer stem cells", iPS cells are regarded as "normal stem cells" and oral cancer cell-derived serum-free culture supernatant is regarded as "cancer microenvironment". We conducted a study to induce cancer stem cell-like cells by adding serum-free culture supernatant derived from oral cancer cells and culturing iPS cells under serum-free conditions. In addition, an experiment was conducted in which iPS cells were cultured under serum-free conditions by adding exosomes extracted from oral cancer cell-derived serum-free culture supernatant to induce cancer stem cell-like cells.

In addition to the elevated epithelial markers, there are also cell lines that maintain the expression of undifferentiated markers, indicating that the induced cells may be cancer stem cell-like cells.

研究分野：口腔癌

キーワード：癌幹細胞 エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔がんは、HPV 関連口腔がんの増加もあいまって世界で増加しており、特に betel-quid あるいは betel-nuts chewing の習慣を持つ東南アジア諸国では第一位のがんである。したがって、新たな診断・治療法の確立が急務である。口腔癌治療では、主に手術、放射線や化学療法が行われているが、臨床的に十分な反応が得られたと思われる症例であっても数年後に再発する例が見られ、これらは癌幹細胞に起因すると考えられている。癌幹細胞がその形質を長期維持するためには、特殊な周囲環境である癌幹細胞微小環境が整う必要があると考えられている。癌幹細胞微小環境が正常幹細胞のそれと類似しているとする説と、質的または量的に異常があり癌の原因の一部もしくは進行の一助となっているとする説など諸説あり、癌幹細胞自体の起源やその微小環境については、正常幹細胞のそれ以上に不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、なぜ癌が発生するのか、なぜ自身の遺伝情報をもった癌細胞が自身の生命を脅かすほど暴走するのかを明らかにするため、「正常幹細胞が癌微小環境の影響を受けることで癌幹細胞が発生する」という仮説の下、iPS 細胞を“正常幹細胞”、口腔癌細胞由来無血清培養上清を“癌微小環境”と見立て、口腔癌細胞由来無血清培養上清を用いて培養することで iPS 細胞から癌幹細胞様細胞を誘導し、癌幹細胞発生のメカニズムを解析して癌幹細胞の機能と役割に迫り癌の新規治療法の開発に繋げる。また、近年エクソソーム研究が盛んに行われているが、その多くが血清添加条件で培養した細胞の培養上清より回収しており、血清由来のエクソソームの混入の可能性が排除できない。本研究では iPS 細胞の樹立から培養上清回収用の癌細胞培養に至るまですべての工程を無血清条件で行うため、外来種エクソソームの混入が起こらない。iPS 細胞、口腔癌細胞ともに無血清培養であるため未知の因子や病原体混入の可能性、ロット差などの不確定要素を排除した条件で、その発生機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

iPS 細胞の培養には、不確定要素を排除するため、その未分化性と多分化能を、血清およびフィーダー細胞を用いずに維持可能な単層無血清培地 hESF9 培地(基礎培地 hESF-GRO に 6 因子 (insulin、transferrin、2-mercaptoethanol、2-aminoethanol、Sodium selenite、Oleic acid conjugated with fatty acid-free human recombinant albumin)およびアスコルビン酸、fibroblast growth factor-2、heparin を添加)を用いた。また、癌細胞の培養では、無血清培地 DF (DMEM/F12 1:1 混合培地)培地に上記 6 因子を加えた DF6F 培地を用いた。

(1) iPS 細胞をそれぞれ無血清培地 hESF9 培地で 1 週間培養したのち、扁平上皮癌細胞を培養していた無血清培地 (Conditioned Medium、以下 CM) を、無血清培地 DF6F 培地に添加し、培地交換後に誘導される細胞を観察した。

(2) 無血清培地 DF6F 培地で維持した扁平上皮癌細胞株 A431 を基礎培地 DF に交換後、培養上清を回収、0.45 μm のフィルターを通した後、超遠心法にてエクソソームを回収した。その後、iPS 細胞をそれぞれ無血清培地で 1 週間培養したのち、回収したエクソソームを無血清培地 DF6F 培地に添加し、培地交換後に誘導される細胞を観察した。エクソソームの濃度は、培養液 1ml あたり 0.25 μg とした。

(3) 上記(1)および(2)で誘導した細胞から RNA を回収し、遺伝子発現(未分化マーカーである Oct、Nanog、Sox2 および上皮系マーカーである KRT5、TP63)を検討した。

(4) 上記(1)および(2)で誘導した細胞を蛍光免疫染色し、上皮系マーカーである TP3 およびパンケラチンのタンパク発現を検討した。

(5) 培養皿のコートニングの違い(無コートニング、ラミニンコートニングおよびコラーゲンコートニング)による誘導効率の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 無血清培地 DF6F 中の CM の濃度を、0%、10%、50%、100%と調整し 7 日間培養を続けると、いずれの濃度においても敷石状の分化細胞へと誘導されていった。

(2) エクソソームの濃度は無血清培地 DF6F 1ml 中 0.25 μ g とし、7日間培養を続けると、敷石状の分化細胞へと誘導されていった。

(3) 上記(1)および(2)で誘導した細胞から RNA を回収し、定量 PCR にて各種遺伝子発現を検討した(図1)。未分化マーカーである Oct、Nanog、Sox2 はいずれの CM 濃度においても濃度が高くなるほど発現が高い傾向があった。CM100%で培養した iPS 細胞は、Nanog および Sox2 の発現において Control (未分化 PS 細胞) と同等の発現を維持していた。また、上皮分化マーカーである KRT5 では明らかな差を認めなかったが、同じく上皮系マーカーである TP63 の発現は、CM を添加すると増加していることが分かった。

無血清条件下で培養した扁平上皮癌細胞株 A43 由来のエクソソームを添加して iPS 細胞を 7 日間培養した結果でも同様に Nanog および Sox2 の発現が維持され、TP63 が高発現する結果となった。

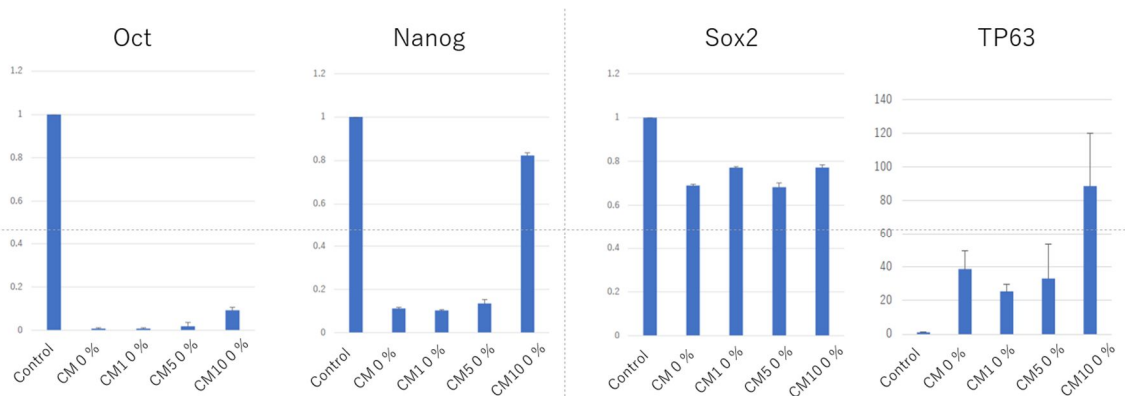


図1 CM添加し7日間培養後のiPS細胞の各種マーカー発現 (qPCR)

(4) 記(1)および(2)で誘導した細胞を上皮系マーカーであるパンケラチンおよび TP63 の蛍光免疫染色を行い、そのタンパク発現を検討した。パンケラチンおよび TP63 のいずれにおいても発現を認め、上皮系細胞へ分化していることが示された。(図2)

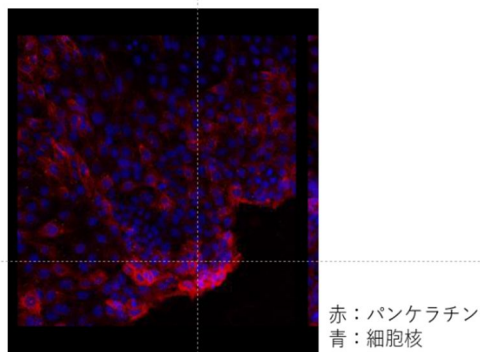


図2 CM添加し7日間培養後のiPS細胞のケラチン発現 (蛍光免疫染色)

(5) 培養皿のコーティングを、コーティング無し、ラミニンまたはコラーゲンで行い、誘導細胞に違いがあるか検討した。コーティング無しでも上皮系細胞への分化を認めたが、細胞の接着率が低く長期継代には向かなかった。コーティング有りでは、ラミニンコーティングとコラーゲンコーティングで細胞の接着率に明らかな差を認めなかった。ラミニンコーティングの方がコラーゲンコーティングよりも未分化マーカーおよび上皮系マーカーのいずれも発現が高い傾向にあった。

以上の結果より、扁平上皮癌細胞の CM および扁平上皮癌細胞由来のエクソソームを添加して培養することで、未分化性を維持したまま上皮系細胞へと誘導した可能性が示された。この細胞が癌幹細胞様の細胞であることを示すためには、幹細胞マーカーである CD133 陽性細胞の存在率の検討が必要であり、フローサイトメトリー解析を行う必要がある。また、免疫不全マウスへの細胞移植を行い、腫瘍形成能の検討も行う必要がある。

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

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