

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791307

研究課題名（和文）

iPS 技術を応用した人工癌幹細胞（iCaPS 細胞）の樹立及び機能解析

研究課題名（英文）

Establishment and characterization of cancer stem cell model using iPS technology

研究代表者

福田 和正 (FUKUDA KAZUMASA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50348786

研究成果の概要（和文）：

胃癌細胞株及び臨床検体をもとに作製された誘導型癌幹細胞は、形態的特性や増殖能に加えて遺伝子発現パターンにおいて iPS 細胞と類似性が示唆された。ALP 活性、SSEA-3/4 発現強度について酵素反応および免疫染色法による解析により評価を行った結果、各 iCaPS 細胞クローンにおいて高い幹細胞活性が示された。抗癌剤（5FU、CDDP 及び PTX）感受性試験では、野生株と比べ iCaPS 細胞クローンにおいて薬剤抵抗性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrate induction of iCaPS from human gastric cancer (GC) cell lines and primary culture cell derived from the patients with GC introducing Yamanaka four factors, Oct3/4, Sox2, c-Myc, and Klf4, under ES cell culture conditions. These cells, which we designated iCaPS, exhibit the morphology and growth properties of iPS cells. These data suggest that CSCs (cancer stem-like cells) can be directly generated from human GC cell lines by the addition of only a few defined factors. We analysed expression of alkaline phosphatase. These data indicated that iCaPS cells acquired immature status. WST-8 assay showed that iCaPS cells were acquired low sensitivity to fluorouracil, cisplatin and PTX compared with wild type cell. As novel therapeutic approaches in GC, the properties of iCaPS should be investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：癌幹細胞

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：iPS、人工癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、癌組織の中に存在する少数細胞集団が分化と自己複製を繰り返しながら癌構成細胞を供給し続けるという幹細胞的な性質を持つことを証明する報告がなされ、白血病においてはじめてその実体が示された。骨髓内における造血幹細胞の分子生物学的特徴が解明されており、そのマーカー分子で白血病細胞を分離してみたところ、幹細胞マーカーを提示している細胞のみが増殖能力が高いことが示唆されている。更に、固形癌においても癌幹細胞の存在が示されており、乳癌では CD24-CD44+ 細胞が幹細胞として増殖能が高く免疫不全マウスにおける移植実験から高い腫瘍形成能を有することが示唆されている。一方、2006 年山中らはマウス体細胞にレトロウイルスベクターを用いて4つの因子 (Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4) を導入し、形態や増殖能が ES 細胞と類似し、分化多能性も持つ人工万能幹細胞 (iPS 細胞) の樹立に成功している。こうした背景のもと、iPS 技術は、人工癌幹細胞の作製に応用できることが期待された。

2. 研究の目的

われわれは、ヒト胃癌細胞株に iPS 細胞を樹立するのと同様の手法を用いて、ヒト胃癌細胞株由来の人工多能性幹細胞様の細胞の樹立を試みた。消化器領域における癌幹細胞の機能解析において、各消化器における正常な組織幹細胞が分離同定されていない中で、prospective な分離同定を試みることは困難を要することが示唆される。こうした背景のもと癌幹細胞の機能解析を行う上で有用なモデル細胞であると考えられる人工癌幹細胞 (iCaPS 細胞) の作製を目的とした。

3. 研究の方法

(1) iCaPS 細胞の樹立

ヒト胃癌細胞株および胃癌患者より得られた初代培養細胞をもとに、レトロウイルスベクターを用いて4因子 (Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4) もしくは3因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4) の導入を行い、iCaPS を作製する。作製されたコロニーは、鏡視下における形態観察、PCR 法による導入遺伝子の発現強度によりスクリーニングを行う。(Fig. 1)

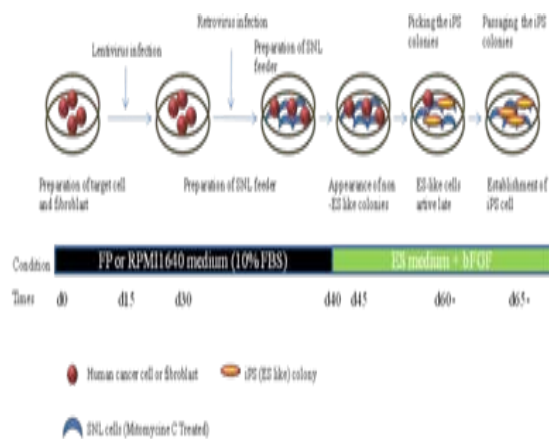


Fig.1 iPS技術を用いた誘導的癌幹細胞の作製

(2) iCaPS 細胞の特性評価

樹立した iCaPS 細胞における未分化性 (アルカリフォスファターゼ活性測定、SSEA3/4 発現強度)、分化能、増殖能 (WST-8 法) などの機能について、ヒト ES 細胞及び HDF 由来 iPS 細胞との比較解析により評価を行う。

(3) 異所性組織構築能の検討

免疫不全マウス (NOD/SCID/ γ cnull immunodeficient) への移植等により異所性組織構築及び造腫瘍性能について評価を行う。

(4) 制御因子の同定

樹立した iCaPS 細胞について、DNA Microarray および特異的遺伝子のメチル化解析を行う。得られた結果に基づき、siRNA による候補遺伝子の発現抑制により機能解析を行う。

4. 研究成果

われわれは、胃癌細胞株である MKN28、MKN45 及びヒト胃癌臨床検体より得られた初代培養細胞を用いて iPS 細胞を樹立するのと同様の手法を用いて、ヒト胃癌細胞株由来の人工多能性癌幹細胞 (iCaPS ; induced cancer pluripotent stem cell) の樹立を試みた。山中 4 因子を導入後、ヒト ES 細胞の条件下で培養を行うことにより、形態的特性や増殖能に加えて遺伝子発現パターンが ES 細胞と類似したヒト iCaPS 細胞の樹立に成功した (Fig. 2)。

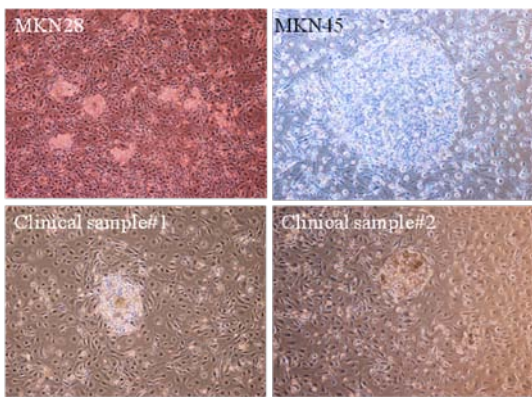


Fig.2 胃癌細胞株及び臨床検体を用いた誘導型癌幹細胞のコロニー形成

純化した各 iCaPS 細胞クローンについて、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性 (Fig. 3)、SSEA-3/4 発現度合いについて酵素反応および免疫染色法による解析により未分化性の評価を行った。その結果、各 iCaPS 細胞クローンにおいて高い幹細胞活性が示された。

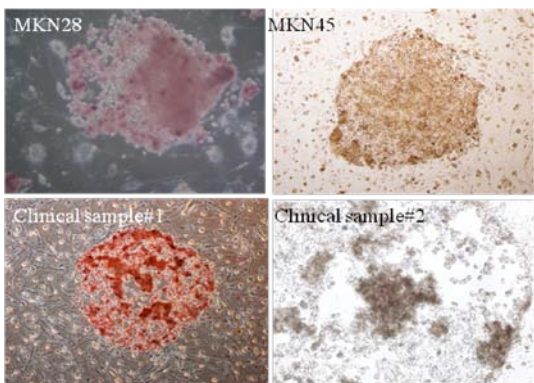


Fig.3 アルカリホスファターゼ (ALP) 活性の評価

抗癌剤感受性試験における 5FU、CDDP 及び PTX の 48 時間の曝露では、野生株と比べ iCaPS 細胞クローンにおいて薬剤抵抗性を示す傾向が示唆された (Fig. 4)。

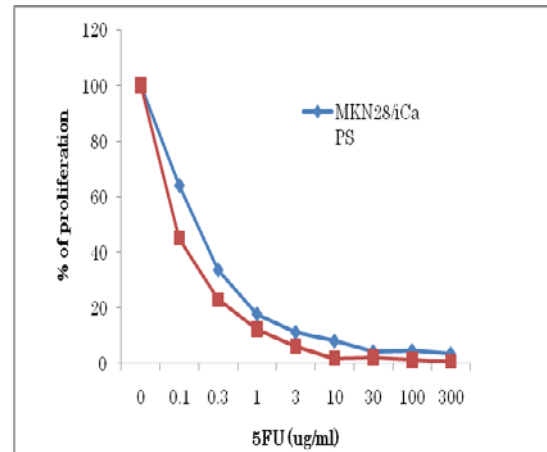
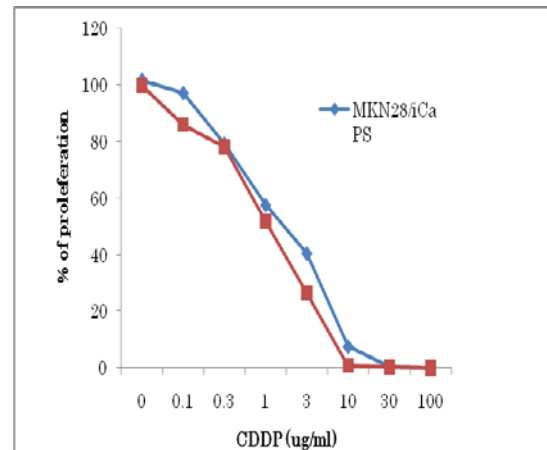
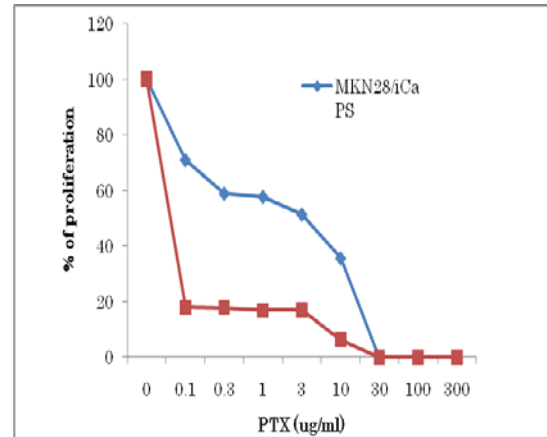


Fig.4 薬剤感受性試験

消化器領域における癌幹細胞の機能解析において、各消化器における正常な組織幹細胞が分離同定されていない中で、prospective

な分離同定を試みることは困難を要することが示唆される。こうした背景のもと iCaPS 細胞の樹立及び機能解析は、癌幹細胞の機能解析を行う上で非常に有用なモデル細胞であると考えられる。今後、自己複製能、分化能、造腫瘍性能等の評価を行い、癌幹細胞の特性を明らかにし、新たな治療開発への寄与を目指すことを目的とする。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 和正 (FUKUDA KAZUMASA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50348786

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし