

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09485

研究課題名（和文）ハイドロゲルを用いたがん幹細胞形質の誘導と新規治療標的の探索

研究課題名（英文）Induction of cancer stem cell phenotype using hydrogel and discovery of new therapeutic targets

研究代表者

渡利 英道（Watari, Hidemichi）

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：10344508

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ハイドロゲルを基質として用いた二次元培養により、卵巣癌幹細胞の誘導を試みた。その結果、ハイドロゲル上での培養により得られた細胞はがん幹細胞の特性（幹細胞バイオマーカーの高発現、高い抗がん薬耐性、およびミトコンドリア代謝への依存性）が観察された。さらにin vivo実験では、これらの細胞は対照細胞に比べてより高い造腫瘍能を示した。マイクロアレイ解析の結果、卵巣癌幹細胞に特異的に高発現する遺伝子Xを特定した。これはこれまでの研究では幹細胞性との関連が報告されていなかった分子である。今後は、遺伝子Xを標的とした阻害療法の有効性を検討することで、卵巣癌治療の新たな治療法の開発に繋がる知見と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん幹細胞を標的とする効果的な治療法を開発するためには、がん幹細胞の特性を詳細に解明することが不可欠である。その手段の一つとして、本研究で示された卵巣癌幹細胞の誘導法を用いること、その細胞内シグナル伝達や遺伝子発現に関する詳細な解析を行うことで、今後の難治性卵巣癌の新規治療法の開発に繋がることが期待される。したがって、今後の卵巣癌の治療成績向上に資する可能性のある研究であり、学術的並びに社会的意義が高い研究成果が得られたと考えている。

研究成果の概要（英文）：Two-dimensional culture using hydrogel enabled the induction of ovarian cancer stem cells. Cells obtained by hydrogel induction exhibited stem cell characteristics, with high expression of stem cell biomarkers, high anticancer drug resistance, and dependence on mitochondrial metabolism observed. Furthermore, in vivo experiments showed that these cells exhibited stronger tumorigenic potential. From microarray analysis, we identified a gene X that is highly expressed specifically in ovarian cancer stem cells. This has not been reported in previous studies, and inhibitory therapy targeting gene X could be a new potential therapy for ovarian cancer.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣がん幹細胞 ハイドロゲル

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は女性に多い5大がんの一つであり、婦人科がんによる死亡原因の第1位である。卵巣は骨盤内にある臓器で、卵巣癌の初期段階では自覚症状が乏しく、早期発見法がないため、約50%の患者は進行がんで発見される。腫瘍減量手術並びにプラチナ製剤とタキサン製剤の組み合わせによる一次化学療法による寛解率は比較的高いが、その後の再発率が高く、再発例の予後は極めて不良である。その原因の一つとして、癌幹細胞（Cancer Stem Cell : CSC）がG0期に停滞することによって新たな腫瘍を生じさせ、がんの再発、転移、多剤耐性、放射線耐性をもたらすことが挙げられる。

CSCはがん細胞塊から分離、培養することが可能であり、その方法として、①Side Population法、②CD133、CD44、ALDH1、OCT4などの卵巣がんにおけるCSCマーカーを指標としたFlow Cytometry法による分離、③sphere培養によってCSCを維持、増殖させる方法、などが挙げられる。しかし、以上の方法は手技的にも煩雑で、固形腫瘍におけるCSCの単離は比較的困難であり、どの方法が普遍的であるかについての検も必ずしもなされていないのが現状である。

細胞培養においては二次元培養が従来から一般的に用いられているが、生体環境との乖離が指摘され、生体に近い条件下での培養が求められている。三次元培養法は生体環境に類似しているが、手間がかかるため普及していない。そこで、生体に近い環境を簡便に模倣するために、ハイドロゲル（DNゲル、PCDMEゲル、PNaSSゲル、PAMPSゲル、PDMAAmゲルなど）を用いた二次元培養法に着目した。ハイドロゲルは生体に近い性質を持ち、細胞の特性を維持したまま培養できることが示されており、先行研究では、DNゲル上で培養することで、脳神経膠芽腫細胞をがん幹細胞に再プログラムすることが可能であることが明らかにされていた。また、DNゲルで培養された軟骨細胞も、分化を解除して再生能力の強い軟骨幹細胞に変化することが報告されていた。したがって、ハイドロゲル上で卵巣癌細胞を培養することにより、生体に近い環境下で未分化な形質（OCSC）を誘導する可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

予後不良の進行・再発卵巣癌患者の治療成績向上のためには、「抗がん薬耐性の克服」が不可欠である。癌幹細胞は抗がん薬耐性を示す傾向があるため、卵巣癌における癌幹細胞を同定し、分子生物学的手法を用いて解析することで、新たな治療戦略が構築できる可能性がある。

したがって、本研究では、ハイドロゲルを用いた卵巣がん細胞培養法により、(1)簡便で再現性の高いOCSCモデルが構築可能であることを示すこと、(2)OCSCモデルを用いて遺伝子異常や細胞内情報伝達系の解析を行うことで、新たな治療法の開発に繋がる治験を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ハイドロゲルを使用した卵巣癌培養細胞株の OCSC モデルとしての妥当性の検証

① 誘導された細胞株の CSC マーカーの発現

ハイドロゲル上で培養された細胞および polystyrene (PS) 培養皿上で培養された対照培養細胞からそれぞれ mRNA を抽出し、幹細胞マーカー分子 (Nanog, Sox2, Oct3/4 など) の発現変化をリアルタイム PCR により定量する。

② 誘導された細胞株の代謝特徴について分析する。

複数の研究によれば、OCSC は酸化的リン酸化の活性が高く、グルコースへの依存度が低く、その理由はグルタミンや脂肪酸を効率的に利用できる。そのため、Agilent 社の細胞外フラックスアナライザーXFp を用いて、PS 群とハイドロゲル群のがん細胞の代謝特性を比較する。

③ ノードマウスでの造腫瘍性の検討

卵巣癌細胞株を用いて、tdTomato-Luc2 を発現させる細胞株を樹立する。ハイドロゲル培養法を用いて CSC を誘導し、免疫不全マウスの卵巣に移植し、発光・蛍光イメージングシステム IVIS を用いて腫瘍形成能を経時的に評価する。最小細胞数に設定し (500 個)、ハイドロゲル群と PS 群で同じ細胞数を用いて CSC の腫瘍形成能を比較する。

(2) 遺伝子変異解析や発現解析

ハイドロゲルによって誘導された CSC と PS 培養卵巣癌細胞から全 RNA を抽出し、マイクロアレイ解析により、特異的に変化 (過剰発現) した遺伝子を同定し、それらの標的遺伝子が CSC の性状を調節する上で重要な役割を果たしているかどうかを一連の *in vitro* 実験で検証する。誘導された CSC を用いて、新規薬剤のスクリーニングを行い、幹細胞の増殖や腫瘍形成能を抑制する薬剤を特定する。

4. 研究成果

(1) ハイドロゲルによる OCSC の誘導

- ① PS 群の 2 次元平坦な増殖形態に比べ、ハイドロゲル群のがん細胞は球状に変化し、簇状に成長することが観察された。
- ② ハイドロゲルで培養された腫瘍細胞は、CSC マーカーである Sox2、Nanog、Oct3/4 の mRNA 発現が有意に上昇を示した。
- ③ 抗がん剤耐性遺伝子である MDR1 やがん浸潤・転移関連遺伝子である twist の発現は有意に上昇した。また、CSC 化した細胞をハイドロゲルから剥離し、PS 上で継続的に培養した結果、MDR1 と Twist の高発現は 48h まで持続し、72h 以後は PS と同じレベルに下がった。従って、ハイドロゲルで培養された癌細胞は、ゲルから剥離後 72h 以内は幹細胞としての性質を維持することが明らかとなった。
- ④ 細胞の形態変化と CSC マーカーの発現から、CSC がハイドロゲルから剥離されると、その幹性を失い非 CSC に再分化することが示された。これは、ハイドロゲルが CSC を誘導するた

めの特異的な環境を提供することを示唆していると考えられる。

(2) ハイドロゲルで培養された腫瘍細胞の代謝解析

ハイドロゲルで培養された腫瘍細胞はPS培養細胞と比べて、最大呼吸速度および酸化の予備能が有意に高いことを確認した。解糖とミトコンドリアリン酸化のシフト能力により、異なる微小環境に適応する柔軟性が高まり、化学療法耐性に繋がることが示唆された。

(3) 誘導された OCSC の腫瘍形成能の検証

in vivo 実験では、PS培養で育成された細胞を対照群として、ハイドロゲルによって誘導された OCSC を実験群とし、それぞれ 500 個の癌細胞をマウスの卵巣に移植した。IVIS 発光イメージングによる観察から、Day49 で実験群では腫瘍形成が確認されたのに対し、対照群では腫瘍形成を認めなかった。

(4) 網羅的遺伝子解析

マイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、4種類の卵巣がん細胞株を用いた多群間比較から、特異的に高発現する遺伝子 A および B を特定した。ウエスタン・ブロッティング解析の結果、遺伝子 B のタンパク質発現はハイドロゲル群で高発現していることを確認した。遺伝子 B については阻害剤が存在しているが、これまでの研究では卵巣がんや卵巣幹細胞の治療との関連は報告されていない。

以上の研究を踏まえ、ハイドロゲル誘導によって得られた OCSC は、高い腫瘍形成能力を持つがん幹細胞特性を示し、この細胞培養モデルの妥当性が検証された。網羅的遺伝子解析の結果、遺伝子 B が卵巣がん治療の新たなターゲットとなる可能性が示され、今後の臨床応用の可能性が示された。

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