

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月23日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650597

研究課題名（和文） 高純度がん幹細胞培養法の構築とがん幹細胞特異的マーカーの同定

研究課題名（英文） Development of cancer stem cell (CSC) culturing system and identification of CSC-specific marker

研究代表者

尾崎 充彦 (OSAKI MITSUHIKO)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：40325006

研究成果の概要（和文）：幹細胞性を維持したままがん幹細胞を培養する方法を検討するため、極めて高い薬剤耐性能を有する細胞を選択し、3Dクリノスタット（重力分散型人工無重力装置）を用いた微小重力環境下で培養をおこなった。微小重力環境下で培養をおこなうことにより、通常重力下と比較して細胞増殖促進効果が示された。この微小重力環境下で培養した $1 \times 10^2 \sim 10^3$ 細胞をヌードマウスの皮下に接種したが、造腫瘍性は観察されず、高純度がん幹細胞培養法としての至適条件を見い出すには至らなかった。

研究成果の概要（英文）：We cultured cancer cells with high drug-resistant ability, using a three-dimensional (3D) clinostat, a device which produces an environment with an average of $10^{-3}G$ over the time, as a culture method possibly capable of maintaining stemness of cancer stem cells. By culturing in the microgravity environment, cell growth was promoted compared to that in the normal gravity environment. We inoculated $1 \times 10^2 \sim 10^3$ cells cultured in the environment subcutaneously in nude mice, and found no tumorigenicity maintained, indicating that the culture under the microgravity environment was not sufficient to maintain highly purified cancer stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：幹細胞

1. 研究開始当初の背景

本研究は、「がん幹細胞」の幹細胞性を維持したまま「がん幹細胞」集団を増殖させる系の構築を目的とする。腫瘍組織内における「がん幹細胞」の存在は、抗がん剤および放射線治療耐性、再発および転移へ

の関与が示唆されており、「がん幹細胞」を標的とした治療法の開発が強く望まれている。これまでに報告されている「がん幹細胞」の回収および分離法の多くは、体性幹細胞を分離する方法をがん細胞へ応用しており、(1)細胞表面マーカーを指標とした方

法、(2)増殖因子含有無血清培地での培養による浮遊細胞塊(スフェア)形成による方法、(3)薬剤排出ポンプ活性を指標とした方法(Side Population 細胞)を単独あるいは組み合わせでおこなわれてきた。しかしながらこれらの方法で回収された細胞集団は、通常の培養環境下でその多くが幹細胞性を喪失してしまう。現在、幹細胞性を維持したがん幹細胞集団を普遍的に培養する方法はなく、「がん幹細胞」の生物学的性状を詳細に研究することを困難にしている。加えて、「がん幹細胞」に特異的かつ普遍的なマーカーは、未だ見い出されていない。

この問題を解決するために「微小重力環境下での培養法」を利用し、「がん幹細胞」集団を幹細胞性を維持したまま培養する方法の構築に挑む。連携研究者らは、これまでに重力分散型模擬微小重力発生装置(3D クリノスタット)を用いた微小重力環境下で培養することにより、ES 細胞や体性幹細胞の未分化性を維持したまま増殖させることを報告してきた。

2. 研究の目的

本研究は、高純度の「がん幹細胞」集団を単離し、幹細胞性を維持したまま増殖させる系の構築を目的とし、「微小重力環境下での培養法」により純度の高い「がん幹細胞集団」を回収する系を構築し、「がん幹細胞」に特異的かつ普遍的なマーカーの同定に挑む。

3. 研究の方法

3Dクリノスタット(重力分散型人工無重力装置)を用い、微小重力環境下での培養をおこなうことにより高純度のがん幹細胞集団の単離および幹細胞性を維持したままの長期培養の可能性を検討し、さらに、単離したがん幹細胞から特異的かつ普遍的マーカー

を同定し臨床材料における存在を確認するために、以下の3項目をおこなった。

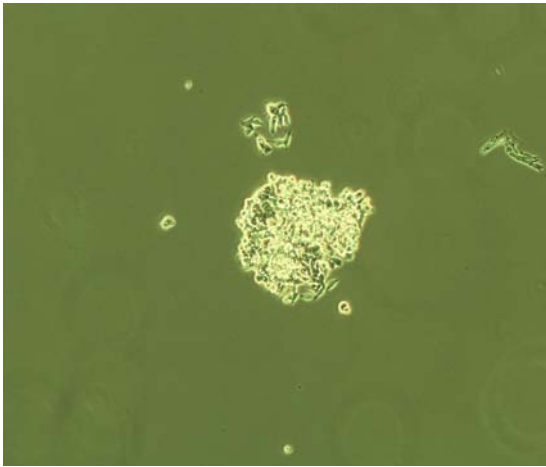
- 1) 抗がん剤によるがん幹細胞の分離
- 2) 3D クリノスタットによるがん幹細胞の培養
- 3) 免疫不全マウスへの移植による造腫瘍効果の検索

4. 研究成果

がん幹細胞は、ABC トランスポーターの高発現により細胞内に取り込まれた抗がん剤を積極的に排出することで、薬剤耐性を有している。この性質を利用し、ヒトがん細胞株2株(Panc-1, LoVo)を6種の抗がん剤(CDDP, Gemzar, Taxol, ドキソルビシンおよびアリムタ)添加により、非がん幹細胞を死滅させる一方でがん幹細胞が生き残る条件を検討した。具体的には、ヒト大腸がん細胞株(LoVo)およびヒト膵癌細胞株(Panc1)に抗がん剤をそれぞれ添加して1週間培養後、顕微鏡下で生細胞がごく僅かに確認でき、その後2週間抗がん剤無添加培地中において、残存した細胞からコロニー形成する条件を絞った。その結果、LoVo およびPanc1 いずれの細胞株も CDDP 30 μ M、Gemzar 100nM 添加培地による培養により、ほぼすべての細胞が死滅した後、僅かに残存した細胞から少なくとも10個程度以上の細胞により構成されるコロニーが観察され、それらの条件が薬剤添加濃度として至適と判断した。

このコロニーを3D クリノスタット(重力分散型人工無重力装置)にて微小重力環境下での培養を2週間おこない、通常の培養環境をコントロールとして、細胞増殖能を検討した。細胞数をカウントした結果、LoVoはCDDP 30 μ Mで処理後、Panc1はGemzar 100nMで処理後クリノスタットで培養したときに、コントロールと比較し細胞増殖能が高くなることを見出した。微小重力環境下での

培養後、細胞は点在性に円形のコロニーを形成して増殖しており、単一細胞由来のクローンの可能性が示唆された(下図)。



細胞数をカウントした結果、LoVo および Panc1 共に、通常重力下(コントロール)での培養条件と比較し細胞増殖能が高くなることを見出した。現在、微小重力環境下での培養により発現が変化するマイクロ RNA について検索中である。

これら微小重力環境下にて培養した細胞を回収し、免疫不全動物へ $1 \times 10^2 \sim 10^3$ 細胞を接種し約 6 ヶ月間造腫瘍性の有無を検討したが、いずれの細胞株においても造腫瘍性は観察されなかった。他方、微小重力環境下あるいは通常重力下で培養した細胞 1×10^6 個を接種した場合、培養条件に関わらず造腫瘍性を示し、過去の報告同様に本研究で用いた細胞株は一定数以上の細胞数の接種により造腫瘍性を示すことが確認された。

以上の結果より、*in vitro* の系において微小重力環境下での培養条件では通常重力下と比較しやや高い細胞増殖能を示すものの、造腫瘍性を検索した *in vivo* 解析結果より必ずしもがん幹細胞集団を特異的に増殖させているといった当初の仮説を支持するデータを得ることはできなかった。がん幹細胞集団の単離条件を見いだせなかった

ため、当初の目的の一つである、がん幹細胞特異的マーカーの同定に至らなかった。微小重力環境下では、通常重力環境下と比較し抗がん剤耐性能を有するがん細胞の増殖能が亢進した現象について、引き続き検討を進める予定である。

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 2 件)

1) Osaki M, Takeshita F, Sugimoto Y, Kosaka N, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Kobayashi E, Yamada T, Kawai A, Inoue T, Ito H, Oshimura M, Ochiya T: MicroRNA-143 regulates human osteosarcoma metastasis by regulating matrix metalloprotease-13 expression. Mol Ther 19 1123-1130, 2011
DOI: 10.1038/mt.2011.53

2) 尾崎充彦 マイクロRNAによるがん転移予防への展開 臨床・創薬が見えてきた microRNA 23 151-156, 2012

[学会発表](計 1 件)

1) 尾崎充彦、杉本結衣、知念日菓利、竹下文隆、落谷孝広、井藤久雄、押村光雄: ヒト骨肉腫肺転移抑制効果を示す miR-143 の標的遺伝子の同定 第 70 回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場(名古屋)2011年10月5日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

尾崎 充彦(OSAKI MITSUHIKO)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号:40325006

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

弓削 類(YUGE RUI)
広島大学・保健学研究科・教授
研究者番号:20263676

河原 裕美(KAWAHARA YUMI)
広島大学・保健学研究科・研究員
研究者番号:20457279

(4)研究協力者

井藤 久雄(ITO HISAO)
鳥取大学・理事
研究者番号:60127610