

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791822

研究課題名(和文)体細胞核移植技術を用いた癌幹細胞モデルの作成と新しい分化誘導療法の検討

研究課題名(英文)Creation of cancer stem cell model by nuclear transfection and a novel differentiation-induction therapy

研究代表者

多賀谷 光(TAGAYA, Hikaru)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：50418711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、体細胞のリプログラミング技術を用いて培養癌細胞から癌幹細胞モデルを作出し、癌幹細胞を標的とした治療法の可能性について検討することを目的とした。癌細胞を用いた体細胞核移植法による胚の発生率は低率だが、エピジェネティック修飾薬を併用するなど培養条件を改良することでマウス teratocarcinoma 細胞から癌細胞由来ES細胞を得ることに成功した。この細胞はオリジナルの細胞と比較して幹細胞的な性質を有していることも確認できた。

今後、このような癌細胞由来ES細胞を複数樹立し癌幹細胞としての特性解析を進めることで癌幹細胞を標的とした治療法の開発につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to establish cancer stem cell models from cultured cancer cell lines using reprogramming technique of somatic nucleus, and eventually, to examine the possibility of new therapy targeting the cancer stem cells. Although the development rate of embryo by somatic nuclear transfer using cancer cells was low, we succeeded to generate the ES cells from mouse teratocarcinoma cell lines by improvement of culture conditions, such as adding epigenetic modulators. By a characteristic analysis, it was demonstrated that the ES cells from mouse teratocarcinoma possessed stem cell-like properties in comparison with original cells.

The new knowledge obtained through further experiment, establishment of ES cells from cancer cell and analysis of its characteristic, will lead to the development of new therapy targeting the cancer stem cells.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：癌肝細胞 体細胞核移植 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、癌の異常な細胞増殖、抗悪性腫瘍剤および放射線耐性、転移・再発の原因として癌幹細胞 (cancer stem cell) 説が注目されている。癌幹細胞は、造血幹細胞や神経幹細胞などと同様に、自己複製能と多分化能、無限増殖能を有しており、娘癌細胞を生み出して腫瘍塊を形成し、原発巣から遊離し血流やリンパ流に乗って他の臓器に到達すれば転移巣を形成する。娘癌細胞よりも分裂速度の遅い癌幹細胞は、抗悪性腫瘍剤や放射線治療の効果が得られ難いだけでなく、特有の細胞膜トランスポーターの活性化などにより薬剤耐性を示し様々な抗悪性腫瘍剤によっても生き残り、腫瘍塊を再形成することができる。一般的な抗癌剤によって、腫瘍塊の大部分を占める、癌幹細胞としての性質を持たない娘癌細胞を除くことができたとしても、癌幹細胞が少しでも残存すれば再発しうることが、癌治療が困難である原因と言われており、癌幹細胞に効果のある治療法の開発が、癌を根絶するためには必須であると考えられるようになっている。

そこで、研究代表者の所属する研究室では体細胞核移植によるクローン胚作製技術を確立しており、この技術を利用して培養癌細胞に多能性を付与し、癌幹細胞モデルを樹立し癌幹細胞を標的とした治療法について検証することを着想した。

2. 研究の目的

本研究は、培養癌細胞の核を除核未受精卵へ移植 (nuclear transfer; nt) して得られた胚性幹 (ES) 細胞細胞 (ntES 細胞) について、細胞分裂形態や遺伝子発現などの解析を行い、癌幹細胞性質の有無を検討し、癌幹細胞モデルの樹立を試みる。さらに、得られた癌幹細胞モデルを用いて、正常幹細胞との相違点や特有の自己複製メカニズムなど、より詳細な癌幹細胞としての特性の解析を行い、癌幹細胞の実態を解明することを目的とする。

また、癌幹細胞と正常幹細胞の相違を探索し癌幹細胞特異的な治療法の開発の可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 当研究室において、すでに手技を確立さ

せている体細胞核移植法を用いて癌細胞のリプログラミングを行った。排卵誘発処理したマウスから未受精卵を採取し、マイクロマニピュレーターを用いて紡錘体を除去して除核未受精卵を作製する。これに、ドナー細胞となるマウス癌細胞 (卵巣癌、大腸癌、肝細胞癌、精巣 teratocarcinoma など数種使用) 核を移植し、再構築胚を作製する。得られた再構築胚を培養し発生させ、形成された胚盤胞の内細胞塊から、ES 細胞 (ntES 細胞) を作製することを試みた。

(2) エピゾーマルベクターを用いて初期化因子を導入し培養癌細胞に多能性を付与する iPS 細胞化により癌細胞のリプログラミングを試みた。OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC 発現用エピゾーマルベクターを用いて、エレクトロポレーションを行い、癌細胞(卵巣癌、子宮内膜癌)混濁液に電気刺激を加え、細胞膜に形成した微小孔からプラスミドを導入した。遺伝子導入された細胞をフィーダー細胞上に再播種し、iPS 細胞の作製を試みた。

エレクトロポレーション後の細胞生存率および遺伝子導入効率が不良であったため、この改善のために、ベクターの調製、エレクトロポレーションの出力条件の調製 (一般的に細胞種毎に微妙な調製が必要であることが知られている) などを行った。

(3) リプログラミングした癌細胞について、細胞の形態、増殖能などをオリジナルの細胞と比較検討した。

4. 研究成果

(1) 体細胞核移植法は、体細胞および卵細胞を1つ1つ処理する必要があるため時間的な浪費が大きく、また、癌細胞核を移植した場合の胚発生率は、正常体細胞核を移植した場合と比較して非常に低率であり、研究開始当初は現実的に研究に用いるレベルではなかった。

しかし、下記の iPS 細胞化の研究結果を受け、体細胞核移植法の改良を行い、移植手技の修練を重ね、また、エピジェネティック修飾薬を添加した培養環境の調製を行った結果、teratocarcinoma 由来の 8 系列の nt ES 細胞の樹立に成功した。

(2) 体細胞核移植法と並行して、同様に分化した細胞をリプログラミングさせる手法である iPS 細胞化により、効率良く癌細胞を

初期化することを計画した。京都大学 iPS 細胞研究所の protocol に従い、初期化因子を組み込むエピゾーマルベクターを購入し、ヒト培養癌細胞から iPS 細胞の作製を試みた。その上で、細胞生存率および遺伝子導入効率の改善のために、

エンドトキシンレベルの低い高純度のベクターの調製

細胞種毎のエレクトロポレーション出力条件の調製

を重ねた。しかし、遺伝子導入した細胞をフィーダー細胞上に再播種しても、iPS 細胞コロニーを得ることが困難であった。

(3) 体細胞核移植法により得られた、マウス teratocarcinoma 細胞由来の nt ES 細胞について、特性の解析を行った結果、この細胞は、

非常に多型性に富んでいたオリジナルの細胞形態 (図 1 上段) と比較して、nt ES 細胞はほぼ均一な紡錘形の細胞形態 (図 1 下段) を示した。

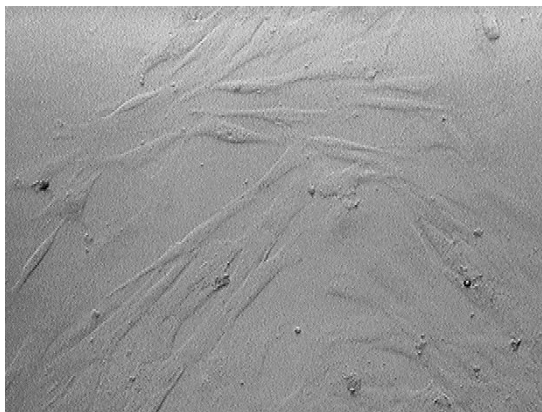
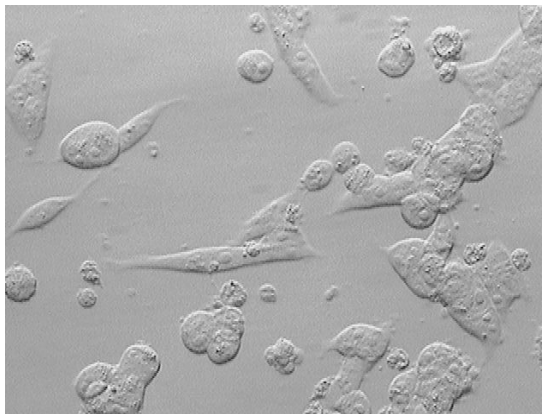


図 1

細胞増殖能は、1/6 程度に低下した (図 2)。癌幹細胞が抗悪性腫瘍剤や放射線照射に対して耐性を示す原因の一つとして細胞

分裂速度が遅いことに由来するとされており、この結果は、nt ES 細胞化により幹細胞的特性を獲得したものの判断できる。

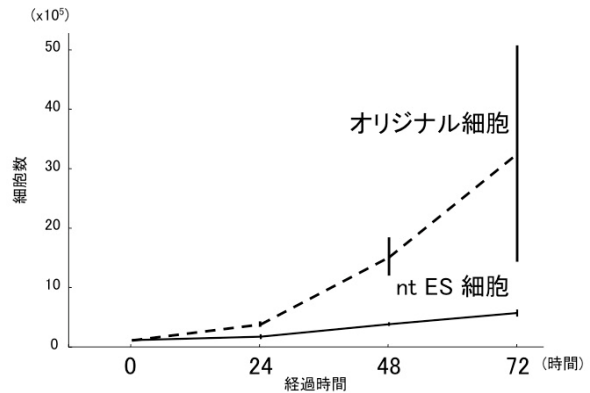


図 2

しかし、teratocarcinoma がもともと有する染色体数の著しい不均一性は、卵細胞のもつリプログラミング能力においてもリセットすることは不可能であり、得られた nt ES 細胞の染色体数も様々な値を示した (図 3)。染色体数の不均一性は、癌細胞性質が保持されていることの証拠であり、正常な組織幹細胞との大きな相違点である。

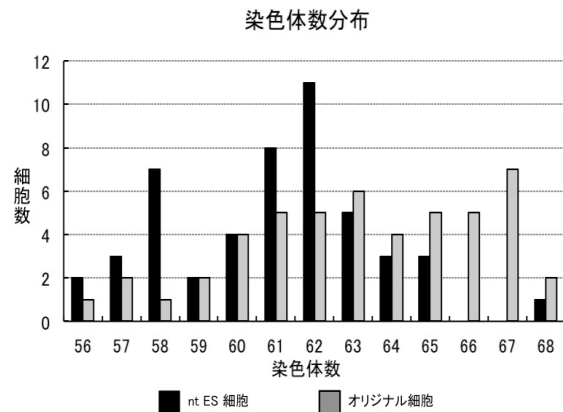


図 3

の成果は、癌幹細胞を標的とした治療において最も重要なポイントである正常組織幹細胞と区別して作用すべきであるということの、緒になり得るものである。

今後、さらなる研究により、このような癌細胞由来 ES 細胞を複数樹立し、得られた細胞について細胞の解析と調製を加えることは、癌肝細胞を標的とした治療法の開発につながるものと考えられた。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多賀谷 光 (TAGAYA, Hikaru)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：50418711