

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：37401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26889060

研究課題名(和文)人工細胞膜を用いた形質転換幹細胞の選択的排除と再生医療への応用

研究課題名(英文) Selective elimination of tumorigenic stem cells using hybrid nanoparticles and its application to regenerative medicine

研究代表者

古水 雄志 (KOMIZU, Yuji)

崇城大学・生物生命学部・助教

研究者番号：80735829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、人工細胞膜(HL)を用い、形質転換幹細胞の除去効果について検討したところ、以下のような興味深い知見が得られた。(1)肝芽細胞への分化誘導について、胎児肝細胞に1mM 酪酸ナトリウム(SB)を加え8日間培養したところ、約40%の肝芽細胞誘導率が得られた。(2)肝芽細胞への誘導の間に、形質転換細胞の有無を評価するため、コロニー形成数を測定したところ、未分化の胎児肝細胞と比べ、分化誘導後の肝芽細胞のコロニー数が有意に増加した。そこで、分化誘導の際に、HLを加え培養したところ、コロニー数の有意な減少効果が得られた。これらの結果は、HLが形質転換肝幹細胞を除去する効果があることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the application of hybrid liposomes (HL) to selective elimination of the tumorigenic stem cells during hepatoblasts induction process. (1)The ratio of hepatoblastic cell number to total cell number was investigated by flow cytometric analysis. About 40 % of the cells were induced to be hepatoblasts by the treatment of 1 mM SB for 8 days of culture. (2) During induction process, the tumorigenic cells appeared and produced abnormal prothrombin (PIVKA-^{II}), which is a clinical marker for hepatoma, and also formed colonies in soft agar plate, which is a criteria for neoplastic cell transformation. On the other hand, by the treatment with 0.4 mM HL for 48 h during the induction process, the colonies formed in soft agar plate remarkably decreased less than those of the non-treated cells. These results suggest that the tumorigenic hepatic stem cells could be eliminated by the treatment with HL.

研究分野：化学工学

キーワード：形質転換細胞 人工細胞膜 肝芽細胞 肝幹細胞 再生医療 がん化 ナノ医療 リポソーム

1. 研究開始当初の背景

近年、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) や胚性幹細胞 (ES 細胞) などの万能細胞 (体性幹細胞) の研究によって注目を集めている再生医療では、幹細胞を生体外で増殖させた後に、体内への細胞移植によって治療を行うことが考えられている。しかし、この際、もし未分化な細胞や、形質転換 (がん化) を引き起こした細胞が混入した場合、細胞移植した後に、生体内で異常増殖して腫瘍を形成するリスクがある。これを未然に防ぐためには、正常幹細胞と形質転換幹細胞を識別して、形質転換幹細胞を選択的に排除する方法の開発が必要である。

松下らは、これまでに、未分化の細胞集団である Hc 細胞から、肝芽細胞を効率よく誘導する条件の検討を行ってきた (*Biol. Pharm. Bull.*, 30, 2308 (2007))。その結果、酪酸ナトリウム (SB) 処理することで、肝芽細胞が誘導されることを発見した。しかしその際、SB 濃度依存的に、肝腫瘍マーカーである異常プロトロンピン (PIVKA-) の分泌量の増大が認められ、形質転換の可能性が示唆された。この肝幹細胞の形質転換 (がん化) を防ぐ方法の開発が急務であった。

一方、上岡名誉教授らは世界に先駆け 1985 年にベシクル分子とミセル分子から成る人工細胞膜 (ハイブリッドリポソーム: HL) を創製し (*J. Am. Chem. Soc.*, 107, 2185 (1985))、抗がん剤を含まない HL 自身ががん細胞膜に特異的に蓄積した後、アポトーシス誘導型の細胞死を示すことを発見した (*Int. J. Cancer*, 115, 377 (2005))。さらに、動物実験レベルでは顕著な延命効果を報告し、臨床応用ではリンパ腫瘍の患者への高い安全性、延命効果及び腫瘍縮小効果を得ており、すでに国内で十数例の臨床試験が実施されている (*Curr. Pharm. Des.*, 17, 1709 (2011))。

2. 研究の目的

先行研究として、Hc 細胞の SB 処理によっ

て、肝芽細胞を誘導する際に出現する形質転換細胞は、がん遺伝子である c-fos mRNA を発現し、さらに、腫瘍原性の指標である軟寒天中のコロニー形成する性質を有していることが示された (*Oshikata et al.*, 薬学雑誌, 131,757(2011))。興味深いことに、この肝芽細胞の誘導時に、0.33mM の HL を 96 時間処理することで、コロニー形成数が有意に低下することを報告しており、HL による形質転換細胞の除去の可能性が示唆された。そこで、本研究では、HL の処理条件の最適化や形質転換肝幹細胞の除去の機構を検討する。

3. 研究の方法

(1) HL の調製および膜物性の評価

リン脂質として、ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) 及びミセル分子として、ポリオキシエチレンアルキルエーテル ($C_{12}(EO)_n$) からなる HL-n (DMPC/10 mol% $C_{12}(EO)_{23}$) を用いた *in vitro* での形質転換幹細胞の除去効果を報告している (*薬学雑誌*, 131,757(2011))。本年度は、上記の HL-n ($n = 23$) に加え、さらに、申請者が HL のがん治療の基礎研究で良好な結果を明らかとしている、新規の HL-n ($n = 21, 25$) を用い (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16, 6131 (2006); *Leu. Res.*, 34, 906 (2010); *Int. J. Pharm.*, 406, 173 (2011); *Eur. J. Med. Chem.*, 57, 143 (2012))、超音波照射により調製する。動的光散乱法及び電子顕微鏡観察により膜サイズや安定性を明確にする。蛍光偏光解消法により、HL の膜流動性を明らかとする。

(2) *in vitro* での肝芽細胞誘導および HL-n による形質転換肝幹細胞除去とその機構の解明

HL の細胞増殖抑制試験

ヒト胎児由来肝 (Hc) 細胞に対する HL-n ($n=23$) の細胞増殖への影響をトリパンブルー染色剤を用いた色素排除法および酵素活性

測定法(WST-8 アッセイ法)により検討する。

肝芽細胞誘導率の解析(フローサイトメトリー)

研究協力者の松下らは、既に、酪酸ナトリウム(SB)1mMをヒト胎児由来肝(Hc)細胞に8日間処理することで肝幹細胞の一種である肝芽細胞を誘導することを発見している(*Biol. Pharm. Bull.*, 30, 2308 (2007))。この文献に従い、Hc細胞に含まれる肝芽細胞の割合を抗アルブミンおよびサイトケラチン-19の抗体を用いた蛍光免疫二重染色による両陽性細胞を指標としたフローサイトメトリーを行う。また、SB処理する過程で、HL-n(n=21, 23, 25)を加えた場合の肝芽細胞誘導率の測定も行う。

形質転換細胞の評価(軟寒天コロニー形成法など)

形質転換の評価法として、がん化細胞の特徴の一つである足場非依存的な増殖能を指標とした軟寒天コロニー形成法を既存論文に従い実施する(薬学雑誌, 131,757(2011))。その他の形質転換細胞の評価法として、肝腫瘍マーカーとして知られる(PIVKA-)の産生量をELISA法にて測定する。さらに、がん遺伝子の*c-fos* mRNAを*in situ* hybridization法により可視化する。

4. 研究成果

HL処理が残存細胞数に与える影響

HL処理が残存細胞数に与える影響について検討したところ、1mM SB処理することで細胞増殖に抑制がかかり細胞数がControlの1/2程になった。また、HL処理をすることでControlと1mM SB処理ともに残存細胞数が有意に減少することが示された。

これらの結果より、残存細胞数は1mM SB処理を8日間行うことでControlの約1/2に減少し、さらにHL処理によってControlおよび1mM SB処理ともに残存細胞数の有意な減少が確認された。

FCM解析による肝芽細胞の同定

肝芽細胞の同定にEpCAMをマーカーとして用いたところ、Control(SB未処理)で陽性を示す割合が1%未満であったのに対し、10日間SB処理することで約40%まで上昇した。これらの結果より、1mM SB処理によってHc細胞が肝幹細胞の一種である肝芽細胞に誘導されることが、EpCAMをマーカーとするFCM解析により示された。

SB処理による細胞膜流動性の測定結果

蛍光偏光解消法による細胞膜流動性を測定したところ、P値は低下し、SB処理により肝芽細胞へ誘導を行うことでControlよりも細胞膜の流動性が有意に上がることが確認された。このことは、正常細胞よりがん細胞の方が細胞膜流動性が高いという知見から、誘導により形質転換が助長されている可能性が示唆された。

SB処理により肝芽細胞への誘導が進む一方で、細胞膜流動性が増大しControlと比較するとがん細胞に近い細胞膜流動性を示すことから、誘導の過程で形質転換が起きていることが示唆された。

クリスタルバイオレット染色によるコロニー形成数

クリスタルバイオレット染色によるコロニー形成写真を取得し軟寒天中に形成したコロニー形成数を図1に示した。35mm dish内すべてのコロニーを計数したところ、Controlと1mM SB処理を比べるとコロニー数が明らかに増大しており形質転換が助長されていることが示された。また、両条件にHL処理をすることでコロニー数が有意に減少し、HL 0.4mM 48時間処理ではコロニーが見られないことから形質転換肝幹細胞が排除されたことが示された。

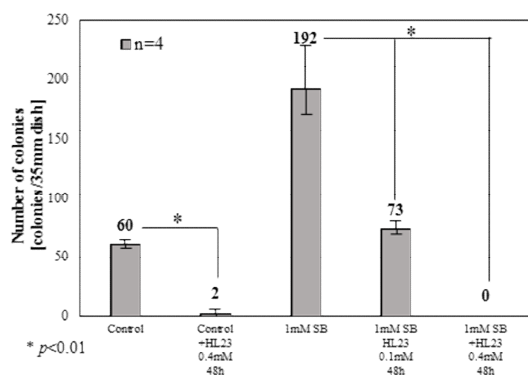


図1 HL 処理によるコロニー形成数の変化 (クリスタルバイオレット染色)

Calcein 染色によるコロニー計数(imageJ による解析)

Calcein 染色によるコロニーの蛍光写真を imageJ により解析を行い、コロニー計数結果を得た。また、コロニー計数の結果、1mM SB 処理することで Control と比べるとコロニー数が増大した。これは、誘導を行う過程で形質転換肝幹細胞が多く出現することを示している。一方、1mM SB 処理したものに HL 処理をすることにより、コロニー数が有意に減少することから、HL が形質転換肝幹細胞を排除することが示唆された。

軟寒天コロニー形成法で腫瘍原性評価を行ったところ、クリスタルバイオレット染色後の計数結果と Calcein 染色後の計数結果ともに SB 処理によりコロニー数が増大し形質転換の助長を示したが、HL 処理によりこれを排除できることが示された。

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)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

T. Ishii, H. Saito H, Y. Komizu, R. Tomoshige, T. Matsushita, Effects of macroporous hydroxyapatite carriers on the growth and function of human hepatoblasts derived from fetal hepatocytes, *J. Biosci. Bioeng.*, (査読有) *in press* (2016). (doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.01.012.)

M. Suzuki, Y. Komizu, Y. Matsumoto, R. Ueoka, T. Takahashi et al., Targeting ceramide synthase 6-dependent metastasis-prone phenotype in lung cancer

cells, *J. Clin. Invest.*, (査読有) **126**, 254-265 (2016).

(doi: 10.1172/JCI79775)

T. Ishii, Y. Komizu, N. Shibuya, K. Kuasaka, T. Matsushita, Effects of the use of polyacrylonitrile nanofibers as 3D scaffolds on the growth and function of human hepatoblasts derived from fetal hepatocytes, *AATEX*, (査読有) **20**, 66-72 (2015).

(doi:10.11232/aatex.20.66)

H. Ichihara, Y. Komizu, R. Ueoka, Y. Matsumoto, Inhibitory effects of hybrid liposomes on the growth of non-small cell lung carcinoma cells and anti-invasive activity by ceramide generation without any drugs, *J. Carcinog. Mutagen.*, (査読有) **6**, 1000230-1-5 (2015)

(doi: 10.4172/2157-2518.1000230)

K. Matsuda, S. Hattori, R. Kariya, Y. Komizu, E. Kudo, H. Goto, M. Taura, R. Ueoka, S. Kimura, S. Okada, Inhibition of HIV-1 entry by the tricyclic coumarin GUT-70 through the modification of membrane fluidity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (査読有) **457**, 288-294 (2015).

(doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.102.)

Y. Komizu, T. Ueoka, M. Yukihara, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, Hybrid nanoparticles inhibit growth of human prostate cancer cells by induction of apoptosis, *SOJ Pharm. Pharm. Sci.*, (査読有) **1**, 1-4 (2014).

(<http://www.symbiosisonlinepublishing.com/pharmacy-pharmaceuticalsciences/pharmacy-pharmaceuticalsciences17.php>)

古水 雄志, 上岡 利子, 後藤 浩一, 上岡 龍一, 麦焼酎粕パウダーのヒトナチュラルキラー株化細胞に対する *in vitro*での免疫賦活効果, 化学工学論文集, (査読有) **40**, 438-442 (2014).

(doi:10.1252/kakoronbunshu.40.438)

K. Matsuda, S. Hattori, Y. Komizu, R. Kariya, R. Ueoka, S. Okada, Cepharranthine inhibited HIV-1 cell-cell transmission and cell-free infection via modification of cell membrane fluidity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (査読有) **24**, 2115-2117 (2014).

(DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.03.041)

Y. Komizu, M. Yukihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, Cell cycle arrest by hybrid liposomes for human lung carcinoma cells, *J. Carcinog. Mutagen.*, **5**, 1000157-1-6 (2014).

(doi: 10.4172/2157-2518.1000157)

〔学会発表〕(計 14 件)

稲村 恒亮, 水民 敬浩, 古水 雄志, 松本 陽子, 上岡 龍一, 松下 琢「ハイブリッドリポソームを用いた腫瘍原性肝幹細胞の選択的排除に関する研究」2016

年3月19日, 第15回日本再生医療学会総会、大阪国際会議場(大阪府大阪市)
古水 雄志、大田 裕也、水民 敬治、
松本 陽子、松下 琢「ハイブリッドリ
ポソームの肝臓がん細胞に対する薬剤
耐性克服薬としての応用」2016年2月
19日, 国際高等研究所研究プロジェク
ト分子基盤に基づく生体機能への揺ら
ぎとダイナミックネットワークの解明
(招待講演) 国際高等研究所(京都府
木津川市)

市川 雄大、松下 琢、石井 貴晃、古
水 雄志、金 秀良、石田 誠一、宮島
敦子、関野 祐子「胎児肝細胞及び成人
肝細胞のメタボローム解析と化学物質
毒性発現の比較解析(第二報)」2015年
12月11日, 日本動物実験代替法学会第28
回大会、ワークピア横浜(神奈川県横浜
市)

大田 裕也、水民 敬浩、古水 雄志、岩
佐 卓哉、佐々木 皓平、渡邊 理恵、川
部 雅章、松下 琢「三次元培養担体
Cellbed®を用いた肝がん細胞の薬剤耐
性現象の再現と薬剤耐性克服薬スクリ
ーニングへの応用」2015年12月11日,
日本動物実験代替法学会第28回大会、
ワークピア横浜(神奈川県横浜市)

石井 貴晃、古水 雄志、岩佐 卓哉、佐々
木 皓平、渡邊 理恵、川部 雅章、松下 琢
「三次元細胞培養担体 Cellbed®を用い
たヒト凍結肝細胞の維持培養」2015年
12月11日, 日本動物実験代替法学会第
28回大会、ワークピア横浜(神奈川県横
浜市)

M. Suzuki, T. Murate, M. Kyogashima, Y.
Komizu, Y. Matsumoto, R. Ueoka, J.
Inokuchi, T. Takahashi, 「Targeting
CERS6-dependent sphingolipid
homeostasis in lung cancer cells」2015
年10月10日, The 74th Annual Meeting of
the Japanese Cancer Association、名古屋国
際会議場(愛知県名古屋市)

石井 貴晃、松下 琢、古水 雄志、柳
麻美子、生田 健次郎、日下 孝司、「肝
臓機能の維持を目指した中空系膜型三
次元培養モジュールを用いたヒト肝臓
細胞の長期培養」2015年3月20日, 第
14回日本再生医療学会総会、パシフィコ
横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

R. Ueoka, Y. Matsumoto, H. Ichihara, Y.
Komizu, Springer, Molecular Science of
Fluctuations Toward Biological Functions,
Membrane-Targeted Nanotherapy with
Hybrid Liposomes for Cancer Cells Leading
to Apoptosis, Chap.11, 270 (221-244)
(2016).
(doi:10.1007/978-4-431-55840-8)

〔その他〕

ホームページ等

研究業績

(<http://rsrch.ofc.sojo-u.ac.jp/sjuhp/KgApp?kyoinId=yndbyyosgys>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古水 雄志 (KOMIZU Yuji)

崇城大学・生物生命学部・助教

研究者番号: 80735829