

博士論文

# がん幹細胞が作り出す微小環境による がんの階層性の維持

平成 26 年 2 月

松田 修一

岡山大学大学院

自然科学研究科

## 目次

|     |                                               |    |
|-----|-----------------------------------------------|----|
| 第1章 | 序論                                            | 3  |
| 第1節 | がん幹細胞仮説                                       | 3  |
| 第2節 | がん幹細胞モデル miPS-CSC の樹立                         | 4  |
| 第3節 | miPS-LLCcm 細胞株の特性                             | 7  |
| 第4節 | ニッチによる幹細胞の機能維持                                | 8  |
| 第5節 | 本研究の目的                                        | 9  |
| 第6節 | 本論文の構成                                        | 9  |
| 第2章 | miPS-LLCcm 細胞株の血管内皮細胞への分化能解析                  | 10 |
| 第1節 | 緒言                                            | 10 |
| 第2節 | 実験手法                                          | 10 |
| 第3節 | miPS-LLCcm 細胞の血管内皮への分化能解析                     | 12 |
| 第4節 | miPS-LLCcm 細胞から分化により生じた血管内皮様細胞による<br>血管様構造の形成 | 13 |
| 第5節 | 本章のまとめ                                        | 16 |
| 第3章 | がん細胞分泌因子によるがん幹細胞の自己複製能制御                      | 17 |
| 第1節 | 緒言                                            | 17 |
| 第2節 | 実験手法                                          | 17 |
| 第3節 | がん細胞分泌因子によるがん幹細胞の自己複製能増強                      | 20 |
| 第4節 | がん細胞分泌因子による Notch シグナルの活性化                    | 21 |
| 第5節 | Notch シグナル活性化に関与する因子の探索                       | 24 |
| 第6節 | 本章のまとめ                                        | 27 |
| 第4章 | がん細胞分泌因子によるがん幹細胞の分化能および分化系統の維持                | 28 |
| 第1節 | 緒言                                            | 28 |
| 第2節 | 分泌因子ががん幹細胞の分化系統に与える影響                         | 28 |
| 第3節 | 分泌因子によるがん幹細胞の分化能の増強                           | 31 |
| 第4節 | 本章のまとめ                                        | 33 |
| 第5章 | 結論                                            | 34 |
| 第1節 | 考察                                            | 34 |
| 第2節 | 結論                                            | 37 |
|     | 参考文献                                          | 38 |
|     | 謝辞                                            | 48 |

# 第1章 序論

## 第1節 がん幹細胞仮説

がんは全世界の死亡原因の多くを占める疾患であり、日本では成人死亡原因の第1位である。その治療法開発のために広く研究が進められているが、手術や化学療法、放射線療法を駆使しても完全に腫瘍細胞を取り除くのは困難である。多くの場合、治療に抵抗性を示す細胞集団の出現や、再発・転移が見られるため、根治することが極めて難しいのが現状である。

この治療抵抗性・再発・転移の原因として近年注目されているのが「がん幹細胞仮説」である。既存の概念におけるがん組織は、「遺伝子に変異を来たした異常増殖をする単一の細胞の集団」であるとされていた。しかし、この捉え方では、治療抵抗性・再発・転移というがん組織の重要な特性を解釈することが困難である。がん幹細胞仮説とは、「がん組織は単一の細胞の集団ではなく、正常組織と同様に階層性があり、その頂点として幹細胞（がん幹細胞）が存在する」とする仮説である。がん幹細胞は、自らと全く同じ細胞を複製する自己複製能と、多種類の腫瘍細胞に分化する多分化能という、正常組織幹細胞に共通してみられる2つの特徴を持つ細胞集団とされており、正常組織幹細胞が損傷の修復を行うのと同様に少数存在するだけで元の腫瘍組織と同様の腫瘍を形成する能力を持つと考えられている。さらに、がん幹細胞は抗がん剤や放射線への抵抗性を有しているため治療の際に残存しやすいとされている。この考え方に基づけば、がん組織の持つ特徴を説明する事が可能である。また、がん幹細胞こそが治療抵抗性・再発・転移の大本の原因となっていると考える事が出来る[1-3]。がん幹細胞仮説は、1970年代には既に提唱されていたが、当時の技術ではがん幹細胞の存在を証明する事は困難であった。しかし、近年、細胞表面マーカーによる単離手法と動物移植手法が進展、確立された事により、白血病がん幹細胞集団が特定された事から研究が進み[4]、現在は多くの種類のがんにおいてがん幹細胞集団が定義されている[5-23]。最近の研究では、がんの発生、転移、再発への寄与が示唆される結果が報告されており、がん根治に向けた治療標的として注目を集めている。

しかし、がん幹細胞を治療標的として詳細な解析を行う上で、多くの課題を残しているのが現状である。がん組織中に存在するがん幹細胞集団の割合は数%前後であるとされており、解析を行うのに十分な細胞数の確保が困難である。また、未分化性を維持したまま長期間培養する技術の確立が難しく、長期

的な解析を安定して行う事が出来ない。有効な治療標的を探索するためには、これらの問題点を解消する事が重要であると考えられる。

## 第2節 がん幹細胞モデル miPS-CSC の樹立

当研究室は、長期的な培養が可能なモデル細胞を樹立する事がこれらの問題に対する有効な解決手段となると考えた。

モデル細胞の樹立は、幹細胞を取り巻くニッチと呼ばれる特殊な微小環境に着目して行われた。幹細胞はそれぞれ周囲の細胞により構成される固有のニッチを有しており、これらの細胞から様々なシグナルを受け取る事により幹細胞の維持や分化の方向性の決定がなされていると考えられている。当研究室のLing Chen 博士は、正常幹細胞であるマウス人工多能性幹細胞(mouse induced pluripotent stem cell, miPSC)を「がん細胞により構成されたニッチ」中に置く事で、がん幹細胞やがん細胞が誘導されるのではないかと予想した(図 1-1)[24]。

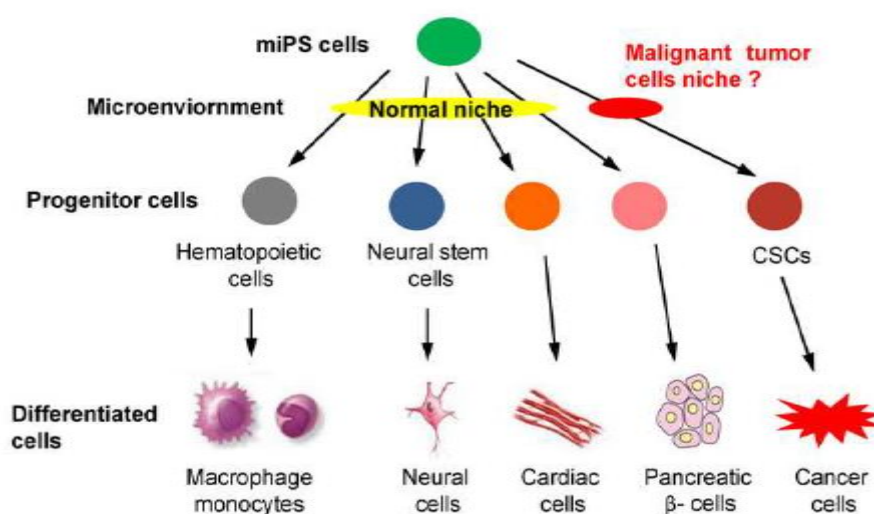


Figure. 1-1 The hypothesis of miPS differentiation when exposure to normal or malignant niche. miPS cells should be induced to some kinds of progenitor cells, such as hematopoietic cells and neural stem cells, differentiating into various phenotypes, such as macrophage, monocytes, neural cells, cardiac cells and pancreatic  $\beta$ - cells, when exposed to the normal niche. We hypothesized that CSCs may also be derived from miPS cells only when exposure to a malignant niche (Chen L et al. Plos ONE (2012) [24]).

誘導に用いられた miPSC は、未分化マーカー遺伝子 *Nanog* の 5' 非翻訳領域に緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子及び puromycin 耐性遺伝子が挿入されている。このため、*Nanog* を発現する未分化性を維持している幹細胞集団は同時にこれらの遺伝子を発現する設計となっている(図 1-2) [25]。

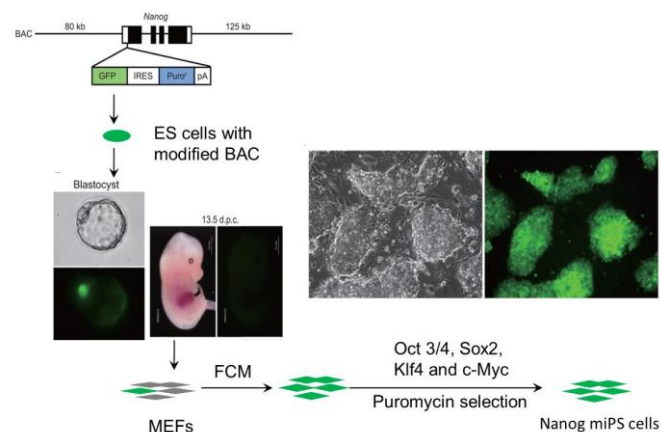


Figure. 1-2 Brief overview of miPSCs used in the thesis. Green fluorescent protein (GFP) and puromycin resistant genes have been inserted into the 5' untranslated region of the *Nanog* gene (Okita K et al. *Nature* (2007)[25]).

Chen 博士は、この miPSC を、様々ながん細胞株の培養上清(conditioned media, CM)を培地中に加える事でがん細胞ニッチを *in vitro* で形成した特殊な培養条件下に置き、長期間培養する事によりがん幹細胞モデル細胞の樹立を試みた(図 1-3)。その結果、CM を加えずに培養した miPSC では、マウスへの移植を行うと良性腫瘍である *teratoma* のみが形成されるのに対し、CM 存在下で培養した miPSC(miPS-CSC)では全て悪性腫瘍を形成するがん幹細胞様の性質を示した(表 1, 図 1-4)[24]。当研究室はこのがん幹細胞様の性質を持つ細胞株を miPS-CSC と名付けた。

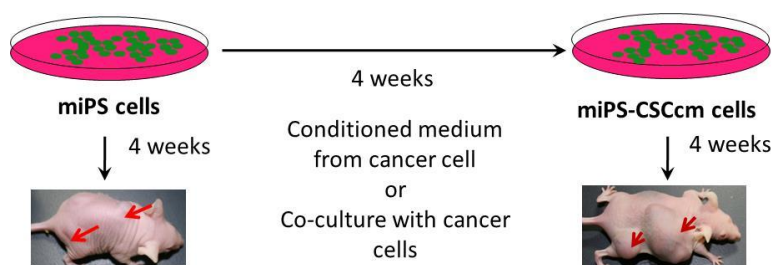


Figure. 1-3 A schematic drawing of experiments for induction of miPS-CSCs. miPS cells were cultured without feeder cells in a mixture of miPS medium and conditioned medium of the mouse cancer cell lines for 4 weeks (Chen L et al. *Plos ONE* (2012) [24]).

| Cell line     | Tumor formation | Histologic examination        |
|---------------|-----------------|-------------------------------|
| miPS-feeder+  | 3/3             | Teratoma                      |
| miPS-feeder-  | 3/3             | Teratoma                      |
| miPS-LLCcm    | 8/8             | Malignant tumor, angiogenesis |
| miPS-P19cm    | 5/5             | Malignant tumor               |
| miPS-B16cm    | 2/3             | Malignant tumor               |
| miPS-MC.E12cm | 3/3             | Malignant tumor               |

LLC: mouse lung cancer cell line.  
P19: mouse embryonic carcinoma cell line.  
B16: mouse melanoma cell line.  
MC.E12: mouse breast cancer cell line.  
cm: miPS were cultured in mouse cancer cell line conditioned medium.  
co: miPS were cocultured with mitomycin C treated-mouse cancer cell line.

Table. 1 Summary of tumorigenicity of miPS-CSCs. All of the miPS-CSCs could generate malignant tumor but not teratoma (Chen L et al. Plos ONE (2012) [24]).

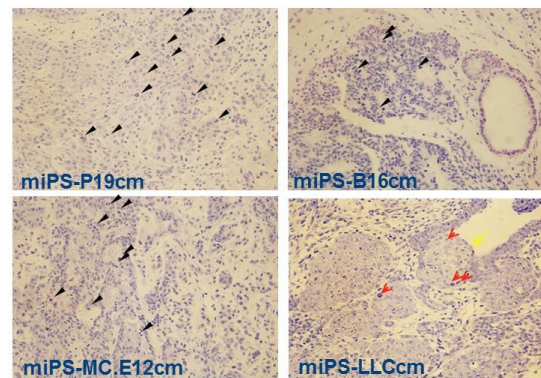


Figure. 1-4 miPS-CSCs treated with conditioned medium from various cancer cells were injected in nude mice via s.c. route. 4 weeks after injection, generated tumors were stained (HE: Chen L et al. Plos ONE (2012) [24]).

miPS-CSC は培養ディッシュ中でその未分化性を維持した状態で長期培養が可能であった。さらに、miPS-CSC は周囲の微小環境により誘導された細胞株であるため、遺伝子導入を行った場合と比較して、より自然発生的に生じたがん幹細胞に近い挙動を示すことが期待される[26]。また、用いた CM の種類により、異なる形態・性質を示す miPS-CSC が誘導されるため、がん幹細胞の株化を行った例と比較すると[27]、より簡便に様々な種類のがん幹細胞株を作製する事が出来るというがん幹細胞モデル細胞として有益な特徴を有している。

### 第3節 miPS-LLCcm 細胞株の特性

本研究では、miPS-CSC の一つである miPS-LLCcm 細胞株をがん幹細胞モデル細胞として用い、解析を行っている。miPS-LLCcm は、Lewis Lung Carcinoma, LLC)細胞の CM を用いて誘導された miPS-CSC であり、マウスに移植した際に「腫瘍成長速度が非常に速い」「強力な腫瘍血管新生を引き起こす」という最も悪性度の高い形態を示す細胞株である(図 1-5)[24]。さらに、*in vitro* で培養を行うと、常に一定の割合で GFP を発現しない分化した細胞集団を生じる。このことから、培養ディッシュ中にごん幹細胞集団を維持する環境が形成されていると考えられる(図 1-6)。

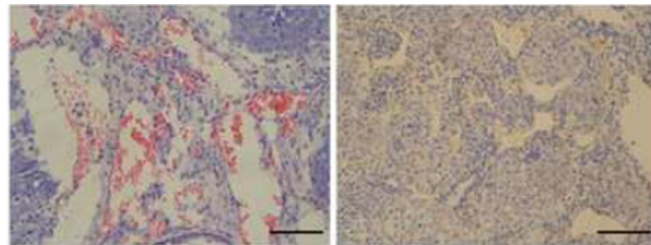


Figure. 1-5 HE staining (left) and IHC staining (CD31, right) of the tumor tissue derived from miPS-LLCcm cells. HE staining showed hypervascularization indicative of angiogenesis (left). The positive of CD31 (Rat monoclonal antibody, brown) by IHC staining showed multiple vascular vessels in the tumor (right). Scale bar 100  $\mu$ m (Chen L et al. Plos ONE (2012) [24]).

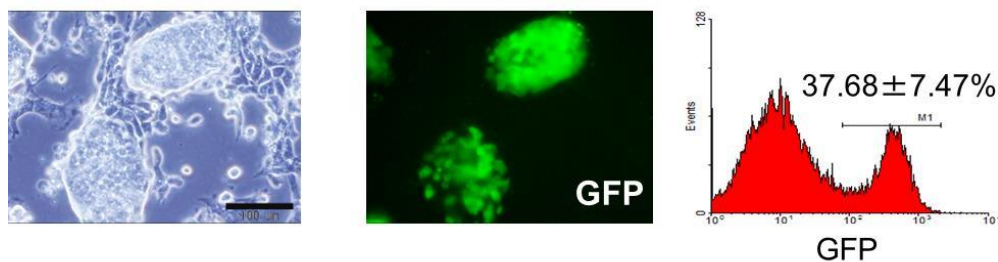


Figure. 1-6 miPS-LLCcm cells were cultured under the adherent condition, (left, middle) the miPS-LLCcm culture consist of GFP-positive cells with stem-like morphology and GFP-negative differentiated cells (scale bar 100  $\mu$ m). (right) The populations of GFP-positive cells were measured by flow cytometry.

## 第4節 ニッチによる幹細胞の機能維持

第2節で述べたように、幹細胞は、ニッチを構成している周囲の細胞集団から様々なシグナルを受け取ることにより、その機能を維持している(図 1-7)。がん幹細胞も同様に、独自のニッチ(がん幹細胞ニッチ)によりその機能維持が行われていると考えられている[28-30]。これまでの報告により、グリオブラストーマ(膠芽腫; glioblastoma, GBM)の幹細胞集団は近傍の血管内皮細胞よりシグナルを受け取り、Notch シグナル経路の活性化を介して自己複製能の維持を行っている事が示されている[31, 32]。従って、血管内皮細胞はがん幹細胞ニッチの重要な構成要素の一つであると考えられる。さらに、近年の研究により、GBM 幹細胞集団自らが血管内皮様細胞に分化する機能を有しており、腫瘍血管新生に寄与している事が示された(図 1-8)[33-35]。このことから、著者はがん幹細胞集団より分化して生じた血管内皮様細胞を含む子孫細胞集団が、がん幹細胞ニッチの構成要素としてがん幹細胞の機能維持に寄与しているのではないかと予想した。

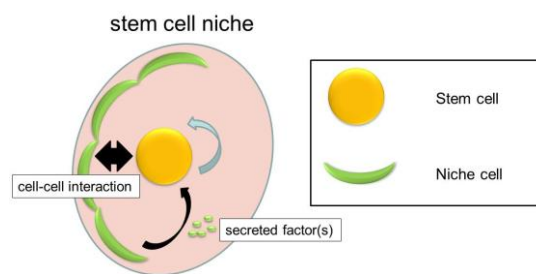


Figure. 1-7 Brief overview of the stem cell niche. The stem cell niche is a microenvironment where stem cells reside. It is composed of neighboring supportive niche cells. Stem cells receive signals for their self-renewal and differentiation from niche cells by cell-cell interaction and soluble factors secreted from niche cells.

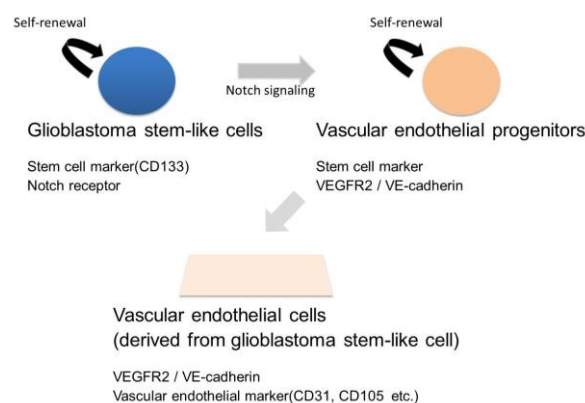


Figure. 1-8 Brief overview of vascular endothelial differentiation of Glioblastoma stem-like cells (Rong Wang et al. nature(2010)[33-35]).

## 第5節 本研究の目的

現在、がん幹細胞を治療標的とした研究は、がん幹細胞を特異的に標的とすることを可能にする細胞表面マーカーの探索や、がん幹細胞の機能を阻害するために有効なシグナル伝達経路及び分子標的の探索など、がん幹細胞を直接のターゲットとしたものが主流である。しかし、幹細胞性を持たないがん細胞が脱分化を引き起こしがん幹細胞となる現象が報告されている事などから[36]、がん幹細胞を取り巻く微小環境をより詳細に理解出来なければ根治療法の開発は困難である事が示唆されている。ところが、がん幹細胞の発生・維持機構については未だ不明な点が多く、特にがん幹細胞より分化して生じた子孫細胞とがん幹細胞ニッチの関係性についてはほとんど解析が行われていないのが現状である。

そこで本研究では、がん幹細胞株 **miPS-LLCcm** を解析対象とし、がん幹細胞より分化で生じた子孫細胞のがん幹細胞ニッチの構成要素としての重要性を解析・評価することを目的とした。

## 第6節 本論文の構成

本論文は、全5章により構成されており、第1章では本研究の背景及び目的について記述している。

第2章では、がん幹細胞株 **miPS-LLCcm** について、近年、がん幹細胞の機能の一つとして報告された血管内皮への分化能について詳細な解析を行っている。

第3章では、**miPS-LLCcm** の幹細胞集団より分化して生み出されたがん細胞の分泌する因子のがん幹細胞ニッチへの寄与を、がん幹細胞の機能の一つである自己複製能へ与える影響を解析する事で評価している。

第4章では、がん細胞分泌因子のがん幹細胞ニッチへの寄与を、がん幹細胞の分化能及び分化の方向性に与える影響を、第2章で確認した血管内皮への分化能を指標とし、解析する事で評価している。

最後に第5章では、各章において得られた結果を考察、要約し、本論文の結論としている。

## 第2章 miPS-LLCcm 細胞株の血管内皮細胞への 分化能解析

### 第1節 諸言

腫瘍組織は、正常組織と異なり、常に無秩序な細胞増殖を繰り返している。このため、腫瘍組織内部は酸素や養分が枯渇した状態であり、新たな酸素や養分を供給する経路を確保する腫瘍血管新生は、腫瘍拡大において重要な現象の一つである。腫瘍細胞が新生血管の出芽に重要な血管内皮増殖因子(VEGF)や、新生血管周辺の細胞外マトリックスを分解するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の分泌を行っている事は広く知られており[37-42]、既存の概念においては腫瘍血管新生とはこれらの分泌因子によってのみ引き起こされるものであると考えられてきた。しかし、近年の報告により、GBM のがん幹細胞様集団が、血管内皮様細胞に分化し、腫瘍側から新生血管を出芽する機能を有する事が明らかとなった[33-35]。腫瘍血管新生は、様々な腫瘍組織において全般的にみられる現象である事から、血管内皮細胞への分化能もがん幹細胞に全般的に備わっている機能である可能性が示唆される。また、血管内皮細胞にはがん幹細胞集団の自己複製能を増強する機能があり、がん幹細胞ニッチの重要な構成要素の一つであるとする報告もある事から[31, 32]、この機能はがん細胞とがん幹細胞ニッチの関係性を解析する上で重要なターゲットの一つであると予想される。

miPS-CSC の一つである miPS-LLCcm は、マウスに移植した際に強力な腫瘍血管新生を引き起こす事から、miPS-LLCcm も血管内皮細胞への分化能を有している可能性が考えられる。

そこで本章では、がん幹細胞株 miPS-LLCcm が分化により機能的な血管内皮細胞を産生する能力があるかを *in vitro* において詳細に解析する事を目的とし、研究を行った。

### 第2節 実験手法

#### ・細胞培養

miPS-LLCcm細胞は、DMEM+15%ウシ胎児血清(FBS), 0.1mM 非必須アミノ酸(NEAA), 2mM L-グルタミン, 0.1mM 2-メルカプトエタノール, 50U/mL

penicillin, 50U/mL streptomycin 含有培地を用いて維持培養を行った。がん幹細胞様細胞集団の濃縮を行う際には、終濃度1 $\mu$ g/mLとなるようにpuromycinを加えた培地で7日間培養し、薬剤選択を行った。薬剤選択中の培地交換は24時間周期で行った。

- ・フローサイトメトリー解析

miPS-LLCcm 細胞を 5mM EDTA(pH 8.0)を用いて剥離、回収し、下記的一次抗体、二次抗体で染色を行った。その後、FACS Calibur フローサイトメーターを用いてフローサイトメトリー解析を行った。

- ・一次抗体

phycoerythrin (PE) labeled anti-VEGFR2 rat IgG (1:200; Becton Dickinson)

anti-VE-cadherin (VE-cad) rat IgG (1:100; Becton Dickinson)

- ・二次抗体

PE labeled anti-rat IgG goat IgG (1:200; Abcam)

- ・real-time PCR

miPS-LLCcm 細胞および miPSC より、total RNA を RNeasy Mini Kit(QIAGEN)または TRIzol(invitrogen)を用いて回収し、SuperScript II Reverse Transcriptase kit(QIAGEN) を用いて逆転写を行い、cDNA を作製した。Real-time PCR は Genbank 核酸配列データベースより取得した mRNA 配列データを下に設計した下記のプライマーを用いて行った。PCR 産物の蛍光標識は SYBR Green II にて行い、検出は Lightcycler480 System II (Roche Applied Science) を用いて行った。内部標準遺伝子は GAPDH を使用した。

| プライマー名                | RefSeq ID      | 配列                                   |
|-----------------------|----------------|--------------------------------------|
| <i>VEGFR2</i> Forward | NM_010612.2    | 5'-TAG CTG TCG CTC TGT GGT TCT G-3'  |
| <i>VEGFR2</i> Reverse | NM_010612.2    | 5'-GTC TTT CTG TGT GCT GAG CTT GG-3' |
| <i>VE-cad</i> Forward | NM_009868.4    | 5'-CGC ACC AGG TAT TGA ACG CAT C-3'  |
| <i>VE-cad</i> Reverse | NM_009868.4    | 5'-GGC ATC TTG TGT TTC CAC GAC G-3'  |
| <i>GAPDH</i> Forward  | NM_001289726.1 | 5'-AAC GGC ACA GTC AAG GCC GA-3'     |
| <i>GAPDH</i> Reverse  | NM_001289726.1 | 5'-ACC CGT TTG GCT CCA CCC TT-3'     |

- ・in vitro tube formation assay

96-well プレートに 1well あたり 50 $\mu$ l の Matrigel (Becton Dickinson) を添加し、37°C 30 分インキュベーションを行い、ゲル化させた。その後、miPS-LLCcm

細胞を 0.05%トリプシンにより剥離し、EGM-2 培地(Takara)もしくは EGM-2 培地より VEGF を除いた培地に懸濁し、ゲル化した Matrigel 上に  $5 \times 10^4$  cells/well で播種した。37°C, 5%CO<sub>2</sub> で 24 時間インキュベートし、形成された tube 様構造を倒立顕微鏡デジタルカメラ(IX-80, Olympus)を用いて撮影した。

- ・免疫蛍光染色

イメージング用チャンバー(Nunc)に前項と同様の手法で Matrigel をコートし、その上に miPS-LLCcm 細胞を播種した。24 時間インキュベートした後、4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定化し、ブロッキング溶液(1%ウシ血清アルブミン(BSA)含有リン酸緩衝生理食塩水(PBS))を加え、ブロッキング処理を行った。その後、下記の一次抗体および二次抗体で染色を行い、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)含有 Vectashield 封入剤(Vector)を用いて封入し、倒立顕微鏡デジタルカメラ(IX-80, Olympus)および共焦点レーザースキャン顕微鏡システム(LSM510META, Carl Zeiss)を用いて解析を行った。

- ・一次抗体

rat anti-CD31 primary antibody (Santa Cruz)

- ・二次抗体

Texas Red conjugated goat anti-rat IgG secondary antibody (Life Technologies)

### 第3節 miPS-LLCcm 細胞の血管内皮への分化能解析

血管内皮細胞は、VEGF の受容体であり増殖促進に関与する VEGFR2 や、細胞間接着分子として作用し、血管構造の維持に関与する VE-cadherin (VE-cad) などの膜タンパク質を発現している事が知られている。まず初めに、miPS-LLCcm 細胞においてこれらの血管内皮マーカー遺伝子が発現しているかを real-time PCR により確認した。その結果、幹細胞集団を puromycin により濃縮したサンプルでは、元となった miPSC と同程度の遺伝子発現であったのに対し、分化の進んだ細胞集団を含むサンプルでは miPSC の 20~30 倍の遺伝子発現が見られた(図 2-1)。この結果から、幹細胞集団より分化して生じた細胞集団の中に血管内皮様細胞が含まれている可能性が示唆された。

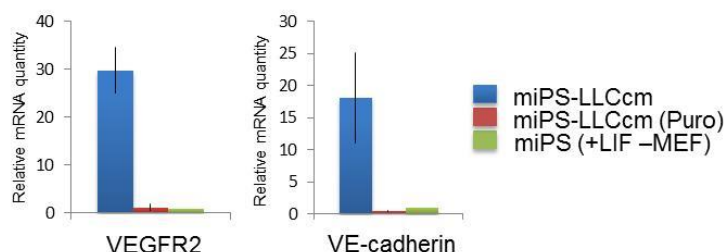


Figure. 2-1 The expression levels of *VEGFR2* and *VE-cadherin* were quantified by real-time RT-PCR. Values were normalized against GAPDH mRNA quantity. The level of each gene in miPS cells was set as one.

さらに詳しい解析を行うため、miPS-LLCcm 細胞を抗 VEGFR2 抗体および抗 VE-cad 抗体で染色し、フローサイトメトリー解析を行った(図 2-2)。この場合においても、これらの血管内皮マーカーを発現する細胞集団を確認する事が出来た。以上の結果から、miPS-LLCcm 細胞は、分化により血管内皮様の細胞集団を生み出している事が示された。

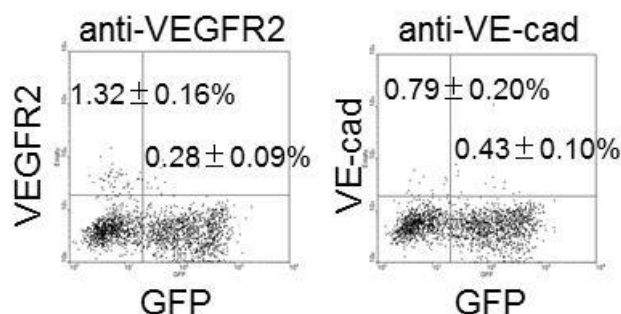


Figure. 2-2 The population of VEGFR2- and VE-cadherin positive cells in miPS-LLCcm cells cultured under the adherent condition without LIF and puromycin were quantified by flow cytometry.

#### 第 4 節 miPS-LLCcm 細胞から分化により生じた血管内皮様細胞による血管様構造の形成

次に、miPS-LLCcm 細胞より分化して生じた血管内皮様細胞が機能的な血管様構造を形成出来るかを解析した。in vitro で血管内皮細胞の機能を評価する手

法として最も一般的なものは、マトリゲルを用いた **in vitro tube formation assay** である。マトリゲルは可用性基底膜成分により構成されており、ゲル化させた後に細胞を播種すると、機能的な血管内皮細胞が含まれていれば、内部に二次元的に管腔様構造が形成される(図 2-3)。

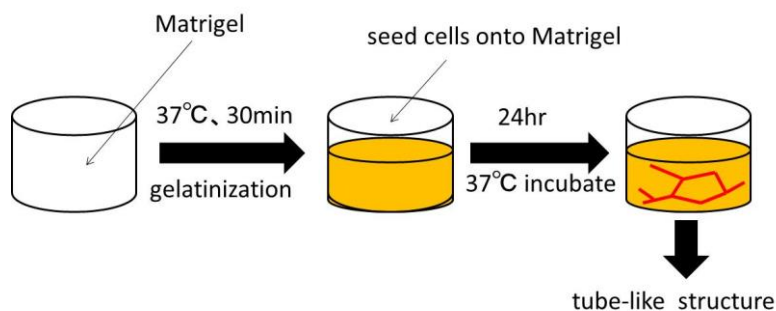


Figure. 2-3 A schematic drawing of in vitro tube formation assay.

これを利用して、miPS-LLCcm 細胞をマトリゲル上に播種し、生じた管腔構造を元に、miPS-LLCcm 細胞より生じた血管内皮様細胞が機能的であるかを解析した(図 2-4)。

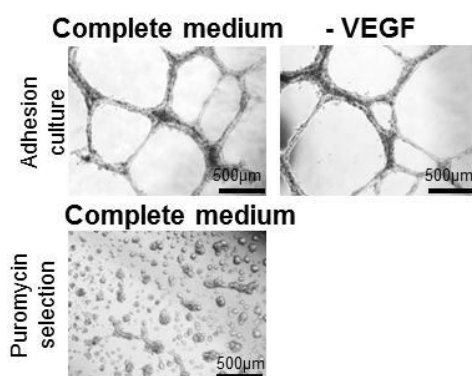


Figure. 2-4 miPS-CSCs were seeded onto BD Matrigel<sup>TM</sup> and evaluated the ability of vascular-like tube formation in the presence or absence of VEGF (upper panel). The stem cell-enriched population selected by puromycin could not form the tubular structure *in vitro* (lower panel) (scale bar 500 µm).

puromycin により幹細胞集団を濃縮した条件下では管腔構造の形成は見られなかったのに対し、濃縮を行わない条件下では強固な管腔様構造の形成が見られた。従って、この管腔様構造は、幹細胞集団より分化して生じた血管内皮様細胞により形成されたものであると考えられる。興味深いことに、この管腔様構

造形成能は、血管新生の誘導に重要な因子である VEGF を加えない条件下においても変化が見られなかった。このことから、miPS-LLCcm は自身で分泌した VEGF により血管新生を引き起こしている可能性が示唆される。

さらに、形成された管腔様構造が血管様構造である事を確認するため、内皮細胞マーカーである CD31 に対する抗体を用い、管腔様構造の免疫蛍光染色を行った。管腔様構造の大部分に CD31 陽性細胞が見られることから、この管腔様構造は血管様構造であることが示された(図 2-5)。

また、本構造は、染色パターンより、「CD31+/GFP+(黄)」「CD31+/GFP-(赤)」「CD31-/GFP+(緑)」という少なくとも 3 種類の異なる細胞集団により構成されている事が分かる。この結果は、miPS-LLCcm 細胞が複数種類の細胞に分化し得る多分化能を有している事を示すものである。

以上の結果より、miPS-LLCcm の幹細胞集団は、機能的な血管内皮様細胞に分化する機能を有する事を示すことが出来た。

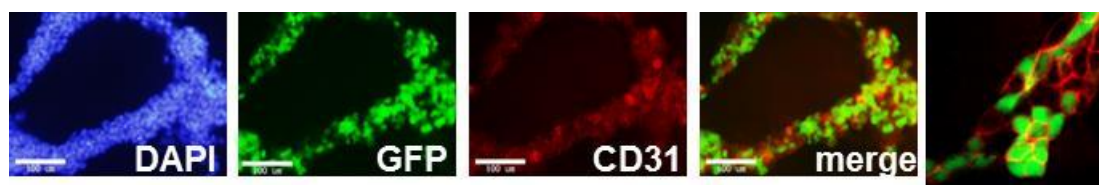


Figure. 2-5 Immunofluorescence staining was performed using anti-CD31 antibody (red) in tubular structure derived from miPS-LLCcm cells. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). A typical image captured by confocal microscopy is presented (right, scale bar 100  $\mu$ m).(共同研究者 Ting Yan 氏による実験)

## 第5節 本章のまとめ

本章では、新たに報告されたがん幹細胞の機能である「血管内皮細胞への分化能」「新生血管形成能」を **miPS-LLCcm** 細胞が有しているかを検証するため、様々な実験手法を用いて詳細な解析を行い、以下の様な結論を得る事が出来た。

1. **miPS-LLCcm** 細胞は、分化により血管内皮様の細胞集団を生み出す機能を有する。
2. 分化により生じた血管内皮様細胞は、血管様の管腔構造を形成する事が出来る機能的な細胞である。
3. **miPS-LLCcm** 細胞は、複数種類の細胞に分化し得る多分化能を有する。

## 第3章 がん細胞分泌因子によるがん幹細胞の自己複製能制御

### 第1節 諸言

第1章で述べたように、がん幹細胞はがん幹細胞ニッチにより、自身の維持や分化の方向性の決定がなされていると考えられている[28-30]。近年の研究により、血管内皮細胞がこのがん幹細胞ニッチの重要な構成要素の一つであることが示されている[31, 32]。血管内皮細胞は、がん幹細胞の自己複製能の維持に関与するシグナル伝達経路の一つである Notch シグナルのリガンドを細胞表面に発現しており、細胞間接触によりがん幹細胞集団の自己複製能を増強する[32]。また、血管内皮細胞より分泌された液性因子が何らかのシグナル経路を介してがん幹細胞の自己複製能を増強する事も判明している[31]。しかし、これらの報告は正常な血管内皮細胞を用いる事で得られた結果であり、がん幹細胞より分化した子孫細胞が、同様にがん幹細胞ニッチの構成要素として機能しているかについては議論されていない。

そこで本章では、miPS-LLCcm 細胞より分化して生じたがん細胞集団が、がん幹細胞ニッチの構成要素としての重要性を、がん幹細胞の自己複製能に与える影響に着目し、評価する事を目的として研究を行った。

### 第2節 実験手法

#### ・CM の回収

miPS-LLCcm 細胞を puromycin 存在下もしくは非存在下で 80%コンフルエントになるまで培養し、培地を Insulin-Transferrin-Selenium-X (ITS-X, Life Technologies, 後述の sphere formation で用いる血清代替サプリメント)を添加した無血清培地に置き換えた。20 時間インキュベートした後に CM を回収し、0.45 $\mu$ m フィルターを用いてフィルトレーションを行った。

CM 中に含まれる microvesicle/exosome 画分の寄与を解析するため、回収した CM を Himac CP70MX 超遠心機(Hitachi)を用いて 100,000  $\times g$ , 4°C, 16 時間遠心を行い、上清を回収する事で microvesicle/exosome 画分の除去を行った。

- sphere formation assay

miPS-LLCcm 細胞を single cell となる様に 0.05%トリプシンで処理し、ITS-X を添加した無血清培地に  $5 \times 10^4$  cells/mL となる様に懸濁し、超低接着プレート(Thermo Fisher)上に播種した。培養 4 日目に形成された sphere の数および平均粒径を測定し、解析を行った。

CM が sphere 形成能に与える影響を解析するため、puromycin 非存在下で培養した miPS-LLCcm 細胞の CM (CM-ad)、puromycin 存在下で培養した miPS-LLCcm の CM (CM-sp)、または CM-ad より microvesicle/exosome 画分を除去したもの(CM-ad -mv/ex)をそれぞれ 1:1 の割合で添加した条件下でも同様の実験を行い、形成された sphere の解析を行った。

さらに、CMによるsphere形成能の増強にNotchシグナルが関与しているかを解析するため、各CMを加えた条件にさらにNotchシグナルの選択的阻害剤であるN-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT,Sigma-Aldrich)を終濃度5,10,もしくは20 $\mu$ Mとなるよう加え、同様に形成されたsphereの解析を行った。

- siRNA transfection

miPS-LLCcm 細胞を 60mm dish に播種し、Flexitube siRNA premix (mouse Notch1)または control siRNA(QIAGEN)を終濃度 40nM となる様に加え、24 時間培養した。その後、細胞が single cell となる様に 0.05%トリプシンで処理し、超低接着プレート(Thermo Fisher)上に CM-ad を 1:1 の割合で添加した条件下で播種した。培養 4 日目に形成された sphere の数および平均粒径を測定し、解析を行った。

- TCA 沈殿による CM 含有タンパク質の濃縮

CM-ad、CM-sp、及び CM-ad -mv/ex をマイクロチューブに回収し、氷冷した TCA を加えた。チューブを 4℃ 15 分処理し、13,000 rpm、4℃、15 分遠心する事でタンパク質を沈殿させた。上清を除去した後、ペレットを 4℃に氷冷した 5%TCA 含有アセトンに再懸濁し、13,000 rpm、4℃、15 分遠心を行い、ペレットを乾燥させた。最終的に得られたペレットを SDS サンプルバッファーに再懸濁し、ウェスタンブロット法に用いた。

- ウェスタンブロット法

Sphere formation assayの各条件にて形成されたsphereのcell lysate及び各CM含有タンパク質をTCA沈殿により濃縮した各サンプルをそれぞれ調製し、10%または7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行った。泳動終

了後、タンパク質をPVDFメンブロン()に転写し、下記の一次抗体及び二次抗体で標識した。その後、メンブロンをECL plus (GE healthcare)で処理し、Light Capture II (ATTO)を用いて化学発光シグナルの検出を行った。

・一次抗体

Rabbit anti-Notch intracellular domain 1 (NICD1) antibody(1:500, Abcam)

Rabbit anti-β actin antibody(1:1000, Cell signaling)

Rabbit anti-DLL1 antibody(1:200, Santa cruz)

Rabbit anti-DLL4 antibody(1:500, Abcam)

Rabbit anti-jagged1 antibody(1:500, Abcam)

Rabbit anti-jagged2 antibody(1:200, Santa cruz)

・二次抗体

Horseradish peroxidase(HRP)-labeled goat anti rabbit IgG antibody  
(1:2000-5000, Cell signaling)

・セルソーターによる GFP<sup>+</sup>/GFP<sup>-</sup>細胞集団の分離

miPS-LLCcm 細胞を 5mM EDTA(pH 8.0)を用いて剥離、回収し、FACS Aria セルソーター(Becton Dickinson)を用いて GFP<sup>+</sup>/GFP<sup>-</sup>細胞集団を分離した。

・real-time PCR

前章と同様の手法でサンプルを調製し、設計した下記のプライマーセットを用いて遺伝子発現解析を行った。

| プライマー名                 | RefSeq ID   | 配列                                      |
|------------------------|-------------|-----------------------------------------|
| <i>DLL1</i> Forward    | NM_007865.3 | 5'-AAC CAT GAA CAA CCT AGC CAA TT-3'    |
| <i>DLL1</i> Reverse    | NM_007865.3 | 5'-CAT GGT CCC CGT GAA AGT C-3'         |
| <i>DLL3</i> Forward    | NM_007866.2 | 5'-GTG AAA CCT CTG GCT CCT TTG AAT G-3' |
| <i>DLL3</i> Reverse    | NM_007866.2 | 5'-AAC CAG GTG GGC AAT GAC AGA C-3'     |
| <i>DLL4</i> Forward    | NM_019454.3 | 5'-GCA CCA ACT CCT TCG TCG TC-3'        |
| <i>DLL4</i> Reverse    | NM_019454.3 | 5'-GTT TCC TGG CGA AGT CTC TG-3'        |
| <i>jagged1</i> Forward | NM_013822.5 | 5'-GAT GCA AAT GAG TGC GAG GCC AAA C-3' |
| <i>jagged1</i> Reverse | NM_013822.5 | 5'-CCA TTA ACC AAA TCC CGA CAG GAG G-3' |
| <i>jagged2</i> Forward | NM_010588.2 | 5'-GAC AAT GAC ACC ACT CCA GAT GAG G-3' |
| <i>jagged2</i> Reverse | NM_010588.2 | 5'-GTT GCA GGT GGC ACT GTA GTA GTT C-3' |

### 第3節 がん細胞分泌因子によるがん幹細胞の自己複製能の増強

前節で述べたように、血管内皮細胞は分泌因子によりがん幹細胞の自己複製能を活性化することが知られている。また、第1章で述べたように、miPS-CSCはがん細胞の分泌因子によりがん幹細胞としての機能を獲得している[24]。これらの事実より、分化により生じた血管内皮様細胞を含むがん細胞集団の分泌因子が、がん幹細胞の自己複製能の維持に何らかの影響を与えていることが予想される。そこで本研究では、がん細胞集団の分泌因子に着目し、これががん幹細胞の自己複製能に与える影響を解析することで、がん細胞のがん幹細胞ニッチの構成要素としての重要性を評価することを計画した。

自己複製能への影響を調べるにあたり、幹細胞性の評価法として一般的に用いられている **sphere formation assay** を用いた。ES 細胞やがん幹細胞などの幹細胞性を有する細胞は、非タンパク性の血清代替サプリメントを添加した無血清培地に **single cell** の状態で懸濁し、低接着プレート上に播種すると、単一の細胞から自己複製により球状のコロニーが形成される。形成されたコロニーの数および平均粒径を解析することで自己複製能の評価を行うことが出来る[43, 44]。そこで、本アッセイ法における培養条件に、分化により生じたがん細胞集団を含む miPS-LLCcm 細胞より回収した CM (puromycin 非存在下で接着培養を行った培養ディッシュより回収、CM-ad)、および miPS-LLCcm のがん幹細胞集団より回収した CM (puromycin 存在下で接着培養を行った培養ディッシュより回収、CM-sp) を加え、形成される sphere の数および粒径への影響を解析することで、液性因子の自己複製能に与える影響を解析することを試みた。

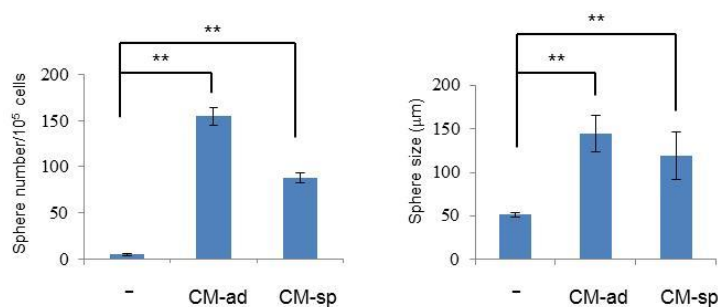


Figure. 3-1 Spheroid formations of miPS-LLCcm cells were induced in the suspension culture with the conditioned medium of miPS-LLCcm cells in adherent culture (CM-ad) or the conditioned medium of puromycin treated-miPS-LLCcm cells (CM-sp). miPS-LLCcm cells were seeded on non-coated dish and grown in serum-free culture medium with/without CM-ad or CM-sp. The number and the size of spheroids were measured at day4. Data are the results of three independent experiments. Bars indicates SD (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01, Student t-test).

CM-ad、CM-sp を加えた条件下では、CM を加えない条件と比較して共に sphere 数、平均粒径の増大が見られた。以上の結果から、がん幹細胞様集団からの分泌因子、分化により生じたがん細胞集団からの分泌因子の双方ともが自己複製能の増強効果を有する事が示された。また、この増強効果は CM-ad でより高く、また、図 2-1 より、puromycin 非存在下で培養した際に分化により生じた細胞集団の占める割合は 6 割前後である事から、主に分化により生じたがん細胞集団からの分泌因子ががん幹細胞の自己複製能に影響を与えている事が示唆される(図 3-1)。

#### 第 4 節 がん細胞分泌因子による Notch シグナルの活性化

次に、この増強効果がどのシグナル伝達経路を介してもたらされているかを解析する事を試みた。がん幹細胞の自己複製能の維持に関与するとされているシグナル伝達経路は主に Notch、Wnt、Hedgehog などが挙げられるが[43-50]、前節で述べたように、血管内皮細胞によるがん幹細胞の自己複製能の増強は Notch シグナルを介している事から、血管内皮様細胞を含むがん細胞集団が引き起こす本現象においても、Notch シグナルの関与が予想される。

そこで、Notch シグナルにおいて重要な働きを持つ  $\gamma$ -secretase を標的とする Notch 特異的阻害剤である DAPT を用いて、CM による自己複製能増強効果と Notch シグナルの関係性を sphere formation assay により解析した(図 3-2, 3-3)。その結果、DAPT は CM-ad による sphere 形成数の増強効果を濃度依存的かつ部分的に抑制し、平均粒径についてもわずかに抑制する効果がある事が確認された。これに対し、CM-sp においては DAPT による sphere 形成阻害効果は見られなかった。

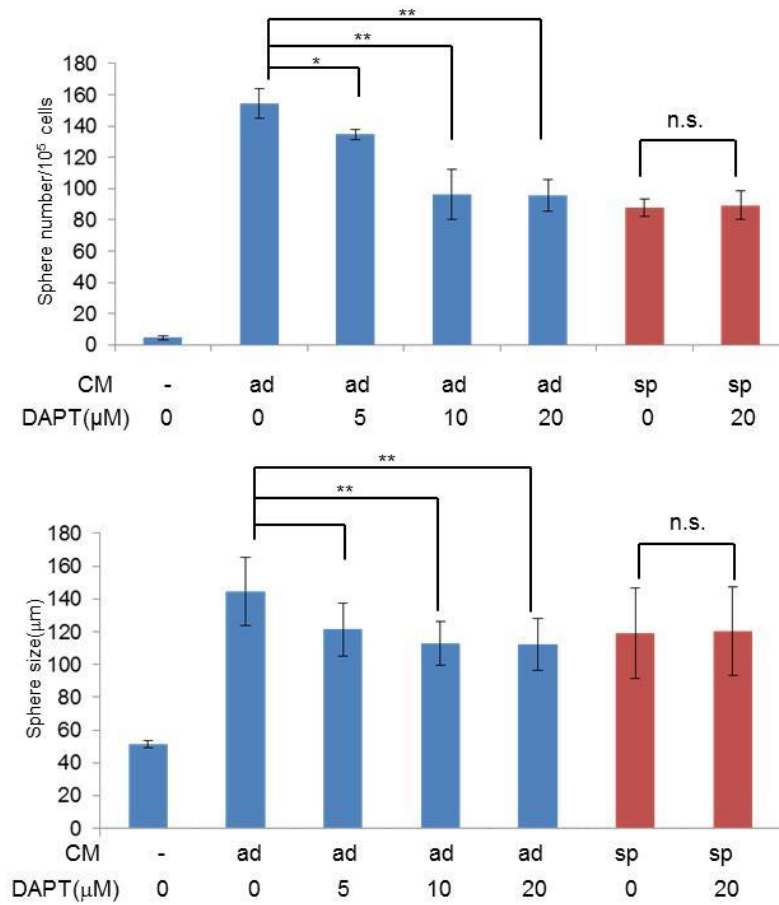


Figure. 3-2 The spheroids formation of miPSLLCcm cells treated with CM-ad (blue) or CM-sp (red) was assessed in the presence of a  $\gamma$ -secretase inhibitor, DAPT, at indicated concentrations. Data are the results of three independent experiments. Bars indicates SD (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01, Student t-test).

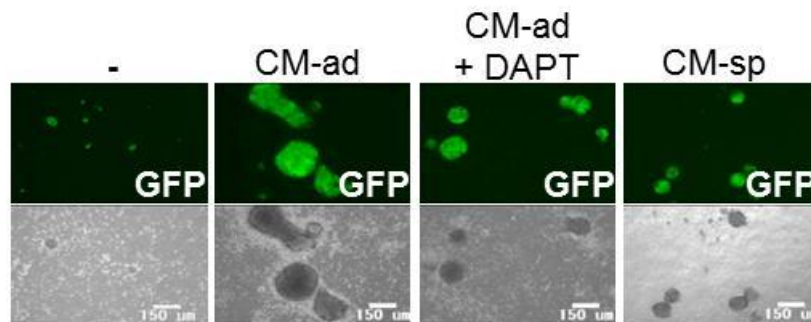


Figure. 3-3 Images of typical spheroids formed under various conditions are shown (scale bar 150 μm).

miPS-LLCcm 幹細胞集団の自己複製能増強効果における Notch シグナルの関与を更に詳しく解析するため、主要な Notch 受容体である Notch1 の siRNA によるノックダウンを行った。Notch1 特異的 siRNA は DAPT と同等の sphere 形成阻害効果を示し、更に Notch シグナル活性化の指標となる Nocth 1 細胞内ドメイン(Notch intracellular domain ,NICD1)の蓄積をウェスタンブロット法により解析した結果においても、DAPT 処理を行った場合と同様に NICD1 蓄積の阻害が確認された(図 3-4、3-5)。

以上の結果から、がん細胞集団由来の分泌因子は部分的に Notch シグナルの活性化を介してがん幹細胞の自己複製能の増強を行っている事が明らかになった。これに対し、幹細胞集団由来の分泌因子による自己複製能の増強は、他のシグナル伝達経路を介して行われている可能性が示唆された。

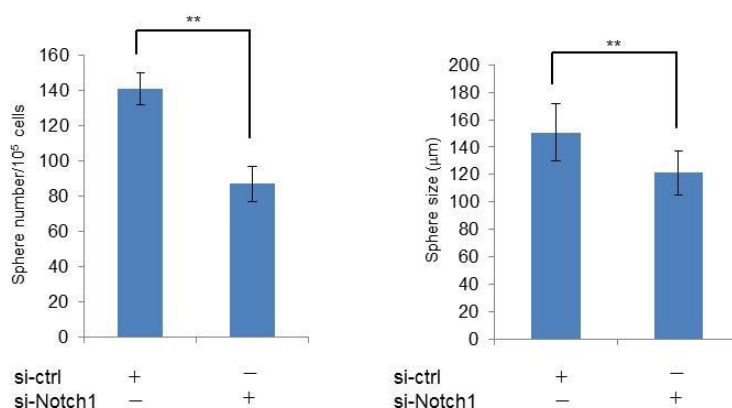


Figure. 3-4 miPS-LLCcm cells were treated with siRNA for Notch1 or control siRNA for 24 hr. Then cells were seeded on non-coated dish and grown in serum-free culture medium with CM-ad. The number and the size of spheroids were measured at day4 (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , Student's t-test). Data are the results of three independent experiments. Bars indicate SD.

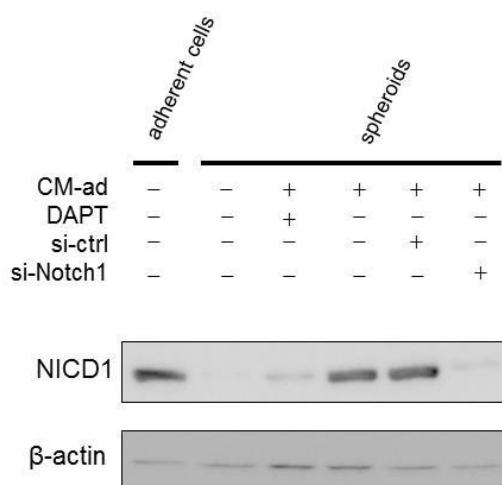


Figure. 3-5 The activation of Notch signaling in the spheroids and adherent cells were evaluated by the detection of Notch intracellular domains, NICD.

## 第5節 Notch シグナル活性化に關与する因子の探索

前節の結果から、がん細胞由来の分泌因子により、がん幹細胞集団の Notch シグナルの活性化が引き起こされている事が明らかとなった。しかし、Notch リガンドは通常膜タンパク質であり、活性化を引き起こすためには細胞間接触が必要となる。従って、がん細胞は、本来膜タンパク質であるはずの Notch リガンドを何らかの形で分泌していると予想される。今回、著者はその可能性として、分泌小胞である **exosome** に着目した。**exosome** は、エンドソーム由来の 40~100nm 前後の分泌小胞であり、分泌する細胞の持つ膜タンパク質を含むタンパク質、脂質、DNA、miRNA を含む RNA などが含まれている(図 3-6)。

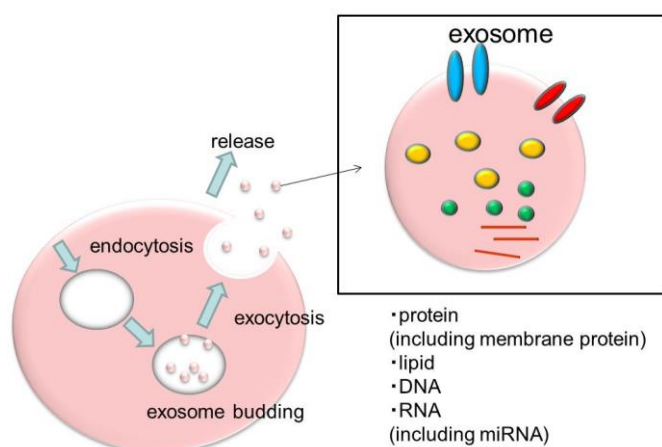


Figure. 3-6 Brief overview of exosomes. Exosomes are 40-100-nm diameter membrane vesicles of endocytic origin that are released by most cell type, presumably as a vehicle for cell-free intercellular communication. Exosomes contain various molecular constituents of their cell of origin, including proteins, lipids, DNAs, and RNAs.

実際に、近年、がん細胞の分泌する **exosome** 上に Notch リガンドが含まれており、供給を受けた細胞の Notch シグナルを活性化し得るといった報告もなされている事から[51]、本現象においても **exosome** が関与している可能性が考えられる。

まず初めに、miPS-LLCcm 細胞における Notch リガンドの発現を確認するため、セルソーターを用いて GFP+な幹細胞様集団と GFP-な分化の進んだ細胞集

団を分離し、real-time PCR による遺伝子発現解析を行った。その結果、分化の進んだ細胞集団において、Notch1 の活性化を引き起こす可能性のあるリガンドである Dll1、Dll4、jagged1、jagged2 の発現を確認する事が出来た(図 3-7)。

続いて、exosome の自己複製能の増強および Notch シグナルの活性化への寄与を調べるため、CM-ad より exosome を含む微小小胞画分を超遠心で除去したものを調製し(CM-ad -mv/ex)、これを用いて sphere formation assay を行った。しかし、予想と反して、微小小胞画分の除去は自己複製能の増強効果にはほとんど影響せず、DAPT による阻害効果も通常の CM-ad と同様のパターンで見られた(図 3-8)。

以上より、exosome を含む微小小胞画分は自己複製能の増強および Notch シグナルの活性化には関与していないことが明らかとなった。このことから、著者は何らかの形で細胞膜から切り離された遊離の Notch リガンドが CM 中に存在するのではないかと予想した。この可能性を検証するため、各 CM 中のタンパク質を TCA 沈殿法を用いて濃縮し、ウェスタンブロット法を用いて Notch リガンドの検出を行った。その結果、CM-ad 及び CM-sp において、完全長の DLL1 及び DLL4(MW : 75 kDa)と比較して分子量が小さい DLL1 及び DLL4(MW : 55kDa)を検出する事が出来た(図 3-9)。しかしながら、これらの遊離の Notch リガンドは Notch シグナルの活性化に寄与しない CM-sp にも共通して存在していることから、がん細胞由来分泌因子による Notch シグナルの活性化はこれらのリガンドに加えて、更なる因子もしくは制御機構が作用していると考えられる。

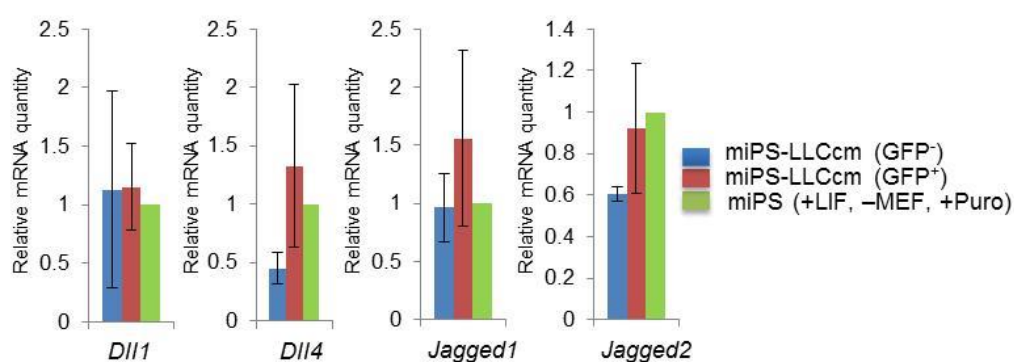


Figure. 3-7 The expression levels of Notch ligands (Dll1, Dll4, Jag1, and Jag2) in GFP<sup>+</sup> and GFP<sup>-</sup> population of miPS-LLCcm cells sorted by cell sorter were quantified by real-time RT-PCR. The level of each gene in miPSC was set as one. Data are the results of three independent experiments. Bars indicate SD.

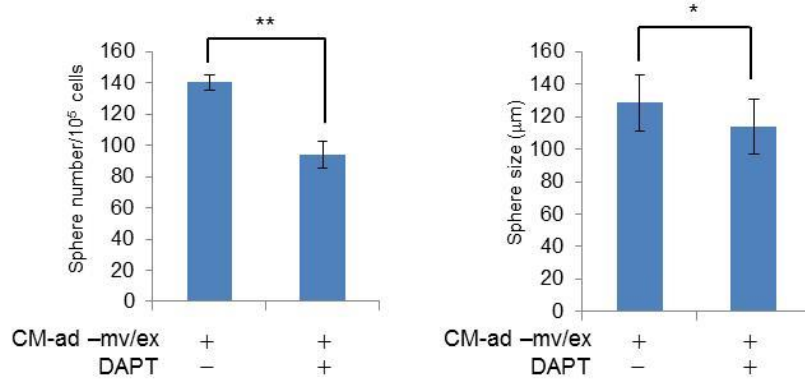


Figure. 3-8 Exosomes/microvesicles did not contribute to the enhancement of spheroids formation. The exosomes/microvesicles were removed from CM-ad by ultracentrifugation, then the resultant CM was subjected to the spheroids formation assay with or without 20μM DAPT (ex/mv: exosomes/microvesicles). Data are the results of three independent experiments. Bars indicate SD.

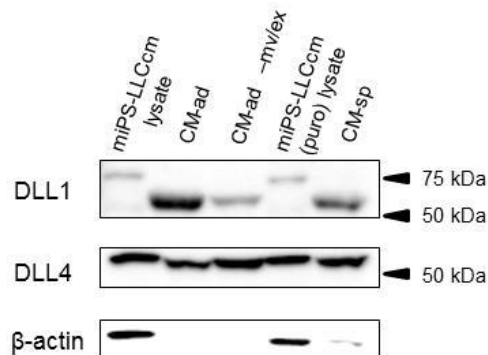


Figure. 3-9 Protein levels of Notch ligands in CM-ad or CM-ad-mv/ex were analyzed by Western blot.

## 第6節 本章のまとめ

本章では、分化により生じたがん細胞とがん幹細胞ニッチの関連性を、がん細胞由来の分泌因子ががん幹細胞の自己複製能に与える影響を解析する事で評価する事を目的として研究を行い、以下の結論を得る事が出来た。

1. がん細胞由来の分泌因子、がん幹細胞由来の分泌因子は共にがん幹細胞の自己複製能を増強する機能を持つ。この増強効果は主にがん細胞由来の分泌因子によりもたらされている。
2. がん細胞由来の分泌因子は、一部 Notch シグナルの活性化を介して自己複製能の増強を引き起こしている。
3. Notch シグナルの活性化は、分泌型 DLL1、DLL4 に加え、これまでに報告されていない液性因子もしくは制御機構の組み合わせにより誘導されると予想される。

## 第 4 章 がん細胞分泌因子によるがん幹細胞の分化能および分化系統の維持

### 第 1 節 諸言

がん幹細胞ニッチは、一般的にがん幹細胞の自己複製能の維持だけでなく、分化の方向性の決定にも関与していると考えられている[26-28]。がん幹細胞の分化系統の維持機構の詳細な解析は、がん幹細胞ニッチを理解する上で重要な課題であるが、がん幹細胞の分化系統についてはほとんど明らかにされておらず、唯一血管内皮細胞への分化系統が判明しているのみである[33-35]。このため、分化系統の維持機構については未だ不明な点が多く残されているのが現状である。

miPS-LLCcm 細胞は、第 2 章、第 3 章で得られた結果より、血管内皮様細胞への分化能を有し、本細胞株より分化して生じたがん細胞由来の分泌因子ががん幹細胞の自己複製能の維持に寄与している事が明らかとなった。がん細胞ががん幹細胞ニッチの重要な構成要素の一つであると仮定すれば、この分泌因子ががん幹細胞の分化系統維持機構にも関与している事が予想される。

本章では、この可能性を検証するため、分泌因子とがん幹細胞の分化系統の維持との関係性を、血管内皮細胞への分化能を指標として解析した。

### 第 2 節 分泌因子ががん幹細胞の分化系統に与える影響

まず初めに、分泌因子のがん幹細胞の分化系統維持への寄与を調べるため、分泌因子が長期的に枯渇した条件下における血管内皮細胞への分化能の変化を解析する事を計画した。Puromycin 存在下での幹細胞集団の濃縮期間と puromycin 非存在下での分化期間を 7 日間周期で繰り返し、各分化期間の終了時に tube formation および real-time PCR により血管内皮細胞への分化能を評価した(図 4-1)。

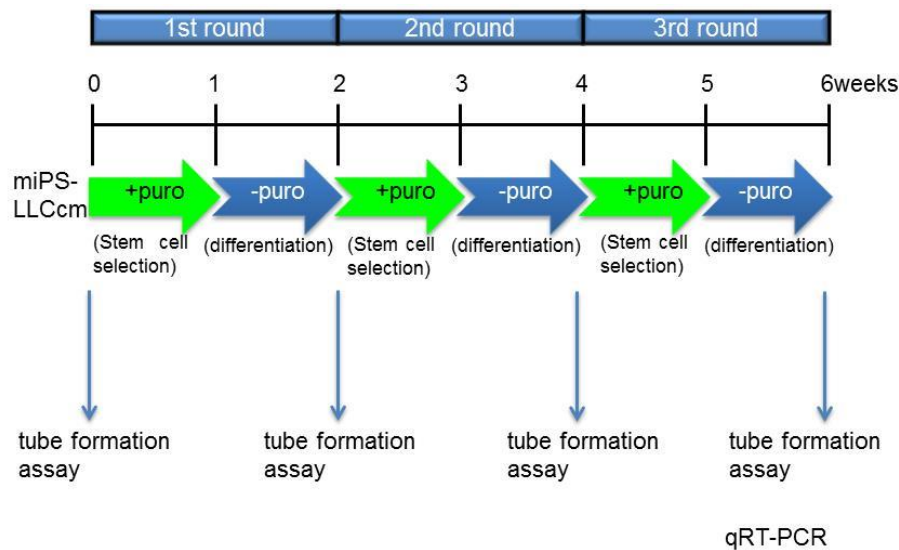


Figure. 4-1 A schematic drawing of experiments for Fig. 4-2, 4-3.

その結果、本サイクルを3サイクル繰り返した後の miPS-LLCcm 細胞は、tube 形成能がほぼ失われ(図 4-2)、血管内皮マーカである VEGFR2 の遺伝子発現も同様に失われる事が明らかとなった(図 4-3)。しかし、GFP の細胞集団を生み出す機能は失われていない事から、miPS-LLCcm 細胞の分化能自体は失われていない事が分かる(図 4-4)。この事から、「血管内皮細胞への分化」という miPS-LLCcm 細胞の分化系統の一つが失われたと考えられる。以上の結果より、がん細胞由来の分泌因子ががん幹細胞の分化系統の維持に寄与している事が示された。更に、3 サイクル繰り返した後の細胞から回収した CM(CM-3<sup>rd</sup> ad)の自己複製能増強効果を解析したところ、CM-ad の増強効果と比較して半分程度に減少しており、DAPT による阻害効果が見られなかった(図 4-5)。この事から、Notch シグナルの活性化は分化により生じた血管内皮様細胞により誘導されている事が示唆された。

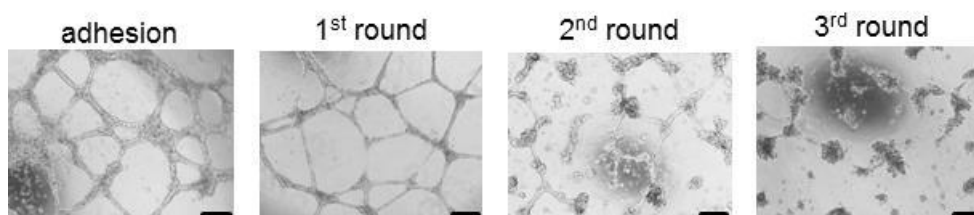


Figure. 4-2 miPS-LLCcm cells were cultured in the medium containing puromycin for 1 week to eliminate differentiated cells. Following a week, cells were cultured in puromycin-free medium to allow differentiated cells to grow. This cycle was repeated three times. The ability to differentiate into vascular endothelial cells at the end of each cycle was evaluated by *in vitro* tube formation assay (scale bar 500  $\mu$ m). (共同研究者 Marta Prieto-Vila 氏による実験)

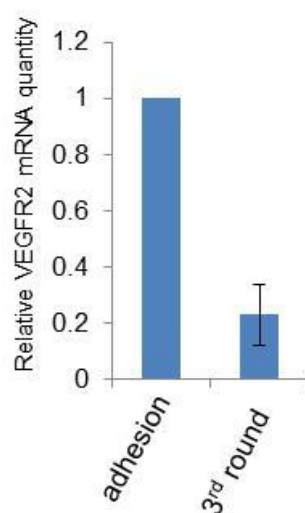


Figure. 4-3 The expression levels of VEGFR2 in indicated cells were quantified by real-time RT-PCR. The ability of differentiation into endothelial cells was deprived. Data are the results of three independent experiments. Bars indicate SD.

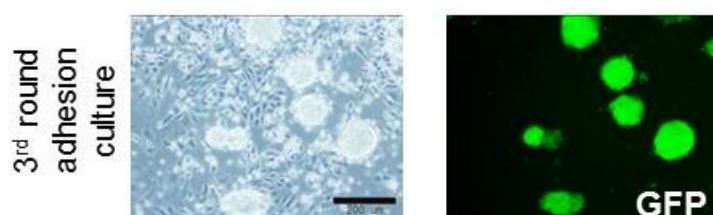


Figure. 4-4 After 3<sup>rd</sup> round selection and differentiation, the resultant culture consisted of GFP-positive cells with stem-like morphology and GFP-negative differentiated cells, indicating the stem cells still possessed the differentiation capacity (scale bar 200  $\mu$ m).

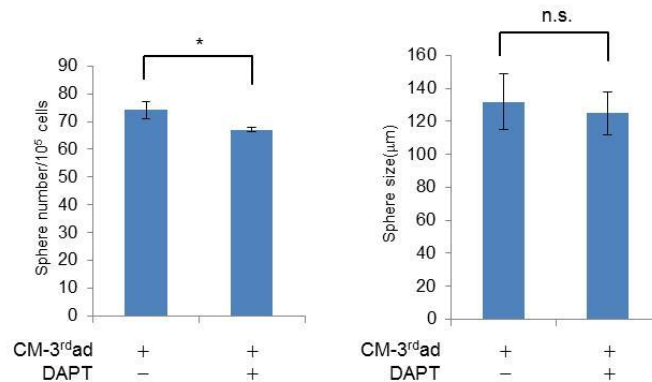
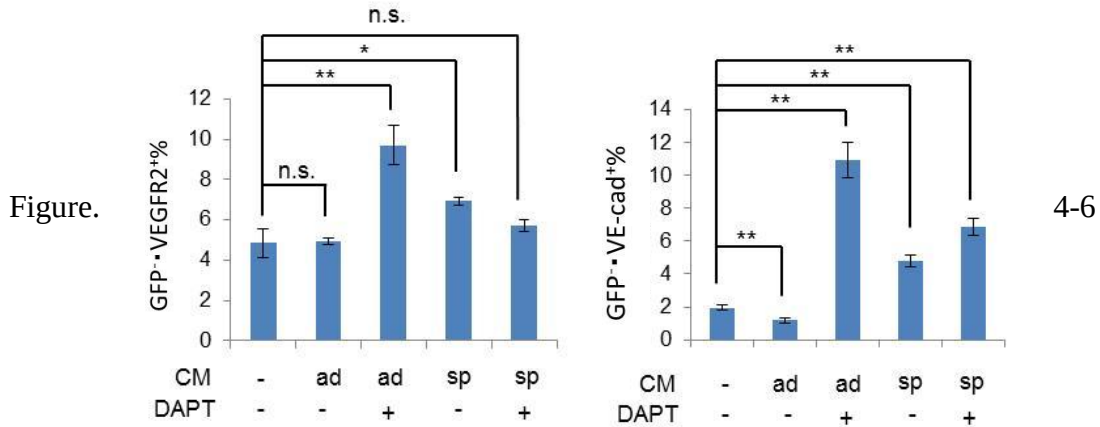


Figure. 4-5 Sphere-forming ability of conditioned medium from miPS-LLCcm cells After third round selection (CM-3<sup>rd</sup> ad) were analyzed by sphere formation assay with/without 20 μM DAPT (\*p<0.05; \*\*p<0.01, Student's t-test). Data are the results of three independent experiments. Bars indicate SD.

### 第3節 分泌因子によるがん幹細胞の分化能の増強

次に、分泌因子ががん幹細胞の分化能に与える直接的な影響を解析する事を計画した。CM-ad、CM-sp、DAPT 存在下、または非存在下でそれぞれ sphere 形成を行い、形成された sphere をトリプシン処理により single cell となる様に分解した後、接着培養を行う事で分化誘導を行った。分化誘導 7 日後の各サンプルにおいてフローサイトメトリー解析および tube formation assay を行い、血管内皮細胞への分化能の変化を解析した。フローサイトメトリー解析の結果より、CM-ad および DAPT 存在下で sphere 形成を行った場合のみ、VEGFR2 および VE-cad を発現する細胞集団の顕著な増加が見られた(図 4-6)。この培養条件でのみ、GFP<sup>+</sup>な細胞集団の顕著な減少も確認する事が出来た(図 4-7)。



Spheroids were formed with CM-ad or CM-sp in the presence or absence of 20 $\mu$ M DAPT. The spheroids were enzymatically dissociated and cultured under adherent condition for 1 week to allow differentiated cells to grow. The potential of the spheroid cells to differentiate into vascular endothelium grown under each condition were assessed by flow cytometry.

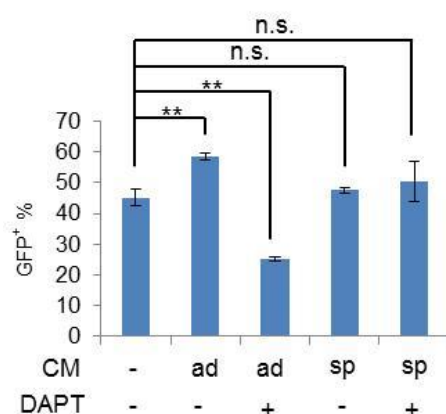


Figure. 4-7 Percentage of the GFP<sup>+</sup> cells under each condition in Fig. 4-6 were assessed by flow cytometry.

tube formation assay を行った場合についても、同様にこの培養条件において最も強固な管腔構造の形成が見られた(図 4-8)。以上から、がん細胞由来の分泌因子は血管内皮細胞への分化能を促進する因子も含まれている事が示唆された。また、Notch シグナル活性化の阻害により分化が亢進する事から、Notch シグナルはがん幹細胞の自己複製能と分化能の間のバランス調整を担っていると考えられる。

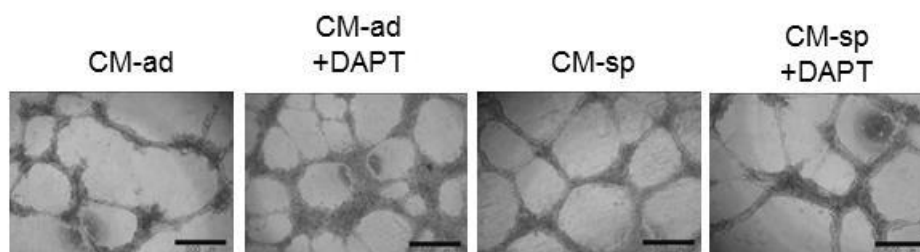


Figure. 4-8 *In vitro* tube formation assay were performed under each condition in Figure. 4-6.

#### 第4節 本章のまとめ

本章では、分化により生じたがん細胞とがん幹細胞ニッチの関連性を、がん細胞由来の分泌因子ががん幹細胞の分化能および分化系統に与える影響を解析する事で評価する事を目的として研究を行い、以下の結論を得る事が出来た。

1. がん細胞由来の分泌因子は、がん幹細胞の血管内皮細胞への分化系統の維持に寄与している。
2. がん幹細胞の **Notch** シグナルの活性化は、分化により生じた血管内皮様細胞により誘導されている。
3. がん細胞由来の分泌因子には、自己複製能を促進する因子だけでなく、血管内皮細胞への分化を促進する因子も同時に含まれている。
4. **Notch** シグナルは、がん幹細胞の自己複製能と分化能のバランス調整に寄与している。

## 第 5 章 結論

### 第 1 節 考察

がん幹細胞ニッチは、がん幹細胞の自己複製能・多分化能を制御していると考えられている。従って、がん幹細胞ニッチを標的とした阻害薬の開発は、がん根治に向けた効果的なアプローチとなり得る。しかし、がん幹細胞ニッチががん幹細胞の機能を制御するメカニズムは未だ不明な点が多く残されているのが現状である。本研究において、著者はがん幹細胞モデル細胞の一つである **miPS-LLCcm** 細胞を用い、がん幹細胞から分化により生じた子孫細胞集団のがん幹細胞ニッチの構成要素としての重要性を調査した。得られた結果より、がん幹細胞の自己複製能は分化した細胞集団及び幹細胞集団の分泌因子により増強されることが示された(図 3)。更に、分化した細胞集団からの分泌因子には、がん幹細胞の分化能及び分化系統を維持する機能がある事が明らかとなった(図 4)。がん幹細胞の **Notch** シグナルは分化した子孫細胞集団より分泌された因子により活性化されており、これが分化能と自己複製能の間のバランスを制御している事も本研究により明らかとなった(図 4)。従って、がん幹細胞より分化して生じた子孫細胞集団は、がん幹細胞ニッチの構成要素として、がん幹細胞の機能維持に重要であると言える。言い換えれば、がん幹細胞の重要な機能である自己複製能および多分化能は、自身から分化によって生じた子孫細胞によって形成されるニッチによって維持されているという事である(図 5)。

図 3 の結果より、分泌因子は一部 **Notch** の活性化を通じてがん幹細胞の自己複製能を増強している事が分かる。過去の複数の報告において、血管内皮細胞ががん幹細胞の自己複製能を **Notch** シグナルの活性化を介して増強している事が示されているが、これらの研究において **Notch** リガンドの供給源として用いられているのはあくまで「正常な」血管内皮細胞株のみであり、がん幹細胞から分化して生じた子孫細胞集団が本現象に関与し得るかは可能性を示すのみに留まっていた。本研究により得られた結果は、子孫細胞に含まれている血管内皮様細胞集団が **Notch** リガンドの供給源足り得る事を明確に示すものである(図 4)。

また、得られた結果から、**Notch** シグナルの活性化は細胞接触によらず分泌因子によって引き起こされている事が判明した。通常、**Notch** リガンドは膜タンパク質であることから、分泌小胞上にリガンドが提示されている可能性が考えられたが、分泌小胞は実際には本現象には関与していなかった(図 3)。直近の研究により、結腸直腸がんにおいて、内皮細胞より分泌型の **jagged1** が分泌さ

れ、これががん幹細胞の自己複製能に寄与している事が報告されている[52]。この様な分泌型のリガンドがこの Notch シグナル活性化に寄与している可能性がある。実際に、本研究においても、CM 中に分泌型の DLL1 及び DLL4 を検出する事が出来た。しかしながら、これらの分泌型リガンドは Notch を活性化しない CM-sp 中にも含まれているため、これらのみでは本現象を説明する事は出来ない。以上から、これら以外の典型的な Notch リガンドとは異なる分泌因子が同時に作用している事が示唆される。例えば、可溶性因子である fibulin-3 が、Notch シグナルの *cis*-inhibitor である DLL3 のアンタゴニストとして作用する事で、間接的に Notch シグナルの活性化を引き起こすという現象が報告されている[53]。同様のメカニズムが本現象においても作用している可能性は高いと思われる。現段階においては、Notch シグナル活性化に関与する全ての因子の特定には至っていないが、将来的に特定する事が出来れば、がん幹細胞の自己複製能の阻害を行う上で有効な治療標的となり得る。さらに、今回我々の得られた結果において、分泌因子による自己複製能の増強効果における Notch の寄与は部分的なものである事から、分泌因子が Wnt や Hedgehog に代表されるがん幹細胞の自己複製能増強に関与すると報告されている他のシグナル伝達経路の活性化に関与している可能性が予想される。分泌因子が活性化し得る他のシグナル伝達経路の特定は、がん幹細胞の自己複製能維持とがん幹細胞ニッチとの関係性を明らかにするうえで重要な課題であると言える。

更に、本研究により、分泌因子はがん幹細胞の持つ分化能のうち少なくとも「血管内皮細胞への分化」という一つの分化系統の制御に関与する事が示された(図4)。あるいは、この結果はがん幹細胞の分化能の可塑性や、がん幹細胞集団の多層性を示唆するものである可能性も考えられる[54, 55]。がん幹細胞由来のがん細胞からのフィードバックは、がん幹細胞の特定の分化系統において重要な遺伝子群の発現を制御しているか、もしくは特定の分化系統にある程度移行したがん幹細胞集団の分化を促している事が予想される。どちらの可能性が正しいにせよ、このがん幹細胞の「可塑性/多層性」は、存在する環境によって左右されるがん幹細胞の多層性の変化を説明するものであると考えられる。がん幹細胞の分化能制御に関わる分泌因子の特定は、がん幹細胞の分化誘導療法の発展において重要な役割を果たすと考えられる[56]。

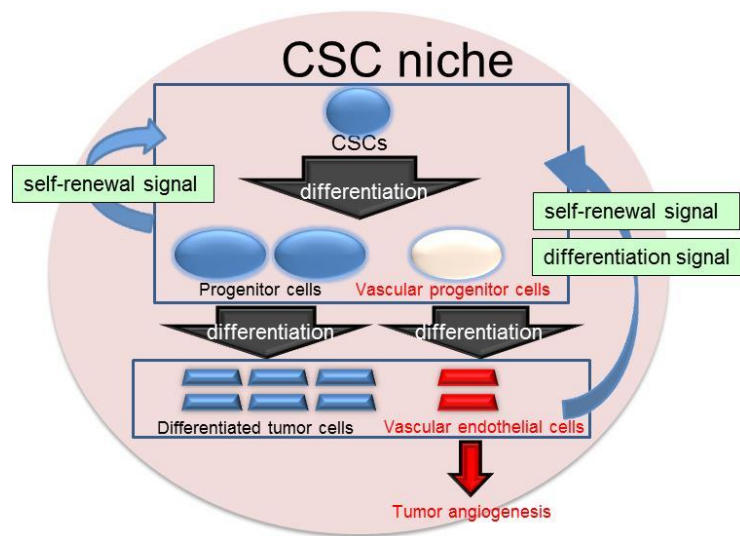


Figure. 5 Model of the CSC niche created by CSCs themselves.

## 第2節 結論

本研究では、がん幹細胞由来のがん細胞とがん幹細胞ニッチの関係性を分泌因子に着目して解析し、最終的に以下の結論を得る事が出来た。

1. **miPS-LLCcm** 細胞は、血管内皮様細胞に分化する機能を有するがん幹細胞株である。この特徴は、がん幹細胞の分化系統を解析する上で有効である。
2. がん細胞由来の分泌因子は、がん幹細胞の自己複製能・分化能双方の制御に寄与する。
3. がん細胞由来の分泌因子による自己複製能の増強は、一部 **Notch** シグナルの活性化を介しており、この **Notch** シグナルの活性化ががん幹細胞の自己複製能と分化能のバランス制御を行っている。
4. **Notch** シグナルの活性化はがん幹細胞より分化して生じた血管内皮様細胞により誘導される。
5. **Notch** シグナルの活性化には、分泌型の **Notch** リガンドに加え、更なる因子または制御機構が関与していると予想される。
6. がん細胞由来の分泌因子が長期的に枯渇した場合、がん幹細胞の分化系統に変化が生じる。これは、がん幹細胞の可塑性もしくは多層性を示すものであると考えられる。

## 参考文献

1. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105 - 11.
2. Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med* 2009; 15: 1010 - 2.
3. Zhao RC, Zhu YS, Shi Y. New hope for cancer treatment: exploring the distinction between normal adult stem cells and cancer stem cells. *Pharmacol Ther* 2008; 119: 74-82.
4. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; (7):730-7
5. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63(18):5821-8
6. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432(7015):396-401
7. Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 2004; 23(43):7267-73.
8. Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L,

- Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP. CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 2007; 67(9):4010-5.
9. Aguado T, Carracedo A, Julien B, Velasco G, Milman G, Mechoulam R, Alvarez L, Guzmán M, Galve-Roperh I. Cannabinoids induce glioma stem-like cell differentiation and inhibit gliomagenesis. *J Biol Chem* 2007; 282(9):6854-62
  10. Taylor MD, Poppleton H, Fuller C, Su X, Liu Y, Jensen P, Magdaleno S, Dalton J, Calabrese C, Board J, Macdonald T, Rutka J, Guha A, Gajjar A, Curran T, Gilbertson RJ. Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell* 2005; 8(4):323-35
  11. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005; 65(23):10946-51
  12. Miki J, Furusato B, Li H, Gu Y, Takahashi H, Egawa S, Sesterhenn IA, McLeod DG, Srivastava S, Rhim JS. Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Res* 2007; 67(7):3153-61.
  13. Richardson GD, Robson CN, Lang SH, Neal DE, Maitland NJ, Collins AT. CD133,

- a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 16):3539-45
14. Xin L, Lawson DA, Witte ON. The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(19):6942-7
  15. Florek M, Haase M, Marzesco AM, Freund D, Ehninger G, Huttner WB, Corbeil D. Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res* 2005; 319(1):15-26
  16. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; 445(7123):111-5
  17. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445(7123):106-10
  18. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc*

*Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(24):10158-63

19. Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H.

Characterization of CD133<sup>+</sup> hepatocellular carcinoma cells as cancer

stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351(4):820-4

20. Yin S, Li J, Hu C, Chen X, Yao M, Yan M, Jiang G, Ge C, Xie H, Wan D,

Yang S, Zheng S, Gu J. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells

possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer* 2007;

120(7):1444-50.

21. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF.

Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl*

*Acad Sci U S A* 2003; 100(7):3983-8

22. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba

P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE. Identification of a subpopulation of

cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell

carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(3):973-8

23. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M,

Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells.

*Cancer Res* 2007; 67(3):1030-7

24. Chen L, Kasai T, Li Y, Sugii Y, Jin G, Okada M, Vaidyanath A, Mizutani A, Satoh A, Kudoh T, Hendrix MJ, Salomon DS, Fu L, Seno M. A Model of Cancer Stem Cells Derived from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells. *PloS ONE* 2012; 7 4: e33544
25. Okita K, Ichisaka T & Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448: 313-317
26. Scaffidi P, Misteli T. In vitro generation of human cells with cancer stem cell properties. *Nat Cell Biol* 2011; 13(9):1051-61
27. Kobayashi S, Yamada-Okabe H, Suzuki M, Natori O, Kato A, Matsubara K, Jau Chen Y, Yamazaki M, Funahashi S, Yoshida K, Hashimoto E, Watanabe Y, Mutoh H, Ashihara M, Kato C, Watanabe T, Yoshikubo T, Tamaoki N, Ochiya T, Kuroda M, Levine AJ, Yamazaki T. LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug-resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution. *Stem Cells* 2012; 30(12):2631-44
28. Bissell MJ, LaBarge MA. Context, tissue plasticity, and cancer: Are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell* 2005; 7(1):17-23.
29. Lobo NA, Shimon Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu*

*Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 675-699

30. Yi SY, Hao YB, Nan KJ, Fan TL. Cancer stem cells niche: A target for novel cancer therapeutics. *Cancer Treatment Reviews* 2013; 39: 290–296
31. Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JI, Prince ME, Wicha MS & Nor JE. Endothelial Cell-Initiated Signaling Promotes the Survival and Self-Renewal of Cancer Stem Cells. *Cancer Res* 2010; 70: 9969-9978
32. Zhu TS, Costello MA, Talsma CE, Flack CG, Crowley JG, Hamm LL, He X, Hervey-Jumper SL, Heth JA, Muraszko KM, DiMeco F, Vescovi AL & Fan X. Endothelial Cells Create a Stem Cell Niche in Glioblastoma by Providing NOTCH Ligands That Nurture Self-Renewal of Cancer Stem-Like Cells. *Cancer Res* 2011; 71: 6061-6072
33. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, Fligelman B, Leversha M, Brennan C & Tabar V. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 2010; 468: 829-833
34. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM & De Maria R. Tumor vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 2010; 468: 824-828

35. Soda Y, Marumoto T, Friedmann-Morvinski D, Soda M, Liu F, Michiue H, Pastorino S, Yang M, Hoffman RM, Kesari S & Verma IM. Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *PNAS* 2011; 108 11; 4274-4280
36. Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, Nebelsiek T, Göktuna SI, Ziegler PK, Canli O, Heijmans J, Huels DJ, Moreaux G, Rupec RA, Gerhard M, Schmid R, Barker N, Clevers H, Lang R, Neumann J, Kirchner T, Taketo MM, van den Brink GR, Sansom OJ, Arkan MC, Greten FR. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* 2013; 152(1-2):25-38
37. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6):669-76.
38. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annu Rev Pathol* 2007;2:251-75.
39. Mohamed MM, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(10):764-75.
40. van Hinsbergh VW, Engelse MA, Quax PH. Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(4):716-28

41. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000; 2(10):737-44.
42. Chang SH, Kanasaki K, Gocheva V, Blum G, Harper J, Moses MA, Shih SC, Nagy JA, Joyce J, Bogyo M, Kalluri R, Dvorak HF. VEGF-A induces angiogenesis by perturbing the cathepsin-cysteine protease inhibitor balance in venules, causing basement membrane degradation and mother vessel formation. *Cancer Res.* 2009; 69(10):4537-44
43. Bisson I & Prowse DM. WNT signaling regulates self-renewal and differentiation of prostate cancer cells with stem cell characteristics. *Cell Research* 2009; 19: 683-697
44. Song Z, Yue W, Wei B, Wang N, Li T, Guan L, Shi S, Zeng Q, Pei X, Chen L. Sonic Hedgehog Pathway Is Essential for Maintenance of Cancer Stem-Like Cells in Human Gastric Cancer. *PloS ONE* 2011; 6 3: e17687
45. Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, Koh C, Zhang J, Li YM, Maciaczyk J, Nikkhah G, DiMeco F, Piccirillo S, Vescovi AL & Eberhart CG. NOTCH Pathway Blockade Depletes CD133-Positive Glioblastoma Cells and Inhibits Growth of Tumor Neurospheres and Xenografts. *Stem Cells* 2010; 28(1):

46. Espinoza I & Miele L. Notch inhibitors for cancer treatment. *Pharmacol Ther* 2013; S0163-7258(13)00044-2
47. Capaccione KM & Pine SR. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis* 2013; doi:10.1093/carcin/bgt127
48. Holland JD, Klaus A, Garratt AN, Birchmeier W. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 2013; 25(2):254-64
49. Merchant AA & Matsui W. Targeting Hedgehog — a Cancer Stem Cell Pathway. *Clin Cancer Res* 2010; 16:3130-3140
50. Tang SN, Fu J, Nall D, Rodova M, Shankar S & Srivastava RK. Inhibition of sonic hedgehog pathway and pluripotency maintaining factors regulate human pancreatic cancer stem cell characteristics. *Int J Cancer* 2012; 131, 30–40
51. Sheldon H, Heikamp E, Turley H, Dragovic R, Thomas P, Oon CE, Leek R, Edelmann M, Kessler B, Sainson RC, Sargent I, Li JL & Harris AL. New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood* 2010; 116 13: 2385-94
52. Lu J, Ye X, Fan F, Xia L, Bhattacharya R, Bellister S, Tozzi F, Sceusi, Zhou Y, Tachibana I, Maru DM, Hawke DH, Rak J, Mani SA, Zweidler-McKay P, Ellis

- LM. Endothelial Cells Promote the Colorectal Cancer Stem Cell Phenotype through a Soluble Form of Jagged-1. *Cancer Cell* 2013; 23 2: 171-185
53. Hu B, Nandhu M, Sim H, Agudelo-Garcia PA, Saldivar JC, Dolan CE, Mora ME, Nuovo G, Cole SE & Viapiano MS. Fibulin-3 Promotes Glioma Growth and Resistance through a Novel Paracrine Regulation of Notch Signaling. *Cancer Res* 2012; 72: 3873-3885
54. Lotem J & Sachs L. Epigenetics and the plasticity of differentiation in normal and cancer stem cells. *Oncogene* 2006; 25, 7663–7672
55. Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Research* 2012; 22:457-472
56. Shekhani MT, Jayanthi AS, Maddodi N, Setaluri V. Cancer stem cells and tumor transdifferentiation: implications for novel therapeutic strategies. *Am J Stem Cell* 2013; 2(1):52-61

## 謝辞

本研究は、著者が岡山大学大学院自然科学研究科博士後期課程在学中に、岡山大学大学院自然科学研究科教授 妹尾 昌治 先生の御指導のもとに行ったものであります。

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜り、本論文をまとめるに際し、親身なる御助言を賜りました 妹尾 昌治 教授に深く感謝の意を表し、厚く御礼申し上げます。

本論文の審査過程において、数々の御助言と御指導を賜りました岡山大学大学院自然科学研究科 徳光 浩 教授、佐藤 あやの 准教授に深謝申し上げます。

また、本研究における議論・検討にあたり、研究全般に対する適切な御指導を頂くと共に、研究方針について御教授賜りました岡山大学大学院自然科学研究科 村上 宏 准教授、水谷 昭文 助教、笠井 智成 助教に御礼申し上げます。

本研究において著者と共に遂行にあたった 閻 婷 修士、Marta Prieto-Vila 修士、宗田 龍幸 学士、平本 祐樹 学士、並びにナノバイオシステム分子設計学研究室の諸氏、諸先輩方に感謝いたします。

最後に、大学院博士課程への進学を承諾し、6年の長きにわたり精神的、経済的に援助してくれました父、母に心より感謝申し上げます。

平成 26 年 2 月 松田 修一

※本論文に記載した研究成果は、*International Journal of Cancer* (2013 Dec 3 doi: 10.1002/ijc.28648; Title: “Cancer stem cells maintain a hierarchy of differentiation by creating their niche.”)に掲載されている。