

## 10. 癌細胞とES細胞はどのくらい似ているのか

金城 智章 (医学部医学科 3年)

指導教員

横田 崇 (医学系研究科 教授)

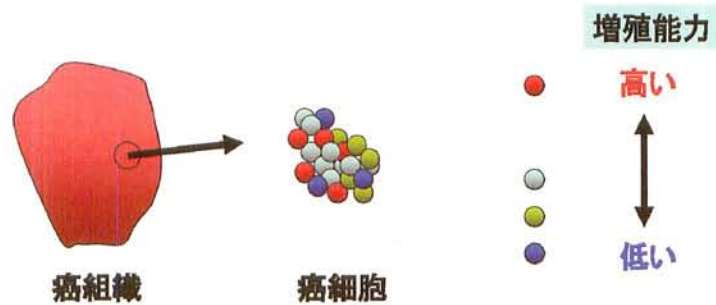
### 1. 序

従来、癌細胞は遺伝子変異などの原因により生体の体細胞がコントロールを失って無制限に増殖するようになったものであると考えられてきた。しかし近年の研究で、癌組織の中にはさまざまな増殖能力を持った癌細胞が混在していることがわかってきた (図1)。

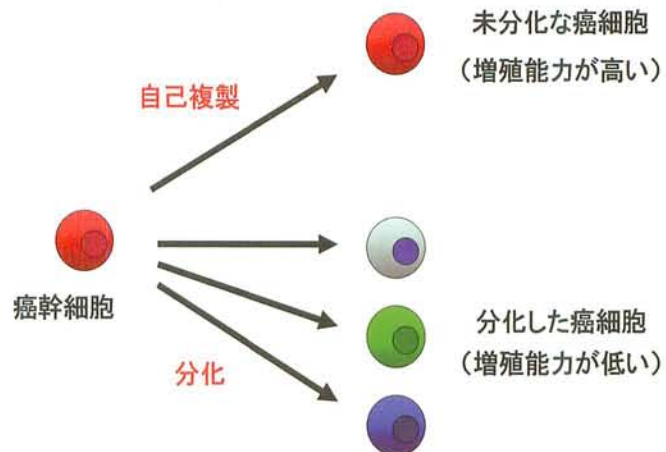
このことから最近では癌組織が「癌幹細胞」と呼ばれる細胞群から形成されるという「癌幹細胞説」が唱えられている。この説では癌幹細胞が、自己複製能 (未分化を維持したまま増殖を続ける能力) 及び多分化能 (自分以外の多様な細胞に分化する能力) という2つの能力を持つために、癌幹細胞が増殖して癌組織を形成していくときに増殖能力の高い未分化な癌細胞と増殖能力の低い分化した癌細胞が混在してしまうと考えられている (図2)。このような「癌幹細胞」の存在は、1994年には血液の癌である白血病において証明されており(1)、2003、2004年には固形癌

においてもその存在が証明された(2,3)。

「癌幹細胞説」は癌発生のメカニズムを説明する説であると共に、癌の転移や再発のメカニズムを考える上でも重要な知見を与えると考えられ、これからもその重要性はますます高くなると思われる。今回私は癌幹細胞が発生初期の胚から樹立される幹細胞である胚性幹細胞(ES細胞)とよく似ているのではないかと考えた。その理由としては、まずES細胞も癌



(図1) 様々な増殖能力を持つ癌細胞



(図2) 癌幹細胞の能力

幹細胞と同じく自己複製能、多分化能を併せ持つという点あげられる。また両細胞ともにマウスに注入すると悪性（癌細胞）と良性（ES細胞）の違いはあるが腫瘍を形成するという点も両者の類似性を示唆している。

以上のことから私は癌幹細胞と ES 細胞は分子レベルにおいても共通の特徴があるのではないかと考え、本研究では両細胞の増殖(自己複製)の分子機構の比較を行った。

## 2. 材料と方法

### ①癌細胞株

癌細胞株としては繊維芽腫由来の癌細胞株である HT1080 と胃癌由来の癌細胞株である AZ1 を用いた。各々の細胞株は DMEM (ダルベッコ変法イーグル培地)/10%FBS (牛胎児血清)で培養を行った。

### ②RT-PCR 法による STAT3 下流遺伝子群の解析

STAT3 の優性抑制型変異体を発現させた HT1080 細胞と発現させていない HT1080 細胞を回収し、Sepasol を用いて RNA を調製した。次に 3  $\mu$ g の RNA から ReverTra Ace を用いて cDNA を調製した。この cDNA を鋳型として Ampliqon III を用いた PCR 反応を以下の条件で行った。

94°C, 2min → (94°C, 15sec → 60°C, 30sec → 72°C, 1min) × 30 cycle → 4°C

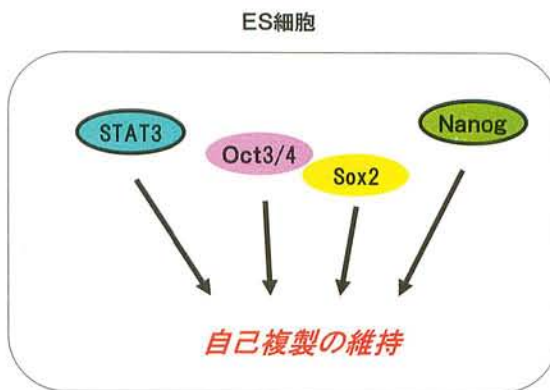
なお、サイクル数については調べる遺伝子によって適宜調節を行った。

### ③軟寒天培地を用いた足場非依存性増殖の解析(Soft agar assay)

まず、下地の培地として 0.53%の SeaPlaque agarose を含む 3ml の DMEM/10%FBS を 6cm dish に撒いた。次に  $1.2 \times 10^4$  個の細胞を 2.4ml の DMEM/10%FBS/0.53%SeaPlaque agarose に懸濁した液を下地の培地の上に加えて agarose を固めた。サンプルは 2 週間程度培養し、増殖した細胞を MTT 溶液で染色した後、写真に記録した。

### 3. 結果

癌幹細胞については増殖の詳細な分子機構がまだ明らかになっていないため、今回の研究では ES 細胞の方からのアプローチを行った。具体的には現在 ES 細胞の自己複製に重要であると知られる分子の中から STAT3 と Nanog という 2 つの転写因子に注目して研究を行った (図 3)。



(図 3) ES 細胞の自己複製に関与している遺伝子群

#### ①STAT3 の下流遺伝子の比較

STAT3 は外界からの増殖指令を受け取ると DNA に結合し、様々な下流遺伝子の発現を制御する転写因子である。これまでの研究から STAT3 は ES 細胞の自己複製、及び癌細胞の増殖において重要な役割を果たしていると考えられている(4,5)。もし、ES 細胞と癌細胞が似ているのなら STAT3 の下流遺伝子も似ているはずである。そこで ES 細胞において STAT3 の下流にあるとされる遺伝子 (Sddr、Gli1、Zfp57、Jmjd1a、Aes、JunB) について、癌細胞(HT1080 細胞)においても STAT3 の下流に存在するかどうかを調べた。方法としては、HT1080 細胞に STAT3 の優性抑制型変異体を過剰発現させることによって STAT3 を抑制した時の遺伝子

の発現量の変化を RT-PCR 法で測定した。その結果、STAT3 の活性を抑制すると、Sddr、Gli1、Zfp57、Jmjd1a、Aes の発現量が減少することが判明した(図 4)。

一方 JunB では発現量の変化は見られなかった。

このことから ES 細胞

における STAT3 下流遺伝子と癌細胞における STAT3 下流遺伝子の間にはある程度共通性があることが明らかとなった。



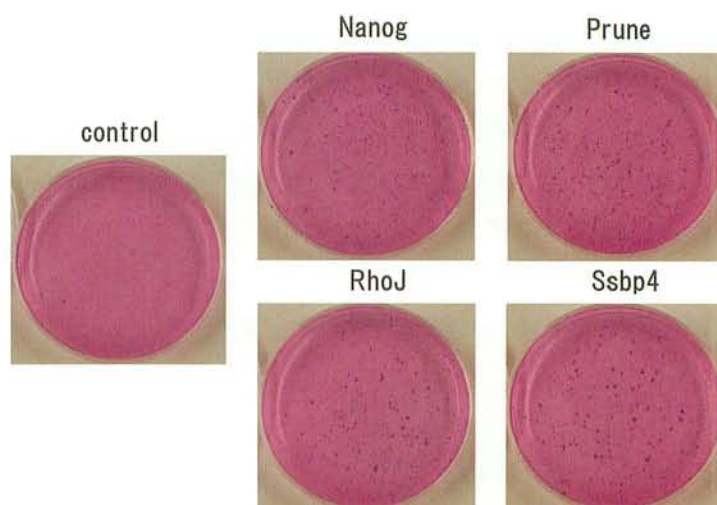
(図 4) HT1080 細胞において STAT3 を抑制すると Sddr、Gli1、zfp57、Jmjd1a、Aes の発現量が減少する

#### ②ES 細胞の自己複製促進遺伝子の癌細胞の増殖に対する効果

Nanog、RhoJ、Ssbp4、Prune を、ES 細胞に過剰発現させることにより自己複製が促進されることが知られている(6,7)。そこでこれらの遺伝子を癌細胞で発現させた時に、癌細胞の増殖にどのような影響を与えるかを調べた。増殖能の指標としては、癌細胞に特異的

な足場非依存性の増殖能を用いた。

Nanog、RhoJ、Ssbp4、Prune を過剰発現させた AZ1 細胞を用いて soft agar assay を行ったところ、これらの遺伝子を発現させていないコントロールの細胞に比べて、MTT 溶液で染色されるコロニー数の増加が認められた(図5)。このことから Nanog、RhoJ、Ssbp4、Prune は、癌細胞の足場非依存性の増殖を促進することが明らかとなった。



(図5) Nanog、RhoJ、Ssbp4、Prune を過剰発現させると AZ1 細胞の足場非依存性増殖が促進される

#### 4. まとめと展望

今回の研究により ES 細胞と癌細胞にはある程度共通点があるということがわかった。このことから、癌幹細胞は ES 細胞の増殖メカニズムの一部を用いて増殖を行っている可能性が考えられる。

今後研究が進んで ES 細胞と癌細胞が似ているということがよりはっきりとわかるようになれば、ES 細胞のメカニズムを調べることでまだまだ未知の部分の多い癌幹細胞の増殖メカニズムを明らかにする手がかりが得られることが期待される。

また癌幹細胞説に則って考えると手術や抗癌剤治療によって大部分の癌細胞を取り除いてもごく少数の癌幹細胞が生き残っていれば癌組織は再び増殖できるようになり、これが癌の再発の原因となると考えられる。癌幹細胞の増殖メカニズムが明らかになれば、癌幹細胞を直接攻撃することによって癌の転移や再発を防ぐことを可能にする新たな癌治療法の開発にもつながることが期待される。

参考文献

- (1)Ladipot T et al., Nature 367,645-8(1994)
- (2)Al-Hogg M et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100,3938-8(2003)
- (3)Singh SK et al., Nature 432,396-401(2004)
- (4)Yu H and Jove R, Nat. Rev. Cancer 4,97-105(2004)
- (5)Niwa H, Development 134,635-46(2007)
- (6)Chambers I et al., Cell 113,643-55(2003)
- (7)Pritsker M et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103,6946-51(2006)