博士論文

プロスタグランジン E2 の慢性的暴露による 人工多能性幹細胞のがん幹細胞化の研究

令和5年3月

峯松 秀希

岡山大学大学院

ヘルスシステム統合科学研究科

目次

| 第1章序 第1節 第2節 本 第3節 本 | 論 ・ がん幹細胞モデルの樹立・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ | 2 2 3 3 |
|---|---|--------------------------------------|
| 第 2 章 約 第 1 節 第 2 節 第 3 節 第 4 節 第 5 節 第 6 節 | 田胞外小胞の解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ | 4 4 5 8 0 4 5 |
| 第3章 第1節 第2節 第3節 第3節 第5節 本 | がん幹細胞誘導因子の探索・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ | 6 6 7 8 4 |
| 第4章 ブ 第1節 新 第2節 実 第3節 ブ 第4節 本 | プロスタグランジン E2 による継続的刺激・・・・・・・・・・・ 2 諸言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ | 5 5 6 0 |
| 第 5章 第12 第第3 第 第 第 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 | プロスタグランジン E2 により誘導された miPS-PGE2 細胞の解析・・・3 諸言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ | 1 1 1 3 1 4 7 1 |
| 第 6 章 7 第 1 節 考 第 2 節 新 | 考察と結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5 §察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ | 2 2 5 |
| 参考文献・・ 附録 プライマー 略号リスト | ・配列リスト・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ | 7 1 2 |
| 言时千立 | | ٨ |

第1章 序論

第1節 がん幹細胞モデルの樹立

がんは世界的にも患者数・死亡者数ともに年々増加しており、日本人の疾病による 死因の第一位であり、世界でも高位を占める疾患である。近年、医療技術の進歩とと もに分子標的薬を含む抗がん剤の開発が進み、化学療法や放射線療法により多くの がん治療が可能となった。しかし、治療に抵抗性を示す細胞集団の出現および再発・ 転移による死亡数は増え続けている[1]。

この再発・転移の原因として近年注目されているのが「がん幹細胞」である。このがん 幹細胞は、制がん剤や放射線に耐性を持つことが知られており、化学療法や放射線 療法を施しても、腫瘍が再発するのはがん幹細胞が原因であると考えられている。

「がん幹細胞」はがん細胞の集団の中で幹細胞に似た性質をもつ細胞として存在し、 がん組織はがん幹細胞と、その娘細胞が分化増殖したがん細胞からなる不均一な細 胞集団と考えられる。正常組織に細胞の階層性があるのと同様に、その階層の頂点 に幹細胞が存在するといった「がん幹細胞仮説」が広く受け入れられつつある[2]。こ のような腫瘍組織の不均一性はがん治療の困難さに通じている。

しかし、現状では、このがん幹細胞が発生するメカニズムは明らかとなってはいない。 このメカニズムを明らかにすることはがんの予防、診断及び治療に大きく貢献するこ とができると考えられる。

我々の研究室は、ルイス肺がん (LLC)細胞由来の培養上清及び培養上清を超遠 心法で分画して得られる細胞外小胞を培地に加えて継続的に培養したマウス人工多 能性幹細胞 (miPS 細胞)が 4 週間経過しても未分化な状態で生存し、これがマウス への移植において悪性腫瘍を形成することから、がん幹細胞様性質を示すようにな ると報告した[3,4]。さらに、超遠心法で得られる上清画分にも、がん幹細胞への誘導 活性が認められ、FGF-2 がその一因子であることが明らかとなってきている[5]。細胞 外小胞が複雑な分子構成であることや、加熱処理した上清画分についても miPS 細 胞をがん幹細胞へ誘導する活性が認められる(未発表)ことから、誘導因子は複数あ ると考えられた。したっがって、LLC 細胞の細胞外小胞にその因子を絞り込むことで、 誘導メカニズムの一端を解明することができると考えられる。

歴史的には慢性炎症とがん発生の関連性が指摘されてきたが、具体的な関連性 については未詳である。慢性炎症についても種々あり、個別に議論されてはきたもの の、一般性をもってがん発生を説明することは困難である。一方で、種々の炎症関連 物質はがん細胞株での過剰発現が認められ、現在までに多くの細胞増殖因子、イン ターロイキンを含むサイトカイン、ケモカインが報告されてきた。このことを考慮すると LLC 細胞の培養上清に炎症関連物質の存在を求めることは妥当と考えられる。炎症 と関連して亢進する代謝には糖代謝および脂質代謝などの可能性が存在するが、創 傷治癒とともに誘起される脂質代謝、特にアラキドン酸カスケードにはプロスタグラン ジンの存在がある。中でもアラキドン酸カスケードで生成するプロスタグランジン E2 は 細胞表面上の G タンパク共役受容体を刺激して細胞内シグナルを誘起することが知 られている。また、このシグナルの中には PI3 キナーゼの活性化に繋がるものもある。 我々の研究室ではこの PI3 キナーゼの活性化ががん幹細胞の誘導でも生じているこ とを報告してきた[6]。

第2節 本研究の目的

本研究では、がん細胞由来の細胞外小胞中の miPS 細胞からがん幹細胞へ誘導 に関与する因子を明らかにすることを目的とした。近年、がん細胞由来の細胞外小胞 ががんの悪化に関与していることが報告されており、我々の研究室においても LLC 細胞の細胞外小胞が miPS 細胞をがん幹細胞へ誘導することを示してきた。一般的 に細胞外小胞は、脂質粒子として microRNA やタンパク質など細胞質由来成分を内 包するとともに、脂質膜中にも存在するタンパク質も構成成分としている。細胞外小 胞の生成メカニズムや機能は未解明の部分も多いが、microRNA は、本来のメッセー ジのアンチセンス鎖として作用することで、細胞機能を制御していると考えられ、また 脂質は、糖脂質として細胞を刺激する機能もあれば、その成分から元の細胞が持つ 脂質代謝の履歴を反映していると考えられる。そこで、細胞外小胞の内包物や脂質 の解析を行い、その結果から推論して実証を試みた。

第3節 本論文の構成

本論文は、以下に示す様に全6章による構成とした。

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、miPS細胞をがん幹細胞へ誘導する因子について考察するために、LLC細胞の細胞外小胞について解析を行った。第3章では、細胞外小胞を構成する脂質を解析して得られた 手がかりより、がん幹細胞誘導因子の探索を行った。第4章では、がん幹細胞誘導 因子の候補物質の1つとして得られたプロスタグランジンE2により、がん幹細胞の誘 導の可能性について検討を行った。第5章では、プロスタグランジンE2により誘導さ れたがん幹細胞miPS-PGE2細胞の解析を行った。最後に第6章では、第2~5章に おいて得られた結果を考察・要約し、本論文の結論とした。

第2章 細胞外小胞の解析

第1節 緒言

細胞間のコミュニケーションを担う生体分子「細胞間メディエーター」は、タンパク質、 糖鎖、脂質、核酸、一酸化窒素等が知られている。中でも近年、脂質からなる細胞外 小胞が注目されている。細胞から分泌される膜小胞は細胞内小器官とは区別され細 胞外小胞と呼ばれ、その産生経路によってアポトーシス小胞、マイクロベシクル、及 びエクソソームに大別される。これらの細胞外小胞の中で、近年特にその機能が注 目され、医療分野での応用が期待されているのがエクソソームである。

エクソソームは種々の細胞より分泌される直径 30~100 nm の脂質二重膜小胞で あり、タンパク質や核酸などを含んでいる。エクソソームは、生体内でがんの転移や 炎症反応など様々な生体反応を引き起こしている。近年、エクソソームは、診断や治 療への応用が期待されている。実際、間葉系幹細胞から分泌されるエクソソームは 炎症抑制効果や組織修復効果等が示されている。このような機能面、及び細胞選択 的な物質輸送能、生体成分のみで構成されていることに起因した高い安全性等の特 性に注目し、エクソソームを Drug Delivery System (DDS)として利用する試みも報告さ れている[7]。リンパ腫等のがん細胞では細胞外小胞の分泌能が高いことが報告され ている。がん細胞以外で細胞外小胞の分泌能が高い細胞として、樹状細胞やマクロ ファージ等の免疫細胞が報告されている[8]。

細胞外小胞が内包している物質としては、microRNA が注目されている。生体内に おいて、がん細胞由来のエクソソームが microRNA により、がんの進行や転移を促進 することが報告されている[9]。また、分泌する細胞の状態や周辺環境によって、細胞 外小胞の脂質組成が変化し、細胞への取り込みが変化することが報告されている [10]。

そこで、本章では、miPS 細胞、LLC細胞及び miPS-LLCcm 細胞由来の 3 種の細胞外小胞の解析を行った。近年では、アポトーシス小胞、マイクロベシクル、及びエク ソソームは分離が困難なため、ひとくくりの「細胞外小胞」と呼ばれることが多くなって きているため、本研究においても、細胞外小胞として分離・解析を行った。

4

第2節 実験手法

·細胞培養

Mouse induced pluripotent stem cells (miPSCs, iPS-MEF-Ng-20D-17; Lot.012)は理 研セルバンク (日本)から提供頂いた。Mouse Lewis Lung Carcinoma cell lines (LLC) は ATCC (USA)から購入した。miPS-LLCcm 細胞は Chen らにより作製されたものを 用いた[3]。miPS 細胞は、nanog 遺伝子プロモーターの下流にピューロマイシン耐性 遺伝子と緑色蛍光タンパク質 (GFP)遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスの 胚性線維芽細胞をリプログラミングして得られたもので、未分化状態で GFP が発現し、 分化すると GFP が消失する性質を持つ。miPS 細胞は、miPS 培地 (15 % FBS, 0.1 mM Non-essential Amino Acid (NEAA, Thermo), 2mM L-グルタミン, 0.1 mM 2ーメルカ プトエタノール, 1000U/mL Leukemia inhibitory factor (LIF, Millipore), 50 U/mL ペニシ リン, 50 U/mL ストレプトマイシンを含有した DMEM)で 5 % CO2, 37 ℃の条件で、マイ トマイシン C 処理マウス胎児線維芽細胞 MEF (Reprocell, Japan)の支持細胞層を形 成させ、その上で培養して維持した。MEF を用いないフィーダーレスの場合にはゼラ チンコートディッシュ上で miPS 細胞を培養した。

miPS 細胞は、Exosome Free FBS を 15 %含有する DMEM に LIF を添加し、37 ℃、5 % CO₂の条件で培養した。 φ 10 cmディッシュに細胞数 2.5 × 10⁵ 個となるように継代し、 48 時間培養した。 その後、Exosome Free FBS を 10 % 含有する DMEM (LIF 不含有) に交換し、48 時間培養した。 培養 48 時間後に培養上清を回収した。

LLC 細胞は、Exosome Free FBS を 10 % 含有する DMEM で 37 °C、5 % CO₂の条件 で培養した。その後、Exosome Free FBS を 5 % 含有する DMEM に交換し、 ϕ 10 cm ディッシュに細胞数 1 × 10⁶ 個となるように継代し、 48 時間培養した。 培養 48 時間後 に培養上清を回収した。

miPS-LLCcm 細胞は、FBS を 10 %含有する DMEM と LLC 培養上清を体積比 1:1 で 混合した培地で 37 ℃、5 %CO₂ の条件で培養した。その後、 φ 10 cmディッシュに細 胞数 5 × 10⁵ 個となるように継代し、48 時間培養した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)(-)で 3 回洗浄後、Exosome Free FBS を 10 %含有する DMEM に交換し、48 時 間培養した。培養 48 時間後に培養上清を回収した。

・細胞外小胞の回収

各培養上清は、300 g, 4 ℃, 10 分間遠心後、上清を回収した。続いて、2000 g, 4 ℃ で 10 分間遠心後、上清を回収し、0.45 µm フィルターで濾過して培養上清を得た。その培養上清を 110,000 g, 4 ℃, 2 時間で超遠心し、沈渣を回収した。PBS(-)を加えて 110,000 g, 4 ℃で 2 時間超遠心し、沈渣にもう一度 PBS(-)を加えて、再度、超遠心し てペレットを PBS(-)で懸濁して回収した。回収した溶液を 0.45 µm フィルターにより濾 過して細胞外小胞溶液とした。培養上清 2 L から細胞小胞溶液として 1 mL 回収した。

・粒子径測定、ゼータ電位測定

平均粒子径及びゼータ電位は、精製水で希釈し、粒子径ゼータ電位分析装置 Zetasizer ZSP (Malvern) により測定した。

・タンパク質定量

タンパク質濃度は、1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)存在下で MicroBCA™ (Thermo)により測定した。

·電子顕微鏡写真

2 % リンタングステン酸溶液 (pH 7.0) によりネガティブ染色を行った。 透過型電子顕微鏡 JEM-1400Plus(日本電子)により撮像した。

・ウエスタンブロット法

12 % アクリルアミドゲルに各細胞外小胞をタンパク質 2.5 µgとなるように電気泳動した。その後、フッ化ポリビニリデン膜 (PVDF 膜) ヘブロッティングした。5 % Bovine Serum Albumin で 1 時間ブロッキング後、一次抗体:ウサギポリ抗 CD63 抗体 (1:100, SANTA CRUZ),または ウサギポリ抗 CD9 抗体 (1:1000,SBI)で 1 時間インキュベー トした。2 次抗体:ホースラディッシュペロキシダーゼ (HRP)標識抗ウサギ IgG 抗体で インキュベートした。結合した抗体は ECL Prime (GE Healthcare)により検出した。

▪microRNA 解析

細胞外小胞からの RNA の抽出は、3D-Gene extraction reagent (東レ)を用いて行っ た。抽出したトータル RNA は、Bioanalyzer (アジレント)により確認し、3D-Gene miRNA ラベリングキット (東レ)によりラベル化した。標識されたRNAの半量を 3D-Gene Mouse miRNA オリゴチップ (東レ)にハイブリダイズさせた。プローブのアノテー ション とヌクレオチド 配列のデザインは miRBase miRNA data base (http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/)に従って行った。洗浄後、蛍光シグナルを 3D-Gene Scanner (東レ)でスキャンし、3D-Gene Extraction ソフトウェア (東レ)を使 用して分析した。各スポットの生データは、95%信頼区間のすべてのブランクスポット のシグナル強度によって決定したバックグラウンドシグナルの平均強度に置換するこ とによりノーマライズされた。バックグラウンドシグナル強度の標準偏差 (SD)を超え るシグナル強度のスポットは有効であるとして測定した。マイクロアレイ実験全体を通 して、有効なスポットのシグナル強度を比較することにより、特定の miRNA の相対的 な発現レベルを算出した。ノーマライズデータは、シグナル強度の中央値が 25 に調 整されるように、アレイごとにノーマライズされた (Global normalization 値)。

・microRNA に対するアンチセンス鎖 RNA による細胞アッセイ

各細胞を 96 ウェルプレートに播き、24 時間培養した。翌日、培地交換を行い、 Transfection 試薬とアンチセンス鎖 RNA を混合した溶液を添加した。Transfection 試 薬は、siGENE (プロメガ)または RNAiMAX (Thermo)を用いた。アンチセンス鎖 RNA は終濃度 100 nM となるように添加した。ネガティブコントロール siRNA として、 Negative Control siRRNA (Ambion)、ポジティブコントロール siRNA として、Silencer KIF11 siRNA (Ambion)を用いた。アンチセンス鎖を添加 48 時間後に、細胞数測定用 WST-8 キット (キシダ化学)により生細胞を測定した。

·網羅的脂質解析

網羅的脂質解析は以前に記載したとおりの方法で行った[11,12]。

実際には、リン脂質は細胞外小胞または細胞よりブライダイヤー法により、抽出した [13]。

下層/有機相の一定分量をN2で蒸発乾固させ、ホスファチジルコリン (PC)及びホス ファチジルエタノールアミン (PE)の LC/MS/MS 測定のためにメタノールで溶解させ た。ホスファチジルセリン (PS)及びホスファチジルイノシトール (PI)を測定するため に、クロロホルムで平衡化した DEAE セルロースカラム (Santa Cruz)へ載せる前に、 同脂質抽出物にメタノールを同量添加した。クロロホルム/メタノール (1:1,v/v)で洗浄 後、酸性リン脂質はクロロホルム/メタノール/HCl/水 (12:12:1:1,v/v)で溶出させ、蒸 発乾固で得られた残留物をメタノールで溶解させた。得られた画分を、LC/MS/MS 分 析の前に TMS-ジアゾメタンとのメチル化反応させた[14]。

質量分析

LC-エレクトロスプレーイオン化-MS/MS 分析は、HTC・PAL オートサンプラー (CTC Alnalytic)をもつ UltiMate 3000LC システム (Thermo)を使用して行った。脂質サンプ ル 10 µL は室温 (25 °C)で Waters X-Bridge C18 column (3.5 µm, 1.0 mm × 150 mm i.d.)にインジェクションし、脂質の分離を行った。グラジエント溶媒システムを使用 して、移動相 A (イソプロパノール/メタノール/水 (5/1/4, v/v/v)、5 mM ギ酸アンモニ ウム、0.05 % 水酸化アンモニウム)、移動相 B (イソプロパノール、5 mM ギ酸アンモ ニウム、0.05 % 水酸化アンモニウム)を用いて以下の条件で行った A/B=70 %/30 % (0 min)、50 %/50 % (0-2 min)、20%/80% (2-13 min)、5 %/95 % (13-15 min)、5 %/95 % (15-30 min)、95 %/5 % (30-31 min)、95 %/5 % (31-35 min)、70 %/30 % (35-45 min)。流 速は 20 µL/min。

脂質種は、三段四重極質量分析計 (TSQ Vantage AM, Thermo-Fisher Scientific)を 備えた用イオンモードで選択反応モニタリングによって測定した。 個々の PL の特徴的 なフラグメントは、プロダクトイオンスキャン (MS/MS モード)によって検出した。 クロ マトグラフィーのピーク面積は、特定のクラスのリン脂質 (PC、PE、PS、PI など)の各 分子種 (32:0、34:1 など)の比較定量に使用した。

第3節 細胞外小胞の性状解析

各細胞由来の細胞外小胞(EVs)の粒子径・ゼータ電位を測定した結果、散乱強度 分布としては平均粒子径約200 nm、個数分布としては平均粒子径約100 nm の各細 胞小胞が得られた(表 2-1,図 2-1)。ネガティブ染色後に透過型電子顕微鏡で観 察した像とおおよそ一致している。粒子の表面電荷であるゼータ電位を測定した結果、 ともに-40 mV 程度であった(図 2-2)。エクソソームマーカーとしては CD9 及び CD63 が知られているが、ウエスタンブロットによりエクソソームマーカーを調べた結果、主 要なエクソソームマーカーCD9 はすべての EV で陽性であったが、CD63 は miPS 細 胞由来のEVsでは陰性であった。なお、3 細胞由来の各細胞外小胞間では、粒子径、 粒度分布及びゼータ電位において大きな差異は無かった。

| Evs | Average of particle diameter Z-average (nm) | Average of particle diameter particle number average (nm) | PdI | Z potential (mV) |
|-------------|---|---|-------|---------------------|
| miPS | 187 | 109 | 0.246 | -40 |
| miPS-LLCcmP | 240 | 92 | 0.273 | -37 |
| LLC | 208 | 86 | 0.230 | -37 |

表.2-1 各細胞外小胞の粒子径及びゼータ電位。



図. 2-1 各細胞外小胞の透過型電子顕微鏡写真。ネガティブ染色後。スケールバー:500 nm (上段)、100 nm (下段)。



図.2-2 各細胞外小胞の散乱強度粒度分布及び個数粒度分布。



図.2-3 ウエスタンブロットによる各細胞外小胞のエクソソームマーカーの解析。

第4節 細胞外小胞の microRNA 解析

miPS 細胞、LLC 細胞及び LLC 細胞の培養上清を用いて miPS 細胞から誘導され たがん幹細胞 miPS-LLCcm 細胞をヌードマウスへ皮下移植して形成した悪性腫瘍の 初代培養から得られた miPS-LLCcmP 細胞細胞の 3 細胞由来のEVsに包含された microRNA を調べた。その結果、各EVsにおける microRNA の Global Normalization 値が高い上位 20 の microRNA は表.2-1 に示したように、共通の microRNA が認めら れる。各 EVs で 3 種ともに見られる microRNA については、細胞が恒常的に放出して おり、LLC 細胞及び miPS-LLCcmP 細胞の EVs に共通して見られる microRNA は、 がん細胞で増加している可能性がある。さらに、miPS 細胞及び miPS-LLCcmP 細胞 の EVs に共通して見られる microRNA は、幹細胞で増加している可能性がある。また、 miPS-LLCcmP 細胞の EVs の microRNA は、ことを合わせて、がん幹細胞の特徴と位置づけられる可能性が示唆された。

また、miPS 細胞からがん幹細胞を誘導する因子を探索する目的で、miPS 細胞の EVs に対して LLC EVs で高値な microRNA について解析した (図.2-4)。この中から 特徴的な 6 種の microRNA を選び、microRNA のデータベースサイトである miRBase で及び PubMed で検索した結果を表 2-2 にまとめた。mmu-miR-5110 及び mmu-miR-3968 は、miPS 細胞の EVs の中でも上位 20 位以内であったため、それ以外の 4 種で ある mmu-miR-3075-5p、mmu-miR-487b-3p、mmu-miR-708-5P、及び mmu-miR-6945-5p に絞って、細胞での評価を行った。がん幹細胞を誘導する microRNA につい ては、がん細胞自身にも増殖等に影響することが考えられた。そこで、上記 4 種の microRNA に対するアンチセンス鎖 RNA を、2 種類の異なる transfection 試薬 siGE NE及び RNAiMAX を用いて3細胞へ導入し、細胞の増殖抑制を検討した(図.2-5及 び 6)。siGENEを用いた場合には、miPS 細胞において、ネガティブコントロール siRNA でも毒性が見られた。一方、Transfection 試薬 RNAiMAX を用いた場合には、 miPS 細胞において、ネガティブコントロール siRNA で毒性は見られなかったが、ポジ ティブコントロールに比べてアンチセンス鎖 RNA による増殖抑制は認められなかった。 また、miPS 細胞への Transfection 試薬の影響が大きく、miPS 細胞に核酸を継続的 に導入して評価することは困難が予想された。

miPS LLC EVs miPS-LLCcm EVs 1 mmu-miR-5100 mmu-miR-2137 mmu-miR-2137 2 mmu-miR-3968 mmu-miR-6240 mmu-miR-711 3 mmu-miR-6366 mmu-miR-3968 mmu-miR-6769b-5p 4 mmu-miR-5126 mmu-miR-5100 mmu-miR-7036a-5p 5 mmu-miR-2137 mmu-miR-6769b-5p mmu-miR-5126 mmu-miR-3960 mmu-miR-6945-5p 6 mmu-miR-3960 mmu-miR-3963 mmu-miR-5126 mmu-miR-7053-5p 7 mmu-miR-3075-5p mmu-miR-8099 mmu-miR-3968 8 9 mmu-miR-6910-5p mmu-miR-8113 mmu-miR-8113 10 mmu-miR-3960 mmu-miR-6366 mmu-miR-3154 11 mmu-miR-2861 mmu-miR-6945-5p mmu-miR-6366 12 mmu-miR-3087-5p mmu-miR-2861 mmu-miR-5100 13 mmu-miR-6538 mmu-miR-6538 mmu-miR-328-5p 14 mmu-miR-6769b-5p mmu-miR-711 mmu-miR-7118-5p 15 mmu-miR-7231-5p mmu-miR-149-3p mmu-miR-8101 16 mmu-miR-6968-5p mmu-miR-6910-5p mmu-miR-149-3p 17 mmu-miR-6412 mmu-miR-3154 mmu-miR-6236 18 mmu-miR-487b-3p mmu-miR-6236 mmu-miR-6538

mmu-miR-3075-5p

mmu-miR-8101

mmu-miR-6240

mmu-miR-2861

表. 2-1 各細胞外小胞における microRNA で Global Normalization 値が高い順に上 位から 20 の microRNA。

黄色:3細胞の EV に共通するもの。

mmu-miR-486b-3p

mmu-miR-7085-5p

19

20

水色:LLC 細胞と miPS-LLCcmP 細胞の EV に共通するもの。 茶色:miPS-LLCcm 細胞と miPS 細胞の EV に共通するもの。



図. 2-4 miPS 細胞に対して LLC 細胞で高い値を示す microRNA。左図: Global normalization 値 (横軸)と LLC 細胞 EVs/miPS 細胞 EVs の値 (縦軸)の関係。 Global Normalization 値が 1000 以上の microRNA のみをプロットした。右表: 左図中 の①~⑥に対応した microRNA。miPS-LLCcmP 細胞の EVs においても Ratio が上 位にあるものを赤字で示した。

| | Name | Ratio | 予想され るtarget gene数 ¹ | Location ¹ | 文献数² | 内容 |
|---|-----------------|-------|---------------------------------------|---|------|--|
| 1 | mmu-miR-3075-5p | 302 | 312 | Chromosome 14 NC_000080.6 (25534439 25534523) | 0 | |
| 2 | mmu-miR-487b-3p | 168 | 15 | Chromosome 12 NC_000078.6 (109727333 109727414) | 5 | 前立腺癌で高発現の報告がある一方、 大腸癌では抗腫瘍活性を示す報告が ある |
| 3 | mmu-miR-708-5p | 153 | 277 | Chromosome 7 NC_000073.6 (96249424 96249532) | 13 | 癌を抑制・促進両方の報告がある。癌 の由来臓器にもより、肺では抑制・促 進両方の報告がある。 |
| 4 | mmu-miR-6945-5p | 66 | 709 | Chromosome 13 NC_000079.6 (55507625 55507692 | 0 | |
| 5 | mmu-miR-5100 | 3.5 | 13 | Chromosome 11 NC_000077.6 (60728663 60728726, complement) | 6 | 肺癌を促進する報告がある。 |
| 6 | mmu-miR-3968 | 2.7 | 134 | Chromosome 11 NC_000077.6 (115447961 115448060, complement) | 1 | 皮膚癌で高発現の報告がある。 |

表. 2-2 miPS EVs に対して LLC EVs で高値な microRNA の詳細情報。

1:miRBase データベースでの検索結果。

2: PubMed での検索結果数。



図. 2-5 Transfection 試薬 siGENE を用いたアンチセンス鎖 RNA の細胞アッセイ。 ① mmu-miR-3075-5p antisense、② mmu-miR-487b-3p antisense、③ mmu-miR-708-5p antisense、④mmu-miR-6945-5p antisense、⑤Negative control miRNA、⑥ Positive control KIF11siRNA、⑦ Transfection 試薬 siGENE のみ。



図. 2-6 Transfection 試薬 RNAiMAX を用いたアンチセンス鎖 RNA の細胞アッセイ。 ① mmu-miR-3075-5p antisense、② mmu-miR-487b-3p antisense、③ mmu-miR-

708-5p antisense、④mmu-miR-6945-5p antisense、⑤Negative control miRNA、⑥ Positive control KIF11siRNA、⑦ Transfection 試薬 RNAiMAX のみ。

第5節 細胞外小胞のグリセロリン脂質解析

miPS 細胞、LLC 細胞及び miPS-LLCcmP 細胞に由来する EVs のグリセロリン脂 質の構成比を調べた(図.2-7)。その結果、LLC 細胞由来の細胞外小胞のホスファチ ジルイノシトール(PI)の割合は 11.5 %に対して、miPS-LLCcmP 細胞で 4.4 %、miPS 細胞で 4.6 %であった。LLC 細胞由来の細胞外小胞は miPS 細胞及び miPS-LLCcmP 細胞に比べてホスファチジルイノシトール(PI)の割合が多かった。



図.2-7 各細胞外小胞のグリセロリン脂質構成比。

PC: Phosphatidylcholine, PE: Phosphatidylethanolamine, PS: Phosphatidylserine, PI: Phoshatidylinositol, LPC: Lysophosphatidylcholine, LPE: Lysophosphatidylethanolamine, LPS: Lysophosphatidylserine, LPI: Lysophoshatidylinositol.

第6節 本章まとめ

本章では、3細胞由来の細胞外小胞を精製し、以下のような結果を得た。

- 1. 粒子径・ゼータ電位については、各細胞外小胞で大きな差異はなかった。
- 得られた各細胞外小胞のエクソソームマーカーを調べた結果、CD9 はすべての細胞の EVs で認められたが、CD63 については miPS 細胞の EVs でのみ認められなかった。
- 3. 各細胞由来の EVs の microRNA 解析を行った結果、3 細胞で共通してみられる microRNA、がん細胞で増加している microRNA、及び幹細胞で増加している microRNA といった違いが確認でき、がん幹細胞である miPS-LLCcmP 細胞では がん細胞と幹細胞の両方の microRNA を持つことがわかった。
- 4. miPS 細胞の細胞外小胞中に比べて、LLC 細胞の細胞外小胞で増加している microRNA が確認でき、特に顕著に増加している microRNA として、mmu-miR-3075-5p、mmu-miR-487b-3p、mmu-miR-708-5P、及びmmu-miR-6945-5pの4種 があった。
- 5.4種の microRNA に対するアンチセンス鎖を3細胞に Transfection 試薬を用いて 細胞へ導入し、増殖抑制を確認したが効果は見られなかった。
- 6. LLC 細胞由来の細胞外小胞は、miPS-LLCcmP 細胞及び miPS 細胞に比べてホス ファチジルイノシトール (PI)が多いことがわかった。

第3章 がん幹細胞誘導因子の探索

第1節 緒言

第2章の結果より、LLC 細胞、miPS 細胞、及び miPS-LLCcmP 細胞に由来する EVs を比較すると、がん細胞株 LLC 細胞の EVs の脂質の構成比は他の細胞由来 EVs と大きな違いが認められた。すなわち、LLC 細胞由来の細胞外小胞は miPS-LLCcmP 細胞及び miPS 細胞に比べてホスファチジルイノシトール (PI)が多い。一般 的に、がん細胞では正常細胞に比べて、グリセロリン脂質の構成比が大きく異なるこ とが報告されており[15]、各 EVs においてもこれが反映されている可能性があり、これ をさらに解析した。

第2節 実験手法

・プロスタグランジン E2 の定量

プロスタグランジン E2 (PGE2)の定量はプロスタグランジン E2 ELISA Kit (Cayman)とプレートリーダー EnSpire2300 (PerkinElmer)を用いた。検出値から標品の 4 パラメーターロジスティクス曲線を作成して定量値を算出した。

・ウエスタンブロット法

12.5%アクリルアミドゲルに各サンプルをタンパク質 20µgとなるように電気泳動した。 その後、フッ化ポリビニリデン膜(PVDF 膜)へブロッティングした。5% Bovine Serum Albumin で1時間ブロッキング後、各一次抗体*で一晩、冷蔵下でインキュベートした。 その後、室温下で2次抗体:ホースラディッシュペロキシダーゼ(HRP)標識抗ウサギ IgG 抗体(SIGMA)でインキュベートした。結合した抗体は ECL Prime(GE Healthcare) により検出した。ウエスタンブロット法によるタンパク質バンドは ImageJ <http://imagej.nih.gov/ij/>により定量的デンシトメトリー分析を行った。

*一次抗体

rabbit anti-PLA2 primary antibody (GeneTex) rabbit anti-COX-2 primary antibody (Cayman) rabbit anti-β-Actin primary antibody (Cell Signaling) rabbit anti-EP-2 primary antibody (abcam) rabbit anti-EP-4 primary antibody (Proteintech) rabbit anti-pAkt primary antibody (Cell Signaling) rabbit anti-Akt primary antibody (Cell Signaling)

▪RNA 抽出及び real-time-qPCR

・ロイコトリエン B4 の定量

ロイコトリエン B4 (LTB4)の定量は LTB4 ELISA Kit (Enzo)とプレートリーダー EnSpire2300 (PerkinElmer)を用いた。検出値から標品の4パラメーターロジスティクス 曲線を作成して定量値を算出した。

第3節 グリセロリン脂質解析

3 細胞のグリセロリン脂質解析の結果、miPS 細胞中でホスファチジルセリン (PS) 9.6 %、ホスファチジルイノシトール (PI) 10.7 %に対して、LLC 細胞中で PS 14.3 %、PI 23.6 %、miPS-LLCcmP 細胞中で PS 14.3 %、PPI 16.5 %であった。また、ホスファチジ ルコリン (PC)の割合は、miPS 細胞中で 52.7%であるのに対して、LLC 細胞中で 30.7 %、miPS-LLCcmP 細胞中で 29.0 %であった (図. 3-1)。したがって、がん関連細 胞中では、正常幹細胞に比べて PS 及び PI が高く、PC が低い結果となった。PI 代謝 系はがんの進行に関与することから[16]、PI 比の増加により、miPS 細胞からがん幹 細胞への誘導をトレースできる可能性が示唆された。さらに、PI の第 2 位のほとんど はアラキドン酸である[17,18]。一般的にアラキドン酸は、生体内で炎症やがんに密接 に関与するエイコサノイドと呼ばれるプロスタグランジン及びロイコトリエンの一部とし て使用される[19]。これらの炎症性エイコサノイド関係している PI 比は LLC 細胞と同 様に miPS-LLCcmP 細胞中で多く、miPS 細胞から miPS-LLCcmP 細胞への PI 比の 増加は癌幹細胞の誘導に関与している可能性も示唆された。



図. 3-1 3 細胞のグリセロリン脂質構成比。PC: Phosphatidylcholine, PE: Phosphatidylethanolamine, PS: Phosphatidylserine, PI: Phoshatidylinositol, LPC: Lysophosphatidylcholine, LPE: Lysophosphatidylethanolamine,

LPS: Lysophosphatidylserine, LPI: Lysophoshatidylinositol.

第4節 ルイス肺がん細胞によるプロスタグランジン E2 産生

炎症に関与している主要なプロスタグランジン候補はプロスタグランジン E2(PGE2) であり、効率良く miPS 細胞をがん幹細胞に誘導する LLC 細胞の培養上清 (CM)中 の PGE2 量を ELISA により定量した。その結果、LLC 細胞は 16.9 ng/mL の PGE2 を 産生しており、miPS 細胞の産生量 0.5 ng/mL より高かった。miPS-LLCcmP 細胞は 4.9 ng/mL の PGE2 を産生し、PGE2 産生能を得た可能性が示唆された (図. 3-2)。

さらに、アラキドン酸とグリセロールもエステル結合を切断するために PI を消化す る細胞質型ホスホリパーゼ (cPLA2)、アラキドン酸の C8-12 の環化を触媒するシク ロオキシゲナーゼ-2 (COX-2)、及びプロスタグランジン E 合成酵素 (PGES)1 の発 現を real-time qPCR により調べた。その結果、LLC 細胞では、miPS 細胞に比べて cPLA2、COX-2、及び PGES1 がそれぞれ 50、11、及び 8 倍と多く発現していた。一方、 miPS-LLCcmP 細胞では miPS 細胞とほとんど同様であった (図. 3-3)。これらの real-time-qPCR の結果は、cPLA2 及び COX-2 のウエスタンブロットの結果と一致し た (図. 3-4)。

miPS 細胞において、PGE2 刺激により細胞質シグナル伝達の活性化を検討するために PGE2 受容体の発現を調べた。PGE2 受容体の中でがんに密接に関与する EP-2 及び EP-4 の発現を調べた結果、miPS 細胞中での発現は、miPS-LLCcmP 細胞及 び LLC 細胞と同様であることがわかった(図. 3-5)。

PI3K/Akt シグナル伝達は、PGE2 によって G タンパク質共役型受容体(GPCR)の サブタイプである EP-2 及び EP-4 を介して活性化されることが報告されている[2022]。そこで、miPS 細胞中での PGE2 刺激による Akt のリン酸化を調べた結果、PGE2 10 ng/mL による Akt のリン酸化は、時間経過とともに増加し、PGE2 刺激後 60 分で 最大となった(図. 3-6)。miPS 細胞から miPS-LLCcm 細胞へ誘導される際に使用し ている LLC 細胞の培養上清中の約 20 ng/mL であり、miPS 細胞の培養には培地で 2 倍希釈して使用して 10 ng/mL となる。このことから LLC 細胞の培養上清は miPS 細胞を刺激する効果を有すると考えられた。

一方で、ロイコトリエン B4 (LTB4)も生体内でアラキドン酸より合成され、PGE2 の ように炎症性のエイコサノイドとして知られている。合成に関与する酵素としては、ア ラキドン酸-5-リポキシゲナーゼ (Alox-5)及びロイコトリエン A4 ヒドロラーゼ (LTA4h) がある。LTB4 はがんと密接に関与しており、3 細胞中でのこれらの 2 つの酵素の発 現を real-time-qPCR によって調べた[19]。しかしながら、LLC 細胞での Alox-5 の発 現は検出できず、LTA4hは検出できたが、LTB4 の合成はできない可能性が示唆され た(図. 3-7)。さらに、LLC 細胞の培養液中の LTB4 を ELISA により定量した結果、1 pg/mL 以下で検出限界以下であった(図. 3-8)。これらの結果を考慮して、miPS 細胞 よりがん幹細胞への誘導に関与する候補因子として、PGE2 が考えられた。なお、 LLC 細胞由来の細胞外小胞中の PGE2 は、培養上清を 2000 倍濃縮して得られた細 胞外小胞にも関わらず、ほとんど検出されなかった(図. 3-9)。このことから、PGE2 は 細胞外小胞とは無関係に培養上清中に放出されているものが細胞刺激に関与する ことが示唆された。ちなみに、3 細胞の中で miPS 細胞由来の細胞外小胞中には PGE2 受容体である EP-4 が検出できなかった(図.3-10)。このことは、miPS 細胞由 来の細胞外小胞中には CD63 が検出されないことと相関があるのかもしれない。



図. 3-2 3細胞の培養上清に含まれる PGE2 量の ELISA による比較。***p<0.01



図. 3-3 real-time qPCR による PGE2 合成関連遺伝子の相対的発現比較。miPS 細胞の各遺伝子の発現レベルを1として比較した。*p<0.1、**p<0.05、***p<0.01



図. 3-4 ウエスタンブロット法による cPLA2 及び COX-2 発現の比較。ウエスタンブロット画像 (左)。ImageJ による定量的デンシトメトリー分析 (右)。****p*<0.01



図. 3-5 3 細胞による EP-2 及び EP-4 発現の比較。ウエスタンブロット画像 (左)。 ImageJ による定量的デンシトメトリー分析 (右)。



図.3-6 miPS細胞中でのAktのリン酸化の経時変化。ウエスタンブロット画像(左)。 ImageJによる定量的デンシトメトリー分析(右)。**p<0.05、***p<0.01



図. 3-7 real-time-qPCR による LTB4 合成関連遺伝子の相対的発現比較。miPS 細胞の各遺伝子の発現レベルを1として比較した。*p<0.1、**p<0.05、***p<0.01



図. 3-8 3細胞の培養上清に含まれる LTB4 量の ELISA による比較。*p<0.1



図. 3-9 LLC 細胞の培養上清 (CM)と細胞外小胞 (EVs)に含まれる PGE2 量の ELISA による比較。***p<0.01



図. 3-10 各細胞外小胞中の PGE2 受容体 EP-4 のウエスタンブロット。

第5節 本章まとめ

本章では、3細胞のグリセロリン脂質解析より以下のような結果を得た。

- LLC 細胞及び miPS-LLCcmP 細胞中では、miPS 細胞に比べてホスファチジルイノ シトール (PI)が多い。
- それぞれの培養上清を比較した結果、LLC 細胞は 16.9 ng/mL の PGE2 を産生しており、miPS 細胞の産生量 0.5ng/mL より高い。miPS-LLCcmP 細胞では 4.9 ng/mL の PGE2 が検出され、PGE2 産生能が亢進していた。
- 3. miPS 細胞は、PGE2 刺激により Akt のリン酸化が認められた。10 ng/mL PGE2 に より、Akt のリン酸化は、経時的に増加した。
- 4. miPS 細胞は、炎症性のエイコサノイドである PGE2 及び LTB4 を産生していない。
- 5. PGE2 は、LLC 細胞由来の細胞外小胞中では検出されず、培養上清中への分泌 は細胞外小胞に依存しないことが示唆された。

第4章 プロスタグランジン E2 による継続的刺激

第1節 緒言

第3章の結果より、プロスタグランジン E2 (PGE2)が miPS 細胞をがん幹細胞へ 誘導する候補因子として示唆された。本章では、PGE2 が、miPS 細胞をがん幹細胞 へ誘導する仮説について検証を行った。

第2節 実験手法

・PGE2 による miPS 細胞の継続的刺激

miPS 細胞をゼラチンコートの ¢ 6cm ディッシュにフィーダーレスで播種し LIF を含まな い miPS 培地で1 日間培養し、新しい miPS 培地に交換後、PGE2 を終濃度 10 ng/mL となるように添加した。その後、培地交換を毎日継続し、交換毎に PGE2 を終濃度 10 ng/mL となるように添加した。ディッシュ上に細胞がコンフルエントになると継代を行い、 新しいディッシュへ播種した。この操作を繰り返し、4 週間培養を継続した。ネガティブ コントロールとしては、LIF 及び PGE2 を含まない miPS 培地で miPS 細胞を培養した。 ポジティブコントロールとしては、LLC の培養上清 (Conditioned medium: CM)と miPS 培地を 1:1 (v/v)で混合した培地で miPS 細胞を培養した。

・フローサイトメトリー解析

細胞をゼラチンコートのφ6 cm ディッシュに播種し、3 日後にトリプシン処理により細胞を回収し、PBS(-)で3回洗浄した。PBS(-)に懸濁した細胞を Accuri C6 Plus フローサイトメーター (BD Bioscience)で解析し、散乱シグナルに基づく細胞破片及び凝集体のパターンを除去して FlowJo ソフトフェアにより解析した。

Sphere formation assay

細胞は φ 6 cm 低吸着 ディッシュ (Corning) で培養でした。培地は、NEAA、L-Glutamine、Pen/Strep、 2-mercaptoethanol、Insulin-transferrin-selenium-X を含む DMEM を無血清培地として使用した。細胞は 5×10⁴ cells/mL で播種し、3 日間培養 後、デジタルカメラを装着した倒立蛍光顕微鏡 (CKX41, Olympus)を用いて検鏡及び 撮影した。

Tube formation assay

12-well プレートの底に滅菌したカバーグラスを敷き、100 µL の Matrigel (Corning)を 添加し、37 ℃で 30 分間静置してゲル化させた。その後、細胞を 0.25 % トリプシンに より剥離し、EGM-2 培地 (ロンザジャパン)に懸濁し、ゲル化した Matrigel 上に2×10⁶ cells/well で播種した。37 ℃、5 % CO2 で 24 時間インキュベートし、形成された管腔 構造を、倒立蛍光顕微鏡 (CKX41, Olympus)を用いて撮影した。得られた画像より、 ImageJ による分岐点を解析した。

第3節 プロスタグランジン E2 によるがん幹細胞誘導の検討

miPS 細胞を未分化維持に必要な LIF を含まず、PGE2 10 ng/mL 存在下で 4 週間 培養した結果、miPS 細胞は、LLC 細胞の培養上清 (CM)存在下で培養した細胞と 同様に生存した。一方、LIF 及び PGE2 非存在下での培養では 2 週間以内に細胞が 分化し増殖が止まり、その後死滅した (図. 4-1)。PGE2 存在下で得られた細胞を miPS-PGE2 細胞とした。この細胞は、miPS-LLCcm 細胞と同様に、未分化の状態で あることを示す Nanog プロモーターの制御下にある GFP の発現を維持していた[2]。

フローサイトメトリー解析では、接着培養条件で miPS-PGE2 細胞での GFP⁺細胞 の割合は 68 %であった。miPS-LLCcm 細胞でこの割合は 48 %であり、miPS-PGE2 細 胞は、miPS-LLCcm 細胞と同様に分化細胞と未分化細胞の混合状態であると推定さ れた (図. 4-2)。また、miPS-PGE2 細胞は幹細胞マーカーCD44 及び CD133 を発現し ていた (図. 4-3)。

Sphere formation assay は、成体幹細胞の研究において機能的アプローチとして、 最初に行われてきたが、がん幹細胞においても幹細胞の自己複製能を評価する上で も広く行われてきた[23-26]。低吸着性の培養ディッシュで sphere formation assay を 行うことにより miPS-PGE2 細胞のスフィア形成能を調べた結果、無血清条件下にお いて GFPを発現しながらスフェアを形成し、miPS-LLCcm 細胞と同様に自己複製能を 持つことが示された(図. 4-4)。

miPS-LLCcm 細胞で示された血管内皮細胞への分化能を、miPS-PGE2 細胞にお いてマトリゲル上での tube formation assay により評価した。その結果、miPS-PGE2 細胞は miPS-LLCcm 細胞と同様に管腔様構造を形成した。形成された管腔様構造 の分岐点で評価すると、miPS-PGE2 細胞は miPS-LLCcm 細胞より少なく血管新生能 は若干弱いと考えられる(図. 4-5)。



図. 4-1 miPS 細胞への 4 週間 PGE2 処理における形態の経時変化。LIF非存在下 で培養すると2 週間以内に miPS 細胞は死滅した。CM及び PGE2 を添加して培養す ると miPS 細胞は 4 週間後も生存した。CM: LLC 細胞の培養上清。PGE2: PGE2 10 ng/mL 添加。BF:明視野。GF:green fluoresce。スケールバー:50 μm



図. 4-2 GFP⁺細胞についてのフローサイトメトリー解析。miPS-PGE2 細胞は、miPS-LLCcm 細胞同様に未分化性の指標となるGFPを発現している。miPS 細胞は LIF 存 在下で培養したコントロール。



図. 4-3 real-time-qPCR によるがん幹細胞マーカーCD44 (左)及び CD133 (右)の 発現比較。miPS 細胞の各遺伝子の発現レベルを 1 として比較した。**p<0.05、*** p<0.01



図. 4-4 miPS 細胞、miPS-LLCcm 細胞及び miPS-PGE2 細胞のスフィア形成。 BF:明視野。GFP:green fluorescence。スケールバー= 200 µm





図. 4-5 miPS-LLCcm 細胞及び miPS-PGE2 細胞の管腔様構造形成能評価。 miPS-PGE2 細胞は、マトリゲル上で管腔様構造を形成する。顕微鏡写真、スケール バー=200 µm (上)。ImageJ による分岐点解析 (下)。****p*<0.01

第4節 本章のまとめ

本章では、以下のような結論を得ることができた。

- 1. miPS 細胞を、LIF 非存在下、PGE2 10 ng/mL 存在下で4週間培養した結果、LLC 細胞の培養上清存在下で培養した場合と同様、自律的に生存し継代可能な性質 を獲得した(miPS-PGE2 細胞)。
- 2. miPS-PGE2 細胞は、がん幹細胞マーカーである CD44 及び CD133 を発現しており、自己複製能及び分化能を持っていた。

第5章 プロスタグランジン E2 により誘導された miPS-PGE2 細

胞の解析

第1節 緒言

第4章で、miPS 細胞は PGE2 存在下で4週間培養すると細胞が自律的に生存す る性質を獲得し、miPS-PGE2細胞が得られた。この細胞は、幹細胞の特性である自 己複製能及び分化能を有していた。本章では、この細胞の解析をさらに進め悪性腫 瘍形成能などにより、がん幹細胞としての検証を行った。

第2節 実験手法

・ヌードマウスへの細胞移植

ヌードマウス Balb/c Slc-nu/nu、雌、5 週齡 (日本 SLC)の背側皮下に 1×10⁶ 個の 細胞を移植した。経時的に腫瘍の長径と短径を測定し、腫瘍体積は長径×短径 ²× 1/2 により算出した。本実験は岡山大学動物実験委員会の許可 OKU-2019496 及び OKU-2020382 を得て、そのガイドラインに従って行った。

·組織切片作製

形成した腫瘍を摘出し、10 % ホルムアルデヒド溶液 (WAKO Fujifilm)で固定した。その後、キシレンによる脱水及びパラフィン包埋を行ってミクロトーム RM2255 (LEICA) で 5 μm 厚に薄切し、切片をスライドガラス上で 5 % ヘマトキシリン・5 % エオジン (H.E.)溶液 (WAKO Fujifilm)で染色した。H.E.染色組織標本はデジタルカメラを装着した倒立蛍光顕微鏡 (CKX41, Olympus)を用いて観察し写真を撮影した。

・Sphere Formation assay 及び Extreme Limiting Dilution Analysis

スフィア形成は 1×10⁵ 個の細胞を¢6 cm 低吸着ディッシュ (Corning)に播種し、無 血清培地 (DMEM、NEAA、L-Glutamine、Pen/Strep、 2-mercaptoethanol、Insulintransferrin-selenium-X)で培養して観察した。Extreme Limiting Dilution Analysis (ELDA)は低吸着 96 ウェルプレート(IWAKI)に細胞を 1~200 個/well の範囲で播き、 培養 5 日後にスフェア形成の有無を確認した。解析は Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research (オーストラリア)のウェブサイトに公開されているソフトフェア <http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/index.html>を用いた[27]。

Tube formation assay

12-well プレートの底に滅菌したカバーグラスを入れ敷き、100 µL の Matrigel (Corning) を添加し、37 ℃、で 30 分間静置してインキュベートを行い、ゲル化させた。その後、 miPS-PGE2 細胞を 0.25 % トリプシンにより剥離し、EGM-2 培地 (ロンザジャパン)に 懸濁し、ゲル化した Matrigel 上に 2×10⁶ cells/well で播種した。37 ℃、5 % CO2 で 24 時間インキュベートし、形成された管腔構造を、倒立蛍光顕微鏡デジタルカメラ (CKX41, Olympus)を用いて撮影した。得られた画像より、ImageJ による分岐点を解 析した。

·免疫蛍光染色

Tube formation assay の撮影の後、3.7 % ホルムアルデヒドで細胞を固定化し、0.05 % Tween20 含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS-T)で処理後、ブロッキング溶液の 10% ウシ胎児血清 (FBS)含有 PBS(-)を加え、ブロッキング処理を行った。その後、一次抗 体 rabbit anti-CD31 primary antibody (Abcam)及び二次抗体 Alexa fluor 555 conjugated goat anti rabbit IgG secondary antibody (Invitrogen) で染色を行い、4'6diamidino-2-phenylindole (DAPI)含有 Vectashield 封入剤 (Vector)を用いて封入し、 デジタルカメラを装着した倒立蛍光顕微鏡 (CKX41 及び IX70, Olympus)を用いて検 鏡及び撮影を行った。

・RNA シーケンシングとバイオインフォマティクス解析

150-bp ペアシーケンシングを Novaseq6000 (Illumina)により行った (Veritas company)。 RNA-seq データは、Galaxy platform <usegalaxy.org>を使用してさらに解析した。 Tophat、Cuffquant、及び Cuffnrorm ツールを使用して、マッピング、定量及び発現量 の標準化を行った。Cuffdiff ツールで発現遺伝子の差異を特定し、Database for Annotation45, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) <http://david.ncifcrf.gov>に対して Kyoto Encyclopaedia of Gene and Genome (KEGG) pathway enrichment analysis を行った。The integrated Differential Expression and Pathway analysis (iDEP) <http://bioinformatics.sdstate.edu/idep93/>を用いてヒート マップの作成及び Parametric Gene Set Enrichment Analysis (PGSEA) <Bioconductor - PGSEA (riken.jp)>を行った。

第3節 がん幹細胞性の検討

miPS-PGE2 細胞をヌードマウスへ皮下移植すると、腫瘍を形成した(図.5-1)。 miPS-PGE2 細胞の腫瘍の成長速度は、miPS 細胞、及び miPS-LLCcm 細胞が形成 する腫瘍の成長速度に比べて著しく早かった(図.5-1)。miPS 細胞由来の腫瘍は組 織学的に良性の奇形腫で、悪性を示す所見はなかった(図.5-2)。miPS-PGE2 細胞 由来の腫瘍では、高頻度で有糸分裂像及び高度の核異型が認められ、miPS-LLCcm 細胞由来の悪性腫瘍の特徴に似ており悪性と判断した(図.5-3)[3]。したが って、miPS-PGE2 細胞は自己複製能、分化能及び悪性の造腫瘍能を有するがん幹 細胞と結論できた。

miPS-PGE2 細胞が形成した腫瘍の初代培養から得られた細胞は miPS-LLCcmP 細胞と同様に、接着培養ディッシュ上でコロニー形成及び増殖した。この細胞を新た に miPS-PGE2P 細胞と名付けた (図.5-4)。

miPS-PGE2P 細胞は GFP 発現を維持しており、そのGFPは皮下投与した miPS-PGE2 細胞由来のものであり、接着培養において GFP⁺細胞とGFP⁻細胞の 2 つの異 なる細胞種が観察され、それらは miPS-PGE2 細胞同様、未分化及び分化した細胞と 考えられる。したがって、線維芽細胞様の形態を示すGFP⁻細胞は、幹細胞性の GFP⁺細胞の微小環境を形成していると考えられた[2]。

miPS-PGE2P 細胞は、幹細胞マーカーNanog、Oct3/4 及び SOX2 の発現を維持していた(図.5-5)。一方、KLF4 は miPS-LLCcmP 細胞と同様に有意な低下が認められた。がん幹細胞マーカーCD44 の発現は miPS-LLCcmP 細胞と同様に、miPS 細胞よりも有意に高い発現が認められたが、CD133 については陽性ではあるものの miPS 細胞よりも低かった(図.5-6)。

miPS-PGE2P 細胞は無血清条件下でスフェアを形成した(図.5-7)。ELDA による評価では、miPS-PGE2P 細胞は miPS-LLCcmP 細胞よりもスフェア形成能が高い(図.5-8)。

miPS-PGE2P 細胞の血管内皮細胞への分化能をマトリゲル上での管腔様構造の 形成能により評価した。その結果、miPS-PGE2P 細胞は、miPS-PGE2 細胞及び miPS-LLCcmP 細胞と同様に分化能を維持していた。一方、管腔様構造の分岐点数 による評価では、miPS-PGE2P 細胞では miPS-LLCcmP 細胞に比べて少なかった (図. 5-9)。また、血管内皮細胞のマーカーである CD31 についての免疫蛍光染色に より分化能を調べた結果、miPS-PGE2P 細胞は、CD31⁺/GFP⁻(赤)、CD31⁻/GFP⁺ (緑)、CD31⁺/GFP⁺(黄)といった異なる亜集団を示した(図 5-10)。これは、腫瘍血 管新生が、がん幹細胞が、未分化な表現型(緑)から経過的段階(黄)を経由して成 熟分化した表現型(赤)へと変化する過程が同時に存在することを示している。すな わち、それは腫瘍組織中において観察される不均一性を部分的に説明していると考 えられる。miPS-PGE2P 細胞をさらにマウスへ移植して形成された二次腫瘍は、周辺 組織である筋層への浸潤及び高有糸分裂像及び高度の核異型が観察された(図. 5-11)。この miPS-PGE2P 細胞由来の腫瘍の免疫組織染色においては、抗 Ki67、抗 CD44 及び抗 E-cadherin 抗体で強く染色され、これらはがん幹細胞に由来する不均 ーな細胞種の存在と同様に高い増殖性をも示している。一方、miPS 細胞由来の奇形 腫ではこれらの免疫染色は見られない(図.5-12)。



図. 5-1 miPS-PGE2 細胞の腫瘍形成能評価。腫瘍体積の経時変化(左)。miPS-PGE2 細胞をヌードマウスへ皮下移植して形成された腫瘍(右)。スケールバー:5mm(右)。成長速度は miPS-LLCcm 細胞よりも早い。**p<0.05



図. 5-2 miPS 細胞由来奇形腫の代表的な HE 染色画像。miPS 細胞を皮下投与して から 4 週間後の奇形腫の 2 つの異なる視野。扁平上皮、骨格筋、軟骨組織、及び良 性な腺上皮を含む様々な正常な胚葉の表現型を示す。スケールバー: 64 μm



図. 5-3 miPS-PGE2 細胞由来の腫瘍の HE 染色画像。右は左視野の選択部位の拡 大。スケールバー:307 µm (左)、64 µm (右)。*:重度の核異型。矢印:軽度の核異 型。



図. 5-4 miPS 細胞、miPS-LLCcm 細胞及び miPS-PGE2 細胞由来の初代培養細胞 の接着培養。miPS-PGE2P 細胞は、未分化性 (GFP 陽性)を維持しながらコロニーを 形成して増殖する。BF:明視野。GFP:green fluorescence protein の蛍光。スケール バー:100 μm

図. 5-5 未分化マーカーの real-time-qPCR による発現比較。miPS 細胞の各遺伝子の発現レベルを1として比較した。miPS-PGE2P 細胞は、未分化マーカーである Nanog、Oct3/4、及び Sox2 を miPS 細胞と同様に発現維持している。Klf4 については、 miPS-LLCcmP 細胞と同様に発現低下している。**p*<0.1、***p*<0.05、****p*<0.01

図. 5-6 がん幹細胞マーカーの real-time-qPCR による発現比較。miPS 細胞の各遺 伝子の発現レベルを1として比較した。miPS-PGE2P 細胞は、がん幹細胞マーカーで ある CD44 の発現が miPS 細胞に比べて顕著に上昇している。**p<0.05、***p< 0.01

図.5-7 miPS 細胞、miPS-LLCcmP 細胞及び miPS-PGE2P 細胞のスフェア形成の比較。非接着条件における各細胞のスフェア。miPS-PGE2P 細胞は、スフェアを形成する。BF:明視野、GFP:green fluorescence、スケールバー=100 µm

図.5-8 ELDA による miPS 細胞、miPS-LLCcmP 細胞及び miPS-PGE2P 細胞のスフ ェア形成能の比較評価。緑:miPS 細胞。黒:miPS-LLCcmP 細胞。赤:miPS-PGE2P 細胞。miPS-PGE2P 細胞のスフェア形成能は、miPS-LLCcmP 細胞と比べてほぼ同 等である。

図. 5-9 miPS 細胞、miPS-LLCcmP 細胞及び miPS-PGE2P 細胞の Tube formation assay。miPS-PGE2P細胞はマトリゲル上で管腔様構造を形成する血。上段:顕微鏡 写真。スケールバー:200 µm。下段:ImageJ により解析した分岐点数の比較。****p*< 0.01

図. 5-10 マトリゲル上に形成された管腔様構造の免疫蛍光染色。図.5-9 で形成され た管腔様構造に対して免疫蛍光染色を行った。BF:明視野。DAPI:核染色。GFP: green fluorescence protein の蛍光。CD31:抗 CD31 抗体を一次抗体、二次抗体に Alexa fluor 555 標識抗体を用いて染色。Merge:GFP 画像とCD31 画像を重ね合わせ。 スケールバー:50 µm (上段)、10 µm (下段)。miPS-PGE2P細胞は、miPS-LLCcmP 細胞同様に血管内皮細胞マーカーである CD31 を発現して血管内皮細胞に分化して いる。

図.5-11 miPS-PGE2P 細胞由来の腫瘍の HE 染色画像。矢印:周辺組織への浸潤。
 *:重度の核異型。矢頭:ネクローシス。スケールバー:100 µm(左)、50 µm(右)。
 miPS-PGE2P細胞より形成された腫瘍は、周辺組織への浸潤や、重度の核異型の細胞が観察されるため悪性腫瘍と判定した。

図. 5-12 miPS-PGE2P 細胞由来腫瘍の免疫組織染色。腫瘍切片を E-カドヘリン (上段)、Ki67 (中段)、及び CD44 (下段)に対する抗体で染色。miPS 細胞由来の奇 形腫 (左カラム)、miPS-PGE2P 細胞由来の悪性腫瘍 (右カラム)。スケールバー:64 µm。miPS-PGE2P 細胞由来の腫瘍組織では、miPS 細胞由来の良性テラトーマと比較して、E-カドヘリン、Ki67、及び CD44 が強く染色された。

第4節 Akt の恒常的活性化の検討

以前、我々の研究室では miPS-LLCcm 細胞中で PI3K/Akt シグナル経路が活性 化されていることを報告した[5]。この情報に基づき、私は miPS-PGE2 細胞中の PI3K/Akt シグナル経路の活性化を調べた。real-time-qPCR の結果、Pik3cg の発現 が、miPS-LLCcm 細胞中と同様に miPS 細胞に比べて miPS-PGE2 細胞でも有意に 上昇していることがわかった(図. 5-13)。PI3K/Akt シグナル経路の活性化に関して、 ウエスタンブロットにより Akt のリン酸化を調べると、LIF を添加しない条件で培養した miPS 細胞に比べて、miPS-LLCcm 細胞と同様に、miPS-PGE2 細胞でも恒常的にAkt が強くリン酸化されていた(図. 5-14)。

PI3K のうち、Pik3ca 遺伝子の変異がヒトがんで頻見されることが報告されている [15]。ヒトがんにおいて、遺伝子の変異は主に3つが報告されており、これらは542残 基目のグルタミン酸がリジンへ、545 残基目のグルタミン酸がリジンへ、1047 残基目 のヒスチジンがアルギニンへ変異する。しかし、RNA シーケンス解析により得られた cDNA の塩基配列からは、miPS-PGE2P 細胞において上記3 カ所での Pik3ca 遺伝 子の変異は無かった(図.5-15)。従って、PI3K の自律的な活性化は否定的であるた め、脂質代謝により生じるホスファチジルイノシトール3,4,5 リン酸(PIP3)が発がんに 向けた PI3K/Akt シグナル経路を活性化していると考えられる[28,29]。

ー方で、ホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸(PIP3)の分解酵素の1つであるPTEN(phosphatase and tensin homolog)は、PI3K/Aktシグナル経路を負に制御するため、PTENはがん抑制遺伝子として考えられている。ヒトがんにおいて、PTEN遺伝子の変異は主に3つが報告されており、130残基目のアルギニンがロイシンへ、173残基目のアルギニンがシステインへ、233残基目のアルギニンが他のアミノ酸残基へ変異する[30-32]。この情報に基づき、RNAシーケンス解析によりPTENの発現及び cDNA 配列を調べた結果、PTENの発現は miPS 細胞に比べて miPS-PGE2P 細胞で低かった(図.5-13)。また、miPS-PGE2P 細胞において、PTEN 遺伝子中で主に報告されている3カ所について cDNA 中には変異が認められなかった(図.5-15)。

これらのことから、miPS-PGE2P 細胞では PTEN の発現減衰と Pik3cg の発現上昇 とが相乗して、PI3K/Akt シグナルが誘起されやすい状態を生み出しており、自己複 製における脂質代謝で生じる PIP3 が autocrine に細胞を刺激している可能性が示唆 される。

41

図 5-13. real-time qPCR による PI3K 関連遺伝子の発現解析。 miPS 細胞の各遺伝子の発現レベルを1として比較した。miPS-PGE2 細胞及び miPS-PGE2P 細胞では、miPS 細胞に比べて Pik3cg の発現が上昇している。一方、miPS-PGE2P 細胞では、miPS 細胞に比べて PTEN の発現が低下している。 *p<0.1、**p<0.05、***p<0.01

図. 5-14 Akt のリン酸化のウエスタンブロット解析。miPS 細胞から誘導直後の各細胞(左)。miPS-LLCcm 細胞及び腫瘍由来の初代培養細胞(右)。miPS-PGE2 細胞 及び miPS-PGE2P細胞では、miPS 細胞(LIF 非存在下)に比べてAktがリン酸化さ れている。

図. 5-15 miPS-PGE2P 細胞の Pik3ca 及び PTEN 遺伝子における発がん性変異の DNA 配列スポットの解析。各塩基配列の枠で囲まれた部分で示された各コドン(最 上段配列中の赤字部分)が突然変異で発がん性となる。miPS-PGE2P 細胞では、突 然変異は見られない。

第5節 がん幹細胞性維持における PGE2 依存性の検討

miPS-PGE2 細胞の腫瘍由来の初代培養細胞である miPS-PGE2P 細胞のがん幹 細胞性は PGE2 依存的か否かについて検討した。まず初めに、miPS-PGE2P 細胞を PGE2 存在下もしくは非存在下で 2 週間培養した。その結果、miPS-PGE2P 細胞は、 PGE2 非依存的に接着条件で増殖し、スフェア形成能を維持し且つ血管内皮細胞へ の分化能を示した(図. 5-16、17、18)。miPS-PGE2P 細胞の Akt のリン酸化につい ても PGE2 依存性を調べた結果、Akt のリン酸化 PGE2 に依存していなかった(図.5-19)。従って、miPS-PGE2P 細胞は、PGE2 非依存的にがん幹細胞の性質を維持して いた。そこで、miPS-PGE2P 細胞が PGE2 を分泌して PGE2 が autocrine に作用して いる可能性を検討した。

miPS-PGE2 細胞及び miPS-PGE2P 細胞の培地中の PGE2 産生量を ELISA によって調べた結果、両細胞の培養液中の PGE2 濃度は約 0.3 ng/mL と miPS 細胞の培 養液中と同レベルに低かった(図.5-20)。LLC 細胞の培養液中には PGE2 が約 17 ng/mL であることから、miPS-PGE2P 細胞が産生する PGE2 は、LLC 細胞の 50~60 倍少ない。以上の結果より、miPS-PGE2P 細胞は、PGE2 非依存的にがん幹細胞の 性質を維持していると考えられた。

図.5-16 PGE2存在・非存在下での miPS-PGE2P細胞。接着条件での培養(左)。 非接着条件でのスフェア形成(右)。BF:明視野。GFP:green fluorescent proteinの 蛍光。スケールバー:100 μm。miPS-PGE2P細胞は、PGE2の有無に関わらず、接着 培養でコロニーを形成し、非接着培養でスフェアを形成した。

図. 5-17 miPS-PGE2P 細胞の PGE2 存在・非存在下での Tube formation assay。顕 微鏡写真(左)。スケールバー: 200 µm。 ImageJ による分岐点解析(右)。 miPS-PGE2P細胞は、PGE2 の有無に関わらず、管腔様構造を形成した。

図. 5-18 miPS-PGE2P 細胞の PGE2 存在・非存在下でマトリゲル上に形成された 管腔様構造の免疫蛍光法による解析。図 5-17 で形成された管腔様構造を免疫蛍光 染色した。BF:明視野。DAPI:核染色。GFP:green fluorescence protein の蛍光。 CD31:抗 CD31 抗体を一次抗体、二次抗体に Alexa fluor 555 標識抗体を用いて染 色。Merge:GFP 画像と CD31 画像を重ね合わせ。スケールバー:50 µm (上段)、10 µm (下段)。miPS-PGE2P細胞は、PGE2 の有無に関わらず、血管内皮細胞に分化 する。

10 µm

図 5-19. miPS-PGE2P 細胞の PGE2 存在・非存在下における Akt のリン酸化のウエスタンブロット解析。ウエスタンブロット画像 (左)。ImageJ による定量的デンシトメトリー分析 (右)。*p<0.1、**p<0.05、***p<0.01。miPS-PGE2P細胞では、PGE2 非依存的、Akt が恒常的にリン酸化している。

図 5-20. miPS-PGE2 細胞及び miPS-PGE2P 細胞の PGE2 産生量の ELISA による 検討。***p<0.01。

第6節 トランスクリプトームの in silico 解析

miPS 細胞、miPS-PGE2 細胞、及び miPS-PGE2P 細胞からの RNA を RNA-seq 解 析にかけ、iDEP を使用してヒートマップとして遺伝子発現プロファイルを比較した(図. 5-21)。また、Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes (KEGG) パスウェイ解析を行 った結果、miPS-PGE2 細胞及び miPS-PGE2P 細胞で増強された経路の上位に、が ん、幹細胞、及び細胞間もしくは細胞とマトリックスの相互作用に関与するものが候 補として上がってきた(図. 5-22)。The Parametric Gene Set Enrichment Analysis (PGSEA)により候補として上がってきた KEGG passway として、miPS 細胞と比較して miPS-PGE2 細胞及び miPS-PGE2P 細胞で共に活性化されたものは以下の通りであ る(図. 5-22)。

- mmu05200 : Pathways in cancer
- mmu04510 : Focal adhesion
- mmu04390 : Hippo signaling pathway
- mmu04512 : ECM-receptor interaction
- mmu04310 : Wnt signaling pathway
- mmu04151 : PI3K-Akt signaling pathway

これらは、がんとの関連が示唆され、これらのパスウェイに分類された遺伝子を選び出し、標準化された頻度を確認した。miPS 細胞に比べて、miPS-PGE2 細胞及び miPS-PGE2P 細胞の両方で頻度が上昇している遺伝子を選び出し、リストを作成した(表 5-1)。この表より、顕著に上昇している遺伝子として以下が挙げられる。

- コラーゲンタイプΙα1 (COL1A1)
- $\neg \neg \neg \neg \neg \neg \alpha 1$ (COL4A1)
- $\neg \neg \neg \neg \neg \neg \neg \alpha 2$ (COL4A2)
- フィラミンB(FLNB)
- GLI ファミリージンクフィンガー2 (GLI2)
- インスリン様成長因子1受容体(IGF1R)
- インテグリンサブユニットαV (ITGAV)
- ビンキュリン (VCL)

VCL はインテグリンとアクチンフィラメントの接合アダプターとされている[33]。 FLNB はアクチン結合タンパク質として知られている[34]。一方、コラーゲンは細胞外 マトリックス (ECM)を増強すると考えられる。特に、COL1A1 は生体内でがん関連線 維芽細胞に支持的な機能を果たしている可能性がある[35]。がん幹細胞は、インテグ リン分子を介して ECM とつながっている細胞骨格によって生存維持が強化されてい る可能性も考えられる。 これらの結果より、今回得られた miPS-PGE2 細胞は、生体内においてがん組織の 周辺環境である微小環境へも影響を及ぼし、がん組織を形成する能力を有するので はないかと考えられる。

図.5-21 トランスクリプトーム解析によるヒートマップ。miPS 細胞、miPS-PGE2 細胞、 miPS-PGE2P 細胞間での遺伝子発現プロファイル相関を示す。発現が高い遺伝子は 赤色、低い遺伝子は緑色、中間は黒色で示している。

miPS-PGE2 cells

図. 5-22 KEGG パスウェイ解析の結果。miPS 細胞に比べて miPS-PGE2 細胞および miPS-PGE2P 細胞で活性化しているパスウェイのうち、各細胞で上位 14 のパスウェ イを示した。横軸は p 値 (-log p)を表す。

| GENE NAME | mmu05200: Pathways in cancer | mmu04510: Focal adhesion | mmu04512: ECM- receptor interaction | mmu04151: PI3K-Akt signaling pathway | mmu04390: Hippo signaling pathway | mmu04310: Wnt signaling pathway | miPS | miPS-PGE2 | miPS-PGE2P |
|-----------|------------------------------------|--------------------------------|--|---|--|--|-------|-----------|------------|
| AXIN2 | | | | | x | x | 3.0 | 46.6 | 84.6 |
| BMPR2 | | | | X | | | 17.0 | 130.0 | 107.7 |
| CBL | X | | | | | | 4.0 | 112.1 | 68.8 |
| CCND2 | | х | | X | | х | 4.0 | 78.5 | 113.8 |
| CD44 | | | X | | | | 0.0 | 26.5 | 51.8 |
| CTGF | | | | X | | | 22.0 | 134.3 | 144.4 |
| CDKN2A | X | | | | | | 3.0 | 77.4 | 52.9 |
| COL1A1 | | х | x | | | | 0.0 | 192.8 | 395.7 |
| COL3A1 | | X | x | | | | 0.0 | 92.6 | 238.7 |
| COL4A1 | X | X | x | | | | 17.0 | 553.0 | 537.6 |
| COL4A2 | x | X | x | x | | | 3.0 | 336.3 | 328.0 |
| COL5A1 | | X | x | x | | | 8.0 | 177.6 | 363.3 |
| EFNB2 | | | | | | X | 9.0 | 135.4 | 115.2 |
| EPHA1 | | | | | | х | 7.0 | 37.4 | 91.8 |
| FGF5 | | | | x | | | 0.0 | 23.8 | 59.8 |
| FLNB | | х | | | | | 154.0 | 1675.1 | 1428.0 |
| FLNC | | X | | | | | 20.0 | 197.1 | 211.7 |
| FZD2 | | | | | X | | 4.0 | 62.3 | 63.0 |
| GLI2 | X | | | | X | | 114.0 | 1498.6 | 890.0 |
| IGF1R | X | х | | X | | | 22.0 | 285.4 | 177.1 |
| INSR | | | | X | | | 5.0 | 104.5 | 65.9 |
| ITGAV | X | х | X | X | | | 16.0 | 270.3 | 164.5 |
| JUN | | X | | | | х | 6.0 | 63.4 | 58.3 |
| LATS2 | | | | | X | | 1.0 | 93.2 | 52.6 |
| MMP2 | X | | | | | | 7.0 | 144.6 | 119.2 |
| PARVA | | X | | | | | 4.0 | 74.2 | 70.9 |
| PRICKLE1 | | | | | | X | 1.0 | 35.2 | 63.0 |
| PTCH1 | X | | | | | | 8.0 | 410.0 | 183.3 |
| SERPINE1 | | | | | X | | 1.0 | 47.1 | 72.0 |
| SFRP2 | | | | | | X | 2.0 | 46.6 | 31.0 |
| TGFB2 | X | | | | X | | 0.0 | 42.2 | 65.9 |
| THBS1 | | X | X | X | | | 0.0 | 130.0 | 303.2 |
| TNC | | | X | X | | | 0.0 | 36.8 | 250.2 |
| VCL | | X | | | | | 48.0 | 533.5 | 525.3 |
| WNT4 | x | | | | X | X | 1.0 | 53.1 | 50.0 |
| WNT5A | | | | | X | | 0.0 | 26.0 | 51.8 |
| ZYX | | X | | | | | 23.0 | 114.3 | 191.2 |
| GAPDH | | | | | | | 288.0 | 261.0 | 240.2 |

表 5-1. miPS-PGE2 細胞及び miPS-PGE2P 細胞の両方で発現が高い遺伝子のリスト。

第7節 本章のまとめ

本章では、以下のような結論を得ることができた。

- 1. miPS-PGE2 細胞は、ヌードマウスへ皮下移植すると悪性腫瘍を形成したことから、 前章の結果と合わせて、がん幹細胞と結論できる。
- 2. miPS-PGE2 細胞の腫瘍より得られた miPS-PGE2P 細胞は、幹細胞マーカーであ る Nanog、Oct3/4 及び SOX2 の発現を維持していた。
- 3. miPS-PGE2P 細胞は、自己増殖能、分化能、悪性腫瘍形成能を持ち、幹細胞マー カーの遺伝子発現を維持していることより、がん幹細胞の性質を持っている。
- miPS-PGE2P 細胞は、miPS-LLCcmP 細胞と同様に PI3K/Akt シグナル経路において Akt が恒常的にリン酸化されていた。PI3K/Akt シグナル経路の活性化に遺伝子変異が関与している可能性は低い。
- 5. miPS-PGE2P細胞は、PGE2非依存的にがん幹細胞の性質を維持している。
- トランスクリプトーム解析より、がんと関連性の高いパスウェイ中の遺伝子の高い 発現が見られ、PI3K/Aktシグナル伝達の活性化は in silico により支持される結果 となった。

第6章 考察と結論

第1節 考察

がんの発生のメカニズムはがんの予防及び治療の観点から重要な課題であるが、 まだ、論争が絶えない。慢性的な炎症は往々にしてがんの発症に結びついているとさ れる。また、慢性的な炎症は、特定のがんのリスクを高めると疑われてきた多くの原 因に起因する可能性がある。感染症は、多くの場合周囲の細胞に影響を与える炎症 を引き起こす。長期間、感染が続けば、炎症反応とそれによって傷害した組織の修復 が繰り返され、最終的にがんの発生につながると考えられる。膠原病、潰瘍性大腸炎、 I型糖尿病等のような自己免疫疾患もまた慢性炎症を引き起こす。肥満は、慢性炎 症を悪化させ、がんのリスクを高める腫瘍壊死因子 (TNF-α)、単球走化性促進因 子 (MCP-1)、インターロイキン-6 (IL-6)等のような炎症性因子の発現を伴い、脂肪 組織内に新生血管を形成している。睡眠の質の悪さ、過度のストレスのような他の要 因もまた活性酸素種 (ROS)などを介して慢性炎症に繋がる可能性もある。

炎症では、異物の侵入から生体を防御する免疫応答として、免疫細胞から発生す るROSや分泌されるインターロイキン、サイトカイン、ケモカインにより、組織が異物と 同時に傷害を受け、同時に周辺細胞から分泌される成長因子により修復が起こる。 この時の細胞の増殖に必要なエネルギー代謝として、糖代謝及び脂質代謝が伴うと、 一般的に考えられている。慢性の状態ではこの炎症反応が定常的に繰返される。柔 軟で感受性が高い分化能のある幹細胞や前駆細胞が、このような微小環境に長期 間暴露されると、慢性状態へ恒常性の維持がシフトし、がん化への変化をたどると考 えられる。したがって、炎症関連因子は、幹細胞をがん幹細胞へ誘導する因子として 捉えることが可能である。このような視点を重要な手がかりとして、がん化のメカニズ ムを解明できる可能性が高い。

本研究では、まず、細胞外小胞の microRNA に着目し、解析を行った結果、正常細胞に比べて、がん細胞で増加している microRNA が確認できた。 miPS 細胞に比べて、 特に顕著に増加している microRNA として、 mmu-miR-3075-5p、 mmu-miR-487b-3p、 mmu-miR-708-5P、及び mmu-miR-6945-5p があり、これらからがん幹細胞を誘導す る因子の手がかり求めようとしたが、 microRNA に対するアンチセンス鎖 RNA を用い たがん細胞の増殖抑制活性は確認できなかった。

そこで、細胞及び小胞に反映される細胞の脂質代謝に注目し、幹細胞及びがん幹細胞中のグリセロリン脂質の成分から、miPS-LLCcm細胞中の PS 及び PI の割合が miPS 細胞に比べて高いことが判った。このことは、脂質代謝と炎症と密接に関係する

アラキドン酸カスケードを関連付ける手がかりとなった。そこで、LLC 細胞の培養上清中に存在する PGE2 を調べると、PGE2 濃度は miPS 細胞の培養上清中に比べて有意に高いことを見出した。miPS 細胞は、G-タンパク質共役受容体ファミリーに属する PGE2 受容体の EP-2 及び EP-4 を発現しており、PGE2 刺激により miPS 細胞中で Akt がリン酸化されることも確認できた。

この受容体の内 EP-4 は、がん細胞由来の細胞外小胞にも存在していたことから、 LLC 細胞の培養上清から誘導されたがん幹細胞 miPS-LLCcm 細胞は、細胞外小胞 から miPS 細胞へ導入された EP-4 が PGE2 への感受性を高めた可能性が示唆され る。実際に、グリオーマが産生するマイクロベシクルには、発がん性のある上皮成長 因子受容体 vIII (EGFRvIII)が存在し、EGFRvIIIを発現していないがん細胞へもマイ クロベシクルを介してこの受容体を受渡し、がんの悪性化に関与していることが報告 されている[36]。しかしながら、この点については、PGE2 刺激のみで miPS 細胞が miPS-PGE2 細胞としてがん幹細胞化したことで、LLC 細胞由来細胞外小胞の EP-4 の関与を説明するには至らない。なお、PGE2 の存在は LLC 細胞由来細胞外小胞と 相関しないことから、細胞外小胞非依存的に生成していると考えられる。

さらに、LIF 非存在下に PGE2 を添加した培地で培養した miPS 細胞は 4 週間生存 した。通常、LIF 及び PGE2 をともに含まない培地では、miPS 細胞は 2 週間以内に死 滅することから、PGE2 存在下に得られた miPS-PGE2 細胞の性質をさらに検討する と、自己増殖能、幹細胞性、分化能、及び悪性腫瘍形成能といったがん幹細胞の性 質を示し、miPS 細胞からがん幹細胞が誘導されたと結論できた。

同時に、miPS-PGE2 細胞中では、Akt が恒常的に活性化されていた。PGE2 による EP-2/4 の継続的な刺激が、miPS 細胞からがん幹細胞への誘導中に、Akt の恒常的 活性化をもたらし、結果としてがん幹細胞化したと考えられる。

以前の研究で、我々のグループはエピジェネティックに Pik3r5 及び Pik3cg 遺伝子 の発現が亢進した miPS-LLCcm 細胞中で、Akt が恒常的に活性化されていることを 報告した[6]。本研究では、miPS-PGE2 細胞中でも、Pik3cg 遺伝子が過剰発現してい ることが示された。PI3K 関連遺伝子において、Pik3ca 遺伝子の発がん性突然変異が 知られているが、塩基配列の解析により、miPS-PGE2 細胞において、これらの変異 は無いことが確認された。一方、PIP3 の分解酵素の1つである PTEN は PI3K のシグ ナル伝達を抑制するがん抑制遺伝子として知られるが、変異による不活性で PI3K の 恒常的活性化をもたらす [28,29]が、同細胞においてこれを説明する変異も塩基配列 上には認められなかった。ただ、miPS-PGE2 細胞での PTEN の発現レベルは、miPS 細胞に比べて低いことから、miPS-PGE2 細胞では、Pik3cg 遺伝子の高発現が PTEN の抑制を上回り、PI3K/Akt シグナル伝達の優先的な活性化を促している可能性が考 えられた。そこで、miPS-PGE2 細胞での PI3K/Akt シグナル伝達の活性化は miPS-PGE2 細胞が PGE2 を自己分泌して、EP-2/4 を刺激することによりもたらされる可能 性を疑った。しかし、PGE2 は、miPS-PGE2 細胞の培養上清には検出されず、miPS-PGE2P 細胞は、PGE2 非依存的にがん幹細胞の性質を維持していた。したがって、 miPS-PGE2P 細胞中で PGE2 のオートクリンな作用は否定された。miPS 細胞への PGE2 の長期的な暴露は、PI3K を活性化する EP-2/4 受容体を継続的に刺激し続け た結果、miPS-PGE2 細胞中の Pik3cg 遺伝子の発現亢進をもたらす CpG アイランド の脱メチル化によるエピジェネティックな効果と想定することもできる。しかし、本研究 ではこの部分の解析は行っていない。これに関連し、DNA の脱メチル化のメカニズム について直接的な報告はまだ存在しない。

これらの状況を説明する鍵は、パスウェイ解析から得られている可能性もある。発 現が亢進しているコラーゲンに代表される ECM の増加に着目すれば、インテグリンを 介して focal adhesion を刺激し、例えば src のような新たな細胞内チロシンキナーゼを 活性化して、PI3K/Akt の活性化にクロストークで繋がっている可能性も考えられる。 また、パスウェイ解析は、PGE2 にさらされた細胞中では、1つのパスウェイだけでなく、 いくつかのパスウェイが増強されていることを示した。上述のパスウェイを含めて、異 なるパスウェイ間のクロストークが、iPS 細胞の幹細胞性の維持と悪性化の獲得とい った新しい細胞の表現型を獲得することへ繋がったとも考えられる。

発がんや幹細胞性の維持に作用することが良く知られているパスウェイが遺伝子 変異によってのみ増強されているだけでなく、正常幹細胞からがん幹細胞への変化 でエピジェネティックに発現上昇した特異的なパスウェイを示した PI3K/Akt パスウェ イは、細胞外マトリックスと相互作用する細胞骨格との関連に十分目を向ける必要が あるであろう[5]。

がん幹細胞の維持をサポートするソニックヘッジホッグ (Shh)シグナルのメディエ ーターとして知られる GLI2[37]、成長刺激に密接に関わる細胞質シグナルを活性化 するチロシンキナーゼである IGFR1[38]も注目に値し、バイオインフォマティクス解析 から、これらも顕著に発現上昇していることが示された。

これらを考慮すると、PGE2 の長期間暴露は、miPS 細胞から作製されたがん幹細 胞モデルは、慢性炎症とがんの発症とを結び付けて理解する上で役立つ情報を提供 すると考えられる。いずれにしても本研究の結果から、炎症関連因子 PGE2 は、幹細 胞もしくは前駆細胞の受容体を介して刺激することが可能で、がん発生へと誘導する 可能性が示されたと言える。

PGE2 は結腸直腸がん幹細胞の拡大や転移を促進することが報告されている[39]。 PGE2 の前駆体プロスタグランジン H2 は COX-1 および 2 によりアラキドン酸から生 成するが、COX-2 の過剰発現は結腸直腸がんを誘発することが知られている。一方、 COX-2 の選択的阻害剤であるアスピリンはがん抑制への有効性が期待されてきた [40]。アスピリンを投与した臨床例で、有意にがんが減少することも報告されている [41,42]。したがって、アスピリンが PGE2 の生成を抑制していることを考慮すると、 PGE2 によるがん幹細胞誘導が抑制される効果が、がん減少に繋がっている可能性 が示唆される。最後に、本研究により幹細胞からがん幹細胞を誘導する因子の 1 つ として、PGE2 を特定することができた。本研究は、細胞外小胞の解析から始めたが、 細胞外小胞に含まれるがん幹細胞を誘導する因子の特定には至らなかった。しかし、 正常細胞とがん細胞で microRNA 種が大きく変化することや、脂質組成についても変 化することを示すことができた。近年、がん細胞、免疫細胞、及び間葉系幹細胞由来 の多様な細胞外小胞が、病気の治療ために開発されている[43-45]ことを考慮すれ ば、本研究より得られた結果は、将来、細胞外小胞とがん幹細胞誘導の因果関係を 特定する鍵となるという可能性に期待したい。

第2節 結論

本研究では、miPS 細胞からがん幹細胞への誘導に関与する因子を明らかにすることを試みた。細胞外小胞の解析から始まり、培養上清組成の推定を経て最終的に以下の結論を得ることができた。

- miPS 細胞の細胞外小胞中に比べて、LLC 細胞の細胞外小胞で増加している microRNA が確認でき、特に顕著に増加している microRNA として、mmu-miR-3075-5p、mmu-miR-487b-3p、mmu-miR-708-5P、及びmmu-miR-6945-5pの4種 を見出した。
- 2. LLC 細胞由来の細胞外小胞は、miPS-LLCcm 細胞及び miPS 細胞に比べてホス ファチジルイノシトール (PI)が多く、細胞においても、LLC 細胞では、miPS 細胞に 比べてホスファチジルイノシトール (PI)が多いことが判った。
- 3. LLC 細胞は、16.9 ng/mL の PGE2 を産生しており、miPS 細胞の産生量 0.5 ng/mL を約 30 倍以上上まわり、miPS 細胞からがん幹細胞を誘導する候補因子として PGE2 が示唆された。
- 4. miPS 細胞は、LIF 非存在下、10 ng/mL PGE2 存在下で 4 週間培養した結果、LLC 細胞の培養上清 (CM)存在下で培養した細胞と同様に生存した (miPS-PGE2 細胞の取得)。

- 5. miPS-PGE2 細胞は、自己複製能、分化能を持ち、in vivo で悪性腫瘍を形成することよりがん幹細胞と判定した。また形成した腫瘍の初代培養細胞である miPS-PGE2P 細胞も同様にがん幹細胞の性質を持っていた。
- miPS-PGE2 細胞及び miPS-PGE2P 細胞は、既報の miPS-LLCcmP 細胞と同様に Akt が恒常的にリン酸化されており、PI3K/Akt シグナル経路の活性化が示された。 ただし、これに関連する顕著な遺伝子変異は認められなかった。
- 7. miPS-PGE2P細胞は、PGE2 非依存的にがん幹細胞の性質を維持していた。
- 8. トランスクリプトーム解析により、がんと関連性の高いパスウェイ中の遺伝子の発 現上昇が見られ、PI3K/Akt シグナル伝達の活性化を含めこれまでと一致する結 果が得られた。

以上のことから炎症関連因子プロスタグランジン E2 は、miPS 細胞をがん幹細胞へ誘 導する因子であると結論した。

参考文献

- Sung H, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 71 (3):209-249 (2021)
- Matsuda S, et al. Cancer stem cells maintain a hierarchy of differentiation by creating their niche. *Int J Cancer*.135 (1):27-36 (2014).
- 3. Chen L, et al. A model of cancer stem cells derived from mouse induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 7 (4):e33544 (2012).
- Yan T, et al. Characterization of cancer stem-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cells transformed by tumor-derived extracellular vesicles. *J Cancer*. 5 (7):572-584 (2014).
- Sheta M, et al. Chronic exposure to FGF2 converts iPSCs into cancer stem cells with an enhanced integrin/focal adhesion/PI3K/AKT axis. *Cancer Lett.* 521:142– 154 (2021).
- Oo AKK, et al. Up-regulation of PI 3-kinases and activation of PI3K-Akt signaling pathway in cancer stem-like cells through DNA hypomethylation mediated by the cancer microenvironment. *Transl Oncol.* 11 (3):653-663 (2018).
- Zhuang X. et al. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol. Ther*. 19, 1769–1779 (2011)
- 大野慎一郎,高梨正勝,黒田雅彦「エクソソームによる核酸 DDS の開発」 Drug Delivery System. 29-2, 134-139 (2014)
- Tominaga N, et al. Brain metastatic cancer cells release microRNA-181ccontaining extracellular vesicles capable of destructing blood -brain barrier. *Nat Commun.* 6:6716 (2015).
- Parolini I, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. J Biol Chem. 284, 34211-34222 (2009)
- Imae R, et al. LYCAT, a homologue of C. elegans acl-8, acl-9, and acl-10, determines the fatty acid composition of phosphatidylinositol in mice. *J Lipid Res.* 53:335-347 (2012).
- Baba T, et al. Phosphatidic acid (PA)-preferring phospholipase A1 regulates mitochondrial dynamics. *J Biol Chem.* 289:11497-11511 (2014).
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 37 (8):911–917 (1959).
- Kielkowska A. et al. A new approach to measuring phosphoinositides in cells by mass spectrometry. *Adv Biol Regul.* 54:131–141 (2014).

- Hilvo M, et al. Novel Theranostic Opportunities Offered by Characterization of Altered Membrane Lipid Metabolism in Breast Cancer Progression. *Cancer Res.* 71 (9):3236-3245 (2011).
- Samuels Y, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 304;554 (2004).
- Baker R.R, Thompson W. Positional distribution and turnover of fatty acids in phosphatidic acid, phosphinositides, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in rat brain in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.* 270 (4):489–503 (1972).
- Holub B.J, Kuksis A. Structural and metabolic interrelationships among glycerophosphatides of rat liver in vivo. *Can J Biochem*. 49 (12):1347–1356 (1971).
- Gomes RN, Costa SF, Colquhoun A. Eicosanoids and cancer. *Clinics* (Sao Paulo).
 73 (suppl 1):e530s (2018)
- George RJ, Sturmoski MA, Anant S, Houchen CW. EP4 mediates PGE2 dependent cell survival through the PI3 kinase/AKT pathway. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 83 (1-2):112-120 (2007).
- Xu S, Zhou W, Ge J, Zhang, Z. Prostaglandin E2 receptor EP4 is involved in the cell growth and invasion of prostate cancer via the cAMP-PKA/PI3K-Akt signaling pathway. *Mol Med Rep.* 17 (3):4702–4712 (2018).
- 22. Sun X, Li Q. Prostaglandin EP2 receptor: Novel therapeutic target for human cancers (Review). *Int J Mol Med.* 42 (3):1203-1214 (2018).
- Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. Eyes wide open: a critical review of sphereformation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell*. 8 (5):486–498 (2011).
- Zhang Y, et al. NOTCH1 signaling regulates self-renewal and platinum Chemoresistance of Cancer stem-like cells in human non-small cell lung Cancer. *Cancer Res.* 77:3082-3091 (2017).
- Pointer KB, Clark PA, Eliceiri KW, Salamat MS, Robertson GA, Kuo JS. Administration of non-Torsadogenic human ether-a-go-go-related gene inhibitors is associated with better survival for high hERG-expressing glioblastoma patients. *Clin Cancer Res.* 2017 23 (1):73-80 (2017).
- Ioris RM, et al. SIRT6 suppresses cancer stem-like capacity in tumors with PI3K activation independently of its deacetylase activity. *Cell Rep.* 18:1858-1868 (2017).
- Hu Y, Smyth GK. ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J Immunol Methods*. 347 (1-2):70-78 (2009).
- Chang L, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the treatment of prostate cancer radioresistance. *Crit Rev Oncol Hematol.* 96 (3):507–517 (2015).

- Papadimitrakopoulou V. Development of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and their application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 7 (8):1315–1326 (2012).
- Rasheed BK, et al. PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in lowgrade gliomas. *Cancer Res.* 57 (19):4187-4190 (1997).
- Risinger JI, et al. PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. *Clin Cancer Res.* 4 (12):3005– 3010 (1998).
- Rashmi R, et al. AKT inhibitors promote cell death in cervical cancer through disruption of mTOR signaling and glucose uptake. *PLoS One*. 9 (4):e92948 (2014).
- Bays L J, DeMali A K. Vinculin in cell-cell and cell-matrix adhesions. *Cell Mol Life* Sci. 74 (16):2999-3009 (2017).
- Takafuta T, Wu G, Murphy F G, Shapiro S. Human beta-filamin is a new protein that interacts with the cytoplasmic tail of glycoprotein Ibalpha. *J Biol Chem.* 273 (28):17531-17538 (1998).
- Bhattacharjee S, et al. Tumor restriction by type I collagen opposes tumorpromoting effects of cancer-associated fibroblasts. *J Clin Invest.* 131 (11):e146987 (2021).
- 36. Al-Nedawi K, et al. Intercellar transfer of the oncogenic receptor EGFRvⅢ by microvesicles derived from tumor cells. *Nat cell biol.* 10 (5):619-624 (2008)
- Milla A L, Gonzalez-Ramirez N C, Palma V. Sonic Hedgehog in cancer stem cells: a novel link with autophagy. *Biol Res.* 45 (3):223–230 (2012).
- Hartog H, A Van Der Graaf T W, Boezen M H, Wesseling J. Treatment of breast cancer cells by IGF1R tyrosine kinase inhibitor combined with conventional systemic drugs. *Anticancer Res.* 32 (4):1309–1318 (2012).
- Wang, D., Fu, L., Sun, H., Guo, L. & DuBois, N. R. Prostaglandin E2 promotes colorectal cancer stem cell expansion and metastasis in mice. *Gastroenterology*. 149 (7), 1884–1895 (2015).
- 40. Navtej, S., Buttar, N. S. & Wang, K. K. Te, "Aspirin" of the new millennium: Cyclooxygenase-2 inhibitors. *Mayo Clin. Proc.* 75, 1027-1038 (2000).
- Garcia-Albeniz, X. & Chan, A. T. Aspirin for the prevention of colorectal cancer. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 25 (4–5), 461–472 (2011).
- Perisetti, A., Goyal, H., Tarian, B., Inamdar, S. & Mehta, J. L. Aspirin for prevention of colorectal cancer in the elderly: Friend or foe?. *Ann. Gastroenterol.* 34(1), 1–11 (2021).

- 43. Escudier B, et al. Phase I trial of sorafenib in combination with IFN alpha-2a in patients with unresectable and/or metastatic renal cell carcinoma or malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 13 (6):1801-1809 (2007).
- 44. Dai S, et al. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Mol Ther.* 16(4):782-790 (2008).
- 45. Phinney G D, et al. MSC-Derived Exosomed for Cell-Free Therapy. *Stem Cells*. 35 (4):851-858 (2017).

附録

プライマー配列リスト

| No. | Names | Forword Primer Sequence | Forword Primer Sequence |
|-----|-------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 1 | PLA2 | TGGCTCACAGAATAAAGGCTCTACA | GCTCACCAAGGCCATTAGCA |
| 2 | COX-2 | CTGGAACATGGACTCACTCAGTTTG | AGGCCTTTGCCACTGCTTGTA |
| 3 | PGES1 | TACGCGGTGGCTGTCATCA | CTCCACATCTGGGTCACTCCTG |
| 4 | PGES2 | CAGCCAACAAGTGGGTGACAG | GGATGTGTGAGTGTCGCATCAG |
| 5 | PGES3 | GGTGATGAGGATGTAGATTTACCAG | TGACAACAGCCCTTACTCCAGA |
| 6 | Alox-5 | GCAGATCGTGGATACTCTACCAGAC | CCTCTGGGTACATGCCTAGAAACA |
| 7 | Lta4h | GGCCCTAAAGATGGCAACTGAA | GATTTGTCGAAGGCAGCGAGA |
| 8 | Nanog | AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG | AACCCAAGCACGTATCAGGG |
| 9 | Oct3/4 | TCTTTCCACCAGGCCCCCGGCTC | TGCGGGCGGACATGGGGAGATCC |
| 10 | Sox2 | TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA | TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA |
| 11 | Klf4 | GGACTTACAAAATGCCAAGGGGTG | TCGCTTCCTCTTCCTCCGACACA |
| 12 | CD44 | AGAAAAATGGCCGCTACAGTATC | TGCATGTTTCAAAACCCTTGC |
| 13 | CD133 | CCTTGTGGTTCTTACGTTTGTTG | CGTTGACGACATTCTCAAGCTG |
| 14 | Pik3ca | GCCACAGACACTACTGCGT | CACCGAACAGCAAAACTCCG |
| 15 | Pik3cb | CTGATTTTACGGCGGCATGG | TGAGGGCCTCGTCAAACTTC |
| 16 | Pik3cg | ACCTGTGCCTTCTGCCTTAC | TGCGGCCTGAAACTTTTCTTC |
| 17 | Pik3r1 | AGCGGAGAACCTATTGCGAG | ACTTCGCGTCTACCACTAC |
| 18 | Pik3r5 | AAGTCCTTTGTCAGCAGTCCC | CTGGTAAACCTGCAGCAACAC |
| 19 | Pik3ap1 | GAAGGCCATTTCTGAAGATTCTGG | TCTCGTCCAGCTTGCATCTC |
| 20 | Pten | TGAAGACCATAACCCACCACAG | AGCATCTTGTTCTGTTTGTGGAAG |
| 21 | GAPDH | AACGGCACAGTCAAGGCCGA | ACCCTTTTGGCTCCACCCTT |
| 22 | Pik3ca (Sequencing1) | ACCCTATTGGTGTTACTGGGTC | TCCATGGCTTGCTCTGGTTT |
| 23 | Pik3ca (Sequencing2) | CTGCGTGGCAACCTTTATCTT | CCCAGCTCCCATCTCAGTTCA |
| 24 | Pten (Sequencing) | TGAAGACCATAACCCACCACAG | AGCATCTTGTTCTGTTTGTGGAAG |

略号リスト

- Alox-5 : arachidonate 5-lipoxigenae
- CM : conditioned medium
- COL1A1 : collagen type I $\alpha 1$
- COL4A1 : collagen type IV $\alpha 1$
- COL4A2 : collagen type IV $\alpha 2$
- COX-2 : cyclooxygenase
- cPLA2 : cytoplasmic phospholipase A2
- CSC : Cancer Stem Cell
- DAVID : Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
- EGFRvⅢ : epidermal growth factor receptor vⅢ
- FGF-2 : fibroblast growth factor-2
- FLNB : filamin B
- GLI2 : GLI family zinc finger 2
- GPCR : G-protein coupled receptor
- iDEP : integrated Differential Expression and Pathway analysis
- IGF1R : insulin-like growth factor 1 receptor
- IL-6: interleukin 6
- iPSCs : induced pluripotent stem cells
- ITGAV : integrin subunit αV
- KEGG : Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes
- LIF : leukaemia inhibitory factor
- LLC : Lewis lung carcinoma
- LPC : Lysophosphatidylcholine
- LPE : Lysophosphatidylethanolamine
- LPI : Lysophosphatidylinositol
- LPS : Lysophosphatidylserine
- LTA4h : leukotriene A4 hydrolase
- LTB4 : Leukotriene B4
- MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1
- miPSCs : mouse induced pluripotent stem cells

- miPS-LLCcm : the model of CSCs prepared from miPSCs by the treatment with the conditioned medium of LLC cells
- miPS-LLCcmP : the primary cells from subcutaneously transplanted miPS-LLCcm cells
- miPS-PGE2 : the cells from miPSCs by the treatment with PGE2
- miPS-PGE2P : the primary cells from subcutaneously transplanted miPS-PGE2 cells

PC : Phosphatidylcholine

PE : Phosphatidylethanolamine

PGES : prostaglandin E synthase

PGSEA : Parametric Gene Set Enrichment Analysis

PGE2 : prostaglandin E2

PI : Phosphatidylinositol

PIP3 : phosphatase of phosphatidyl inositol 3,4,5 phosphate

PS : Phosphatidylserine

PTEN : phosphatase and tensin homologue

ROS : reactive oxygen species

Shh: Sonic hedgehog

TNF-alpha : tumor necrosis factor alpha

VCL : vinculin

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 先生の御指導の下に行いました。

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 ヘルスシステム統合科学研究科 大槻 高史 教授、岡山大学大学院ヘルスシステム 統合科学 松尾 俊彦 教授に深謝申し上げます。

本研究において著者と共に遂行にあたった Said Mohamed Abdelsabour Afify 博士、 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、仕事と学業を両立する上で常に支えてくれた片山化学工業株式会社の皆 様に心より感謝申し上げます。

令和5年3月 峯松 秀希

本論文の内容の一部は、Scientific Reports 誌、第12巻、論文番号 15628 (2022 年) https://doi.org/10.1038/s41598-022-19265-7 に掲載されています。