

23-B-1 ヒト正常細胞株パネルの作成

独立行政法人国立がん研究センター研究所ウイルス発がん研究分野

清野透

研究の分類・属性

基礎系

研究の概要

主要ながん腫に対応する起源正常細胞を手術余剰組織より分離・培養し不死化することで、ヒト正常組織幹細胞株パネルを樹立する。これにより、種々の解析における適切な正常対照あるいは研究材料として使用できるバイオリソースを提供し、前臨床研究やより精度の高い解析を支える基盤を確立する。

培養・継代が困難とされている正常上皮細胞の不死化を遺伝子導入により試みる。これまで、TERT の導入と pRB/p16 経路の不活化に加えて、p53 を不活化すればこれらの細胞種を延命できる感触を得ている。しかし、p53 を不活化すれば染色体不安定性が誘導され、正常細胞の形質をやがて失ってしまう。本研究では p53 の活性化を誘導しない不死化法を確立し、染色体不安定性を伴わない真の意味での正常不死化細胞の樹立を目指す。まずは、培養の困難で発がんの母地である胃・大腸・膵管などの上皮細胞の培養・不死化を進める。遺伝子導入には非分裂細胞にも 100% の導入が可能なレンチウイルスベクターを用いる。また、必要に応じて外来遺伝子の発現量を自在に制御できる tetON/OFF 系を使用する。H23 年度には大腸正常上皮細胞と膵管上皮細胞を用いて、至適な不死化法を確立する。H24 年度以降には、がん研究分野で要請の高い胃粘膜細胞や薬剤代謝研究に要請の高い肝細胞でその有効性の確認をとり、順次ヒト正常細胞株パネルの充実を図る。これまでに、不死化遺伝子導入に加え ROCK 阻害剤を培地に添加することで安定した上皮系細胞の培養・継代ができることを見つけている。一方、本年 2 月に Liu らにより Feeder 細胞と ROCK 阻害剤を用いる培養法が発表された (Am J Pathol. 180:599-605, 2012)。報告によれば、複数のヒト上皮細胞から遺伝子導入なしに正常細胞株を樹立できるとされている。本培養法はヒト正常細胞の標準培養法になる可能性があり、追試と共にその老化抑制機構を明らかにし、より優れた培養法の標準化を進めヒト正常細胞株パネルの充実をはかる。

医療への応用を考えるとヒト細胞を用いる重要性は明らかであり、本研究が達成された場合その恩恵は計り知れないものがある。ヒト正常細胞株パネルは当面センター内での研究に提供し、将来的には広くバイオバンクへ寄託する。

本研究の遂行には新鮮な手術検体が必要であり、臨床医、病理医の協力を要請する。手術検体より得た細胞を使用するにあたっては患者に不利益の生じないよう、連結可能匿名化し、またインフォームドコンセントを得るなどの配慮をする。なお、本研究の実施については国立がん研究センター倫理審査委員会の承認を得ている (承認番号 16-69)。細胞への遺伝子導入にあたっては、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律に基づき申請し、国立がん研究センター遺伝子組換え実験安全委員会の審査を経て、理事長の承認を受ける。

研究経費

5,000 千円

研究班の組織

清野透	国立がん研究センター研究所ウイルス発がん研究分野・分野長	研究の総括
温川恭至	国立がん研究センター研究所ウイルス発がん研究分野・研究員	種々のヒト正常角化細胞の分離培養、不死化とがん化

江川長靖	国立がん研究センター研究所ウイルス発がん研究分野・研究員	ヒト正常上皮細胞の分離培養、不死化とがん化
田中克征	国立がん研究センター研究所ウイルス発がん研究分野・研修生(大学院生)	ヒト正常大腸上皮細胞の分離培養、不死化とがん化
稲川悠紀	国立がん研究センター研究所ウイルス発がん研究分野・研修生(大学院生)	ヒト正常膵管上皮細胞の分離培養、不死化とがん化
大野真一	国立がん研究センター研究所ウイルス発がん研究分野・非常勤職員	レトロウイルス・レンチウイルスベクターの開発・作成

研究の目的と到達目標及び実績要点

全期間

(目的と到達目標) :

ヒト細胞のがん化の理解にはヒト正常細胞を材料とする研究が理想的である。しかし、ヒト初代正常培養細胞には寿命が有り再現性の高い研究は困難であった。ヒト皮膚線維芽細胞のように比較的簡単に培養・継代でき TERT の導入のみで不死化できる細胞種もあるが、多くの癌腫の起源細胞である上皮細胞など多くのヒト正常細胞は TERT に加えて pRb/p16 経路の不活化が必要であることを申請者らは世界で初めて示した(Nature, 396: 84-88, 1998)。その後数多くの細胞種の不活化と機構解析から大部分のヒト正常細胞に当てはまることを実証してきた。さらに、不死化細胞を用いて子宮頸がんと上皮性卵巣がんの in vitro 多段階発がんモデルを世界で初めて作成した。また、作成した不死化細胞やがん細胞を用いた抗がん剤の評価や、細胞生物学研究にも応用している。しかし、ヒト正常細胞種の中には胃・大腸粘膜や膵管上皮細胞のように継代が困難な細胞や初代培養すら困難な細胞が多数存在する。これらの中にも TERT に加えて HPV16 の E6E7 を導入することで不死化できる細胞種は増えてきている。

そこで、本研究ではこれまで培養・継代や不死化が困難とされた胃・大腸・膵管などの上皮細胞の培養・不死化を系統的に試みる。これまで、TERT の導入と pRb/p16 経路の不活化に加えて、p53 を不活化すれば現時点でもこれらの細胞種を延命できる感触を得ている。しかし、p53 を不活化すれば染色体不安定性が誘導され、正常細胞の形質をやがて失ってしまう。そのため、p53 の活性化を回避して染色体不安定性を伴わない真の意味での正常不死化細胞の樹立を目指す。H23 年度には大腸正常上皮細胞と膵管上皮細胞を用いて、至適な不死化法を確立する。H24 年度以降には、がん研究分野で要請の高い胃粘膜細胞や薬剤代謝研究に要請の高い肝細胞でその有効性の確認をとり、順次ヒト正常細胞株パネルの充実を図る。さらに、本年 2 月に Liu らにより報告された Feeder 細胞と ROCK 阻害剤を用いた培養法(Am J Pathol. 180:599-605, 2012)を踏襲し、ヒト上皮細胞から遺伝子導入なしに正常細胞株の樹立を並行して進める。

第 1 年次

(到達目標)

- 1 大腸正常上皮細胞の至適な不死化法の確立を目標とする。
- 2 膵管上皮細胞を用いて、至適な不死化法の確立を目標とする。

(年次評価時点の実績要点)

- 1 大腸がん患者 10 名の手術材料から正常大腸組織の提供を受け、7 例で細胞分離、培養に成功し、継代可能な培養条件を見出した。最終的に、p53 の不活化をすることなく長期延命する遺伝子導入法をほぼ確立し、サイトケラチン 18 陽性の不死化細胞を得ることができた。
- 2 胆道がんや十二指腸乳頭部がんなどの患者 11 名の膵合併切除検体より、9 例から膵管上皮細胞の分離、培養に成功し、継代可能な培養条件を見出した。最終的に、p53 の不活化をすることなく長期延命する遺伝子導入・培養法を確立し、E-cad 陽性、サイトケラチン 19 陽性の不死化細胞を得ることができた。

研究成果と考察

第 1 年次評価時点

第 1 年次の目標であった大腸上皮細胞と膵管上皮細胞の不死化に成功し目標を達成することができた。大腸上皮細胞と膵管上皮細胞に分けて成果と考察を記載する。

1 大腸正常上皮細胞の不死化

大腸がん患者10名の手術材料から正常大腸組織の提供を受け、大腸上皮細胞(HColEC)の分離、培養、不死化を進めた。大腸上皮の幹細胞はcryptに存在し、Wnt, EGF などにより増殖や幹細胞性が維持され、BMP/TGFbeta シグナルなどにより分化誘導されることが知られている。その他にも NOTCH や Eph/Ephrin シグナルなどが分化に関わっていることが知られているが、入手可能な因子を種々の組み合わせで培地に添加することにより増殖への影響を検討した。その結果、従来報告されている方法よりも長期間、継代培養できる培養法を樹立することに成功した。この培養法の改良により、遺伝子導入による不死化が容易になった。不死化された細胞はほぼ正常2倍体を保っており、安定に増殖することが示された。サイトケラチンの発現は確認できるものの、大腸幹細胞のマーカーとされるLGR5の発現を確認できていない。しかしLGR5も絶対的なマーカーではなく、今後不死化HColEC細胞を用いた3次元培養で大腸絨毛構造を再現できるかなどを確認する必要がある。本年になってHans Cleversのグループはマウス小腸上皮細胞の3次元培養を報告していたが、今秋ヒト細胞を用いた3次元培養法を報告している。これらを参考に不死化細胞の分化能などを調べる予定である。また、一方で本不死化細胞のがん研究における有用性を検討するため大腸がんで見つかるがん遺伝子などを本不死化細胞に導入することで免疫不全マウス皮下における造腫瘍性を付与できることを確認している。しかし、これまでのところ腫瘍の組織像は未分化がんであり、高分化型腺がん組織像を得ることに成功していない。今後は、導入がん遺伝子の組み合わせと悪性度や組織像との関連を解析できるかどうかを検証していく予定である。

2 膵管上皮細胞の不死化

11名の患者の膵合併切除検体より正常膵臓組織の提供を受け、膵管上皮細胞(HPDEC)の分離、培養、不死化を試みた。9例から細胞の分離と初期培養に成功し6例から延命(不死化)細胞を得ること成功した。膵管上皮組織の恒常性の維持、再生についての知見は大腸上皮ほど多くなく不明な点が多いが、1, 2例目(HPDEC1,2)を用いて複数の細胞分離法と培地を組み合わせることで培養法を至適化することに成功した。報告者が経験豊富な角化細胞の培養法と共通する点が多く、比較的簡単に培養条件を見出すことができた。特に培地へのキナーゼ阻害剤添加は予想外に効果的であり、その分子機構を解析することにより、従来知られていなかった膵管上皮細胞の生物学を明らかにできると考えている。この培養条件でCDK4/Cyclin D1/TERTの遺伝子導入によりほぼHPDECを不死化できること、不死化された細胞は正常2倍体を示すことが確認できた。問題点として、不死化した細胞集団の中には間葉系細胞が混入しており、長期継代すると、HPDECを凌駕して殖えることがある。あらかじめp53を不活化しておくことで回避できること、1細胞クローニングすることで間葉系細胞の混入のない不死化HPDEC株を樹立することに成功していることから、培養、継代条件によっては、おそらくp53が活性化することで上皮系の細胞が選択的に老化あるいはアポトーシスなどを起こしていると推測している。この培養皿上で観察される現象はがん化におけるバリアととらえることもでき分子機構の解析を進めたい。一方で、HPDEC6では遺伝子導入なしで約10継代、上皮系細胞が優位なまま培養することが可能であった。これが検体間の個人差なのかテクニカルな差のかなど検討する必要がある。不死化HPDECに、p53の不活化と活性型KRASなどのがん遺伝子を追加導入することにより免疫不全マウスで腺がん組織像を示す細胞の作出にも成功しており、正常膵管上皮細胞から膵がん発生をin vitroで再現する研究にも有効であると考えている。

倫理面への配慮

手術材料より得た細胞を使用するにあたっては患者に不利益の生じないよう、連結可能匿名化し、またインフォームドコンセントを得るなどの配慮をし、国立がん研究センター倫理審査委員会の承認を得ている(承認番号16-69)。細胞への遺伝子導入にあたっては、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律に基づき申請し、国立がん研究センター遺伝子組換え実験安全委員会の審査を経て、理事長の承認を受ける。本研究に必要な動物実験については「国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」に従い動物実験倫理委員会に申請を行う予定である。また、本研究は、個人情報を伴うアンケート調査・インタビュー調査を含まず、ヒト遺伝子解析研究には該当しない。

本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

(雑誌論文)

1. Fujiwara S, Nawa A, Luo C, Kamakura M, Goshima F, Kondo C, Kiyono T, Kikkawa F, Nishiyama Y. Carrier cell-based delivery of replication-competent HSV-1 mutants enhances antitumor effect for ovarian cancer. *Cancer Gene Ther* 18: 77-86, 2011.
2. Kyo, S., J. Sakaguchi, T. Kiyono, Y. Shimizu, Y. Maida, Y. Mizumoto, N. Mori, M. Nakamura, M. Takakura, K. Miyake, M. Sakamoto, and M. Inoue. Forkhead transcription factor FOXO1 is a direct target of progesterone to

inhibit endometrial epithelial cell growth. Clin Cancer Res 17:525-537, 2011.

3. Mizumoto, Y., S. Kyo, T. Kiyono, M. Takakura, M. Nakamura, Y. Maida, N. Mori, Y. Bono, H. Sakurai, and M. Inoue. Activation of NF- κ B Is a Novel Target of KRAS-Induced Endometrial Carcinogenesis. Clin Cancer Res 17:1341-1350, 2011.
4. Shaker, M., Y. Yokoyama, S. Mori, M. Tsujimoto, N. Kawaguchi, T. Kiyono, T. Nakano, and N. Matsuura. Aberrant expression of disintegrin-metalloprotease proteins in the formation and progression of uterine cervical cancer. Pathobiology 78:149-161, 2011.
5. Shiomi, K., T. Kiyono, K. Okamura, M. Uezumi, Y. Goto, S. Yasumoto, S. Shimizu, and N. Hashimoto. CDK4 and cyclin D1 allow human myogenic cells to recapture growth property without compromising differentiation potential. Gene Ther 18:857-66, 2011.
6. Zushi, Y., M. Narisawa-Saito, K. Noguchi, Y. Yoshimatsu, T. Yugawa, N. Egawa, M. Fujita, M. Urade, and T. Kiyono. An in vitro multistep carcinogenesis model for both HPV-positive and -negative human oral squamous cell carcinomas. Am J Cancer Res 1:869-881, 2011.

(学会発表)

Tohru Kiyono. In vitro multi-step carcinogenesis models for gynecologic cancers 第70回日本癌学会シンポジウム(2011年10月)