

平成 29 年 4 月 28 日

平成 28 年度独立行政法人日本学術振興会
藤田記念医学研究振興基金研究助成事業研究概要報告書

独立行政法人日本学術振興会理事長殿

研究者所属・職 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
病理学(免疫病理) 助教
氏 名 大原 利章

本助成事業による研究について、次のとおり報告します。

1. 研究課題名 鉄制御による新規癌幹細胞治療法の開発
(英文名) Iron depletion is a novel therapeutic strategy to target cancer stem cells
2. 研究実施期間 平成 28 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 3 1 日
3. 助成金額 1,000 千円
4. 研究の目的 <p>癌の治療成績の向上のためには、外科手術後の再発、転移を抑制する必要があり、そのためには治療抵抗性となっている癌幹細胞への治療法の開発が必要である。今までに癌幹細胞に対する治療法の研究が行われているが、確立された治療法はない。2012 年に岡山大学ではマウス iPS 細胞から Lewis 肺癌細胞の培養上清を用いて癌幹細胞モデル(miPS-LLCcm)を作成する事に成功した。この癌幹細胞モデル(miPS-LLCcm)は未分化性のマーカーである Nanog や山中因子(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc)の発現が認められ、癌幹細胞のモデル細胞として有用な細胞である。この細胞は Nanog 遺伝子のプロモーター領域の下流に GFP 遺伝子が組み込まれ、Nanog が発現している状況では GFP が発現するようになっており、未分化性を GFP 蛍光にて簡易的に把握する事が可能である。未分化性マーカーの発現は癌幹細胞の自己複製能の維持や造腫瘍性に強い影響を与える事が知られており、この癌幹細胞モデルを用いる事で、治療効果の評価が容易となった。</p> <p>申請者は以前から生体内の鉄に着目し、鉄は人体にとって必須の微量元素であり、過剰な鉄が発癌原因となることから、鉄の制御が癌治療になり得ると仮説を立てて研究を進めてきた。現在までに様々な癌細胞株(肺癌細胞株:A549, H1299, 肝臓癌細胞株:HepG2, HLE, 食道癌細胞株:TE4, TE10)に対して、鉄キレート剤の抗腫瘍効果を明らかにしてきた。本研究では鉄キレート剤による鉄制御が癌幹細胞モデル(miPS-LLCcm)に対して抗腫瘍効果ならびに幹細胞性制御に有用であると仮説を立て、新規癌幹細胞治療法の開発を目的に研究を行った。</p>

5. 研究概要報告

1. 鉄キレート剤を投与すると癌幹細胞モデルの増殖抑制が認められた。

鉄キレート剤 (Deferasirox deferoxamine) を癌幹細胞モデル(miPS-LLCcm)に対して投与し、48 時間後に XTT 法で細胞生存率を検討すると、濃度依存的に増殖抑制効果が認められ、IC50 は Deferasirox が 42.0 μ M、deferoxamine 47.0 μ M であった。蛍光顕微鏡観察でも GFP 陽性細胞数の減少が認められ、癌幹細胞モデルの増殖を抑制していると考えられた。尚、比較対象として、正常の線維芽細胞株 (NIH3T3, MEF) に対しても鉄キレート剤を投与して検討を行った。線維芽細胞に対して、鉄キレート剤はある程度の増殖抑制効果は認められるものの、癌幹細胞モデルと比較すると弱く、正常細胞への影響は少ないものと推察された。

2. 鉄キレート剤は Cell cycle arrest とアポトーシスにより癌幹細胞モデルの増殖を抑制した。

増殖抑制効果のメカニズムを明らかにするために、鉄キレート剤 (Deferasirox deferoxamine) を癌幹細胞モデル(miPS-LLCcm)に対して投与し、48 時間後に蛋白を回収し、ウェスタンブロット法で検討を行った。鉄キレート剤を投与すると Cyclin D1、Cyclin E1 の発現減少が認められ、Cleaved PARP、Cleaved Caspase 3 の発現増強が認められた。このことから鉄キレート剤は Cell cycle arrest とアポトーシスにより癌幹細胞モデルに対して増殖抑制効果を発揮していると考えられた。

3. 鉄キレート剤は幹細胞性マーカーの発現を抑制した。

鉄キレート剤による鉄制御が幹細胞性に影響を与えるかを検討するために、上記と同様に回収された蛋白を用いて、ウェスタンブロット法で検討を行った。鉄キレート剤を投与すると幹細胞マーカーである Nanog, Sox2, c-Myc, Oct3/4, Klf4 の発現抑制が認められた。発現抑制効果は deferoxamine より、Deferasirox の方が強く、元々の鉄キレート能に関連している可能性があると考えられた。

4. 5-FU と CDDP では癌幹細胞モデルに対して抗腫瘍効果は認められたが、幹細胞性マーカーの発現抑制は認められなかった。

既存の抗癌剤に対する影響と比較するために 5-FU と CDDP を癌幹細胞モデルに投与し、48 時間後に増殖抑制効果と幹細胞マーカーに与える影響を検討した。5-FU と CDDP はいずれも癌幹細胞モデルに対して増殖抑制効果は認められたが、Nanog, Sox2, c-Myc, Oct3/4, Klf4 の発現には影響を与えなかった。この事から、既存の抗癌剤では癌幹細胞の幹細胞性を制御できず、治療抵抗性に結びついていると考えられ、鉄キレート剤により、幹細胞性の制御が可能となるため、癌幹細胞を標的とした新規治療法として有用と考えられた。

なお、上記成果をまとめて、現在論文投稿中である。

6. 研究成果の発表について

独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業の英文称：
「JSPS Fujita Memorial Fund for Medical Research」

研究者所属・職 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病理学(免疫病理) 助教
氏 名 大原 利章

○論文発表 現在投稿中

○口頭発表

Toshiaki Ohara, Yasuko Tomono, Teizo Yoshimura, Masayoshi Fujisawa, Akihiro Matsukawa
Development of new tumor model with heterogeneity and stemness
105th Annual Meeting of the Japanese Society of Pathology 2016年5月14日

Toshiaki Ohara, Takayuki Ninomiya, Yuki Katsura, Hajime Kashima,
Takuya Kato, Kazuhiro Noma,
Hiroshi Tazawa, Toshiyoshi Fujiwara

○Iron metabolism is a novel therapeutic target of cancer stem cells
第75回日本癌学会総会 2016年10月16-18日

Yuki Katsura, **Toshiaki Ohara**, Hajime Kashima, Hiroaki Sato, Takuya Kato,
Takayuki Ninomiya, Kazuhiro Noma, Yasuko Tomono, Hiroshi Tazawa,
Shunsuke Kagawa, Yasuhiro Shirakawa, Toshiyoshi Fujiwara.

○Tumorigenesis is prevented from suppressing the stemness by iron depletion treatment:
Teratoma formation of miPS cell was prevented by iron depletion therapy
108th Annual Meeting American Association for Cancer Research 2017年4月

○著 書

注：

- (1) 研究成果を学会誌等で発表する場合には、独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業による助成を受けた旨を必ず明記して下さい。
また、その別刷り2部を「研究概要報告書」と共に必ず提出して下さい。
- (2) 本基金の助成に係る代表的な論文、口頭発表及び著書にはタイトルの前に○を付けて下さい。