

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20132

研究課題名(和文) 卵巣がん・子宮体がん幹細胞のがん腫特異的制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism for control of proliferation of ovarian and endometrial cancer stem cells

研究代表者

石黒 竜也 (Ishiguro, Tatsuya)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：80625690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：新潟大学遺伝子倫理委員会の承認、および患者同意を取得後に、新潟大学医歯学総合病院で手術・処置を施行された婦人科悪性腫瘍患者さまの臨床検体(腫瘍・腹水)由来の3次元スフェロイド培養を行い、これまでに複数の卵巣がん・子宮体がん由来の細胞の安定培養に成功した。特に子宮体がんスフェロイド細胞についてはがん幹細胞マーカーとして知られる“X”の差により、腫瘍形成や細胞増殖の差異を認め、マーカー“X”の重要性が示された。

研究成果の概要(英文)：We established and grew spheroid cell cultures from a variety of endometrial and ovarian cancer specimens. Endometrial cancer spheroid cells that expressed the cancer stem cell specific marker X formed larger tumors and grew more rapidly than the cells that did not express marker X. These results demonstrate the importance of marker X in proliferation of endometrial cancer stem cells. All procedures were performed following protocols approved by the Ethics and Animal Care and Use Committees of Niigata University.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：がん幹細胞 子宮体がん 卵巣がん

1. 研究開始当初の背景

卵巣がん、子宮体がんの発生頻度は国内外ともに増加傾向にある。治療法の進歩に伴い生命予後は改善傾向にあるものの、進行卵巣がん、子宮体がんの5年生存率は未だ低く、新たな治療戦略が望まれる。

がん幹細胞は、がんの再発・転移・治療抵抗性などに密接に関わると考えられる。

ES細胞を代表とした正常幹細胞において、一群の幹細胞特異的因子(Nanog, Oct-3/4, Sox-2などの転写因子)、エピジェネティック制御因子、そしてマイクロRNA(以後、miRNA)は相互に依存するネットワークを形成し、多能性の維持に関わることは広く知られている。また多くのがん腫でmiRNAががんの増殖や転移を制御することが報告されてきている。

2. 研究の目的

卵巣がん・子宮体がん幹細胞における、幹細胞制御因子とそのネットワークを中心としたがん腫特異的ながん幹細胞制御機構の解明を見出す。本解析を通じて、最終的にはがん幹細胞を標的とした新たな治療戦略の礎とする事を目的とする。

3. 研究の方法

A. 臨床検体由来スフェロイド細胞におけるがん幹細胞性質について

(1) 臨床検体由来のスフェロイド細胞の *in vitro* 培養。同意の得られた子宮体がん・卵巣がん患者より提供された手術検体を酵素処理した後、遠心分離法により卵巣がん細胞を分離する。これらの細胞を用い、低接着プレートに改変したES細胞用の無血清培地中でがんスフェロイド細胞の培養を行った。

(2) スフェロイド細胞のがん幹細胞性質の確認。がん幹細胞の特性として、(A)造腫瘍能、(B)幹細胞マーカーの発現、(C)分化能が重要である。そこで以下の実験を行った。(A)スフェロイド細胞の造腫瘍能を明らかにするため、免疫不全マウスへのスフェロイド細胞投与による皮下および腹腔内腫瘍形成能の検証。また形成された腫瘍と臨床組織検体における組織型の差異の検証。(B)western blot, realtime 法によるタンパク・RNAレベルにおけるSox2, Nanogなどの幹細胞マーカーの発現の確認。(C) *in vitro* における血清添加に伴う分化能の有無の検証。

(3) 幹細胞マーカー“X”の差異によりFACSで細胞を分離し、細胞増殖能・腫瘍形成能・幹細胞因子の発現などの差異を検証した。

(4) 幹細胞マーカー“X”の発現抑制・発現上昇による細胞増殖能の差異の検証。レンチウイルスベクターにより発現を抑制・上昇させ、*in vitro* におけるスフェロイド細胞増殖能の変化を確認した。

B. 細胞株における幹細胞因子の意義について

(1) 子宮体がん細胞株における多能性幹細胞因子の発現の確認。タンパク・RNAレベルの確認を10種の子宮体がん細胞株で確認した。

(2) 幹細胞因子SOX2の発現変化による細胞増殖・腫瘍形成の変化の検証。siRNAによる発現抑制による変化を確認した。

(3) SOX2の標的因子の同定。ChIPにより、SOX2とp21の関係を検証した。

(4) 子宮体がん臨床検体におけるSOX2・p21の発現と予後との検証。免疫染色によりSOX2とp21の発現を確認し、臨床予後の差を確認した。

4. 研究成果

A. 臨床検体由来スフェロイド細胞

複数の子宮体がん患者より提供された癌組織よりスフェロイド細胞の安定培養に成功した(図1)。

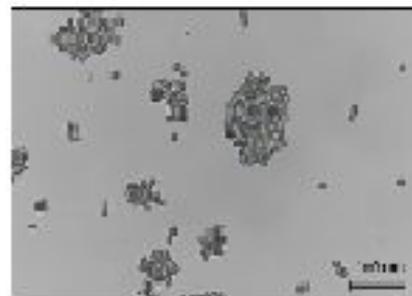


図1. 子宮体癌スフェロイド細胞

樹立した子宮体がんスフェロイド細胞は免疫不全マウスへの移植により、元の臨床検体と同様の組織学的形態を呈する腫瘍を形成した(図2)。また *in vitro* で幹細胞因子の発現低下を伴う分化の誘導を確認した。

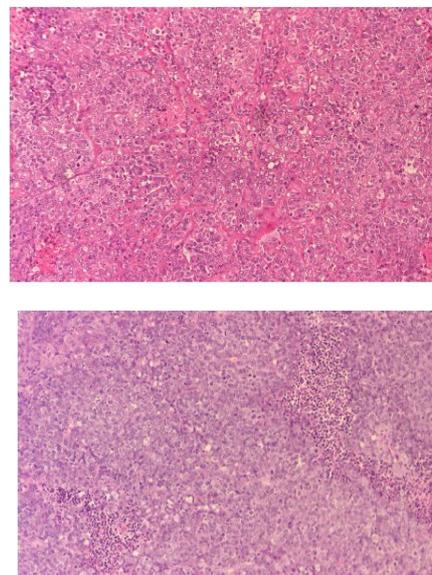


図2. 免疫不全マウス移植により形成された

腫瘍(上),スフェロイド細胞の由来腫瘍(下)

ついで幹細胞マーカーXの差異によりスフェロイド細胞をFACSで分離し,細胞増殖・腫瘍形成の差異を検証すると,マーカーXの高発現細胞で細胞増殖・腫瘍形成能が高いとともに,幹細胞因子の発現が高い事を確認した(図3)

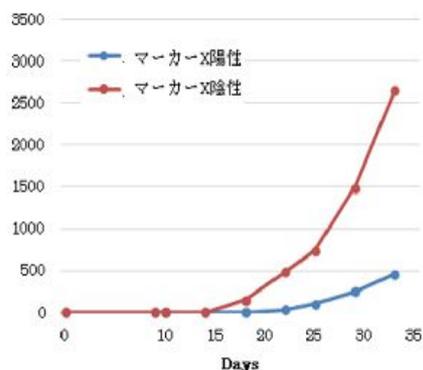
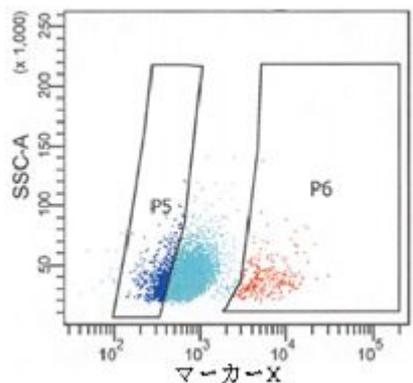


図3. 子宮体がんスフェロイド細胞におけるマーカー“X”の発現(上). マーカー“X”陽性・陰性細胞移植後の腫瘍サイズ変化(下)

さらにマーカー“X”の発現をレンチウイルスベクターにより抑制すると,スフェロイド細胞の増殖抑制がおり,一方マーカー“X”発現の上昇により細胞増殖が亢進する事を見出した(図4)

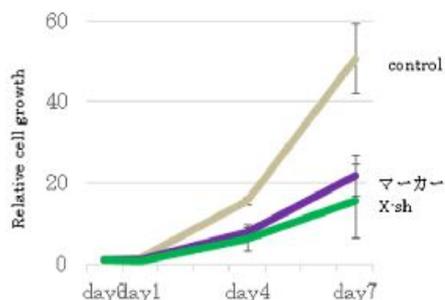


図4. マーカーX抑制後の in vitro スフェロイド細胞増殖

B. 子宮体がん細胞株における幹細胞因子の意義

子宮体がん細胞株 10 種における幹細胞因子の発現を検証し,とくに SOX2 の発現に着目した(図5)

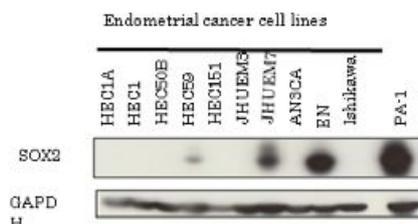


図5. Western blotting による子宮体がん細胞株の SOX2 発現

SOX2 陽性細胞株において siRNA 法で SOX2 発現を抑制すると,細胞増殖・腫瘍形成の抑制が引き起こされた(図6)。また SOX2 発現抑制により p21 の発現上昇を認め,ChIP による SOX2 と p21 の相互関係を確認した。

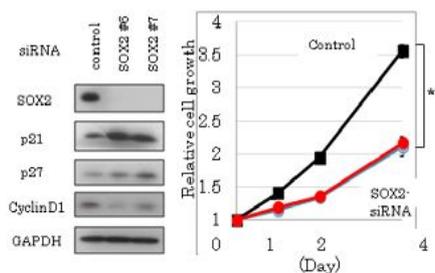
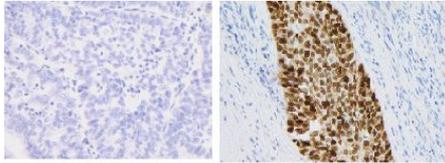


図6. siRNA による SOX2 発現抑制時のタンパク変化(Western blot, 左)。発現抑制時の in vitro 細胞増殖変化(右)。

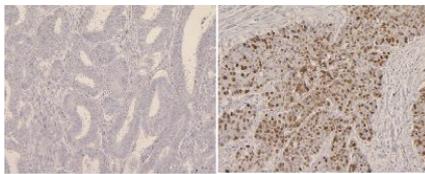
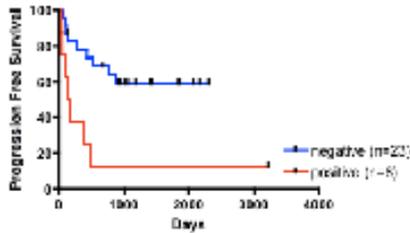
さらに子宮体がん臨床組織における SOX2 発現を免疫染色で確認し,臨床予後の検証を行うと,SOX2 高発現グループの予後が不良である事が確認された。また多変量解析により SOX2 発現が独立した予後因子であることも見出した。さらに免疫染色における SOX2 発現と p21 発現を組み合わせて評価すると,SOX2 陽性かつ p21 陰性群が最も予後不良であることを見出した(図7)

以上の結果より,SOX2 と p21 が子宮体がんのバイオマーカーとしての可能性が示唆された。



SOX2 陰性

SOX2 陽性



p21 陰性

p21 陽性

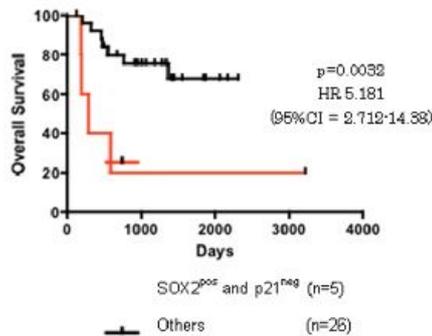


図7. 臨床組織検体の免疫染色と生存曲線
SOX2 高発現グループの予後不良であり(上),
加えて SOX2 高発現かつ p21 低発現グループ
が最も予後不良である(下)

以上の結果より子宮体がんにおいて、幹細胞因子が生存増殖に重要性とともに、がん幹細胞における幹細胞マーカー“X”の意義が明らかとなった。婦人科がん幹細胞の詳細な生化学的研究報告は少なく、今回の我々の研究結果は婦人科がんとくに子宮体がんにおいて幹細胞性に着目した、あらたなバイオマーカーの有用性とがん幹細胞を標的とした新たな治療戦略の礎となり得る重要な知見である。

今後は更なる特性の解明を追求する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

(1) Tumor-derived spheroids: relevance to cancer stem cells and clinical applications
Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K.
Cancer Sci. 2017;108(3):283-289

(2) Sox2-dependent inhibition of p21 is associated with poor prognosis of endometrial cancer

Yamawaki K, Ishiguro T (corresponding author), Mori Y, Yoshihara K, Suda K, Tamura R, Yamaguchi M, Sekine M, Kashima K, Higuchi M, Fujii M, Okamoto K, Enomoto T.
Cancer Sci. 2017;108(4):632-640

(3) Establishment and characterization of an in vitro model of ovarian cancer stem-like cells with an enhanced proliferative capacity
Ishiguro T, Sato A, Ohata H, Ikarashi Y, Takahashi RU, Ochiya T, Yoshida M, Tsuda H, Onda T, Kato T, Kasamatsu T, Enomoto T, Tanaka K, Nakagama H, Okamoto K.
Cancer Res. 2016;76:150-60.

〔学会発表〕(計3件)

(1) 石黒竜也. 婦人科悪性腫瘍がん幹細胞の特性解明. 第5回細胞凝集研究会 (2016/09/09 於:札幌)

(2) 石黒竜也. 婦人科悪性腫瘍がん幹細胞の特性解明. 第42回日本産婦人科医会学術集会 (2015/10/17-18 於:新潟)

(3) 石黒竜也. 婦人科悪性腫瘍がん幹細胞の特性解明. 第2回新潟シンポジウム (2015/08/29 於:新潟)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石黒 竜也 (Tatsuya Ishiguro)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：80625690

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()