

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09250

研究課題名(和文) 特異的代謝メカニズムを標的とした婦人科悪性腫瘍がん幹細胞の新規治療法の探索

研究課題名(英文) Study for novel treatment of gynecological cancer stem cells based on specific metabolism

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：がんの根治に向け、がん全体の挙動に関与する“がん幹細胞”を標的とした新たな治療の開発が望まれている。今回、子宮体癌検体より初めてがん幹細胞を安定培養した。幹細胞因子のアルデヒド脱水素酵素(ALDH)の阻害剤は、子宮体癌幹細胞の造腫瘍能を抑制した。また子宮体癌幹細胞は、糖の取り込み亢進に伴う解糖系の亢進を認めた。糖輸送体GLUT1の阻害剤は、造腫瘍などのがん幹細胞性質を抑制し、かつパクリタキセルとの相乗的な腫瘍抑制効果を有することを明らかにした。ALDH阻害剤およびGLUT阻害剤が子宮体癌の新たな治療薬として期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在年間約1万人の国内新規患者を認める子宮体癌において、保険収載され臨床使用されている抗がん剤は少なく、手術摘出困難な進行例における治療は難渋することが多い。申請者らが今回報告した特異的阻害剤の有効性に関する研究成果は、子宮体癌の新たな治療戦略として大いに期待される。今回の研究成果は、Stem Cell Reports誌の表紙に選出され、また2019年度日本産科婦人科学会優秀論文賞に選定された。加えて、臨床ニュースに取り上げられ、全国の子宮体癌患者様より実臨床への応用に向けた期待の声をいただいている。

研究成果の概要(英文)：Uterine endometrial cancer is associated with poor survival outcomes in patients with advanced-stage disease. Here, we developed a three-dimensional cell cultivation method of endometrioid cancer stem-like cells from clinical specimens. ALDH inhibition synergized with paclitaxel to block cancer proliferation. A high level of ALDH correlated with activation of the glycolytic pathway. Blockade of glucose transporter 1 (GLUT1) inhibited characteristics of cancer stem cells. Similarly to ALDH inhibition, GLUT1 inhibition synergized with paclitaxel to block endometrial cancer proliferation. Our data indicated that ALDH-dependent GLUT1 activation and the resulting glycolytic activation are of clinical importance for both prognostic evaluation and therapeutic decision-making in endometrial cancer patients. In addition, the synergistic effects of taxane compounds and ALDH or GLUT1 inhibitors may serve as a new clinical treatment option for endometrial cancer.

研究分野：産科婦人科

キーワード：子宮体癌 卵巣がん がん幹細胞 解糖系

1. 研究開始当初の背景

多くの固形がんでがん幹細胞の存在が指摘されている。がん幹細胞は 自己複製能, 造腫瘍能, 分化能, 既存の化学療法などへの治療抵抗性などの性質を持ち, がんにおける幹細胞性質の解明はがんの根治に向け重要な課題として位置付けられている。昨今, がん幹細胞を標的とした新たながん治療戦略が期待されており, 種々のヒト原発がんよりがん幹細胞を同定し解析する試みが, 盛んに行われている。

一般に幹細胞は自己複製を反映するスフェロイド (球状体) の形成能を有する事が知られている。臨床検体由来のがん幹細胞の *in vitro* における継代培養系の確立は, 臨床に近い性質を反映する実験系として非常に有用であり, がん幹細胞の生物学的特性の解析や治療法開発に向け, 多くのがん腫でこの実験系を基盤とした研究が日々進んでいる (Ishiguro et al., *Cancer Sci* 2017, Ishiguro et al., *Cancer Res* 2016)。婦人科領域においては, 卵巣がんの腹水細胞 (Bapat SA et al., *Cancer Res*, 2005), および原発組織 (Zhang S et al., *Cancer Res*, 2008) 中のがん幹細胞の存在が報告されたものの, 他がん腫に比し後塵を拝している。この事由のひとつとして, 婦人科がんにおけるがん幹細胞培養が十分確立していない事が考えられる。

我々はこれまでに卵巣がん・子宮体がんをはじめ, 複数のがん腫由来のがん幹細胞の効率的な培養を報告してきた (Ohata et al., *Cancer Res* 2012, Ishiguro et al., *Cancer Res* 2016)。現在に至るまで, 精製した卵巣がんおよび子宮体がん幹細胞を *in vitro* で安定な継代培養を行った他グループからの報告はない。おそらくこれは, これらがん幹細胞の形質を *in vitro* 培養系で安定に保つ事が難しい事に起因すると考えられるが, 婦人科がんの根絶に向け, 今後その解明は必要不可欠である。

2. 研究の目的

癌幹細胞の生化学的特性を明らかにし, 婦人科悪性腫瘍の新規治療への礎とすることを目的とする。がん幹細胞性質, 特にエネルギー代謝を制御する代謝メカニズムと, 治療感受性や生物学的特徴との関係性を明らかにする。がん幹細胞の代謝メカニズムに着目したがん全体の生物学的動態を明らかにし, 既存の化学療法に抵抗性のがん幹細胞, さらにがん全体の挙動を抑制する新規治療への発展を目指す。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体由来がん幹細胞の培養 (Ueda et al., *STAR Protocol* 2021)

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) がん幹細胞の分離

ALDEFLUOR を用い, スフェロイド細胞中の ALDH 高活性細胞を FACS にて分離回収した。免疫不全マウス (NOG マウス) への皮下移植により造腫瘍能を検証した。幹細胞マーカーの発現は western blot 法・realtime PCR 法で検証した。マイクロアレイで遺伝子発現を確認した。

(3) 遺伝子発現抑制

shRNA 発現レンチウイルスベクターを用い遺伝子発現を抑制した。抑制後に上記の機能評価を行った。

(4) 特異的阻害剤による機能抑制

ALDH 特異的阻害剤ジスルフィラム, GLUT 特異的阻害剤 BAY876 添加による細胞増殖への影響, および同剤のマウスへの投与による腫瘍形成能への効果を検証した。

4. 研究成果 (Mori et. Al., *Stem Cell Reports* 2019)

(1) ALDH 高活性スフェロイド細胞ががん幹細胞性質を保持する (図 1)

安定的に培養した子宮体癌・卵巣がんのスフェロイド細胞中の ALDH 高活性細胞が,

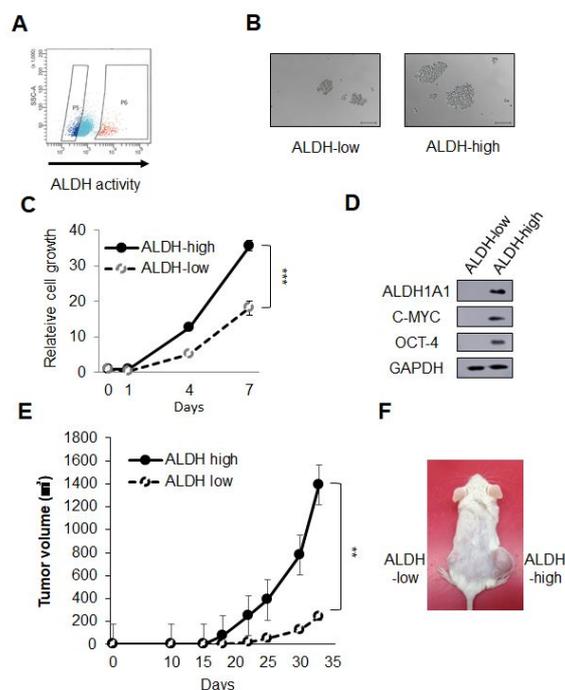


図1 ALDH高活性細胞ががん幹細胞性質を保持する

高い腫瘍形成能やスフェロイド形成能，幹細胞マーカーの高発現などのがん幹細胞性質を呈していることを確認した。

(2)ALDH 活性の抑制はスフェロイド形成能・腫瘍形成能を抑制する(図2)

shRNA 発現レンチウイルスベクターによる ALDH 発現抑制または ALDH 阻害剤ジスルフィラムによる ALDH 活性の抑制はスフェロイド形成能を抑制し，幹細胞マーカーの発現を抑制した。

またジスルフィラム投与は腫瘍形成能を抑制した。

(3)糖輸送体 GLUT1 の抑制はスフェロイド形成能を抑制する(図3)

ALDH 高活性細胞は ALDH 低活性細胞に比し，解糖系，特に糖の取り込みが亢進していた。両細胞間でとりわけ糖輸送体 GLUT1 の発現差を認めた。shRNA 発現レンチウイルスベクターによる GLUT1 発現抑制または GLUT 阻害剤 BAY876 による GLUT 発現抑制は，糖取り込みの抑制とともに，スフェロイド形成能・幹細胞マーカー発現を抑制した。

(4)ALDH 阻害剤または GLUT1 阻害剤と抗がん剤パクリタキセルは相乗的に子宮体癌の腫瘍形成能を抑制する(図4)

これまでの結果より，ALDH 阻害剤および GLUT 阻害剤ががん幹細胞に対する抑制効果を示した。一方，ALDH 高活性がん幹細胞は抗がん剤パクリタキセルに対する感受性が ALDH 低活性細胞に比し低かった。そこで，ALDH 活性阻害剤または GLUT 阻害剤とパクリタキセルの相乗効果を検証した。

スフェロイド細胞移植後の免疫不全マウスに両剤を投与すると，相乗的な腫瘍抑制効果が得られた。

以上より，ALDH または GLUT を標的としたがん幹細胞特異的治療への展開が期待される。

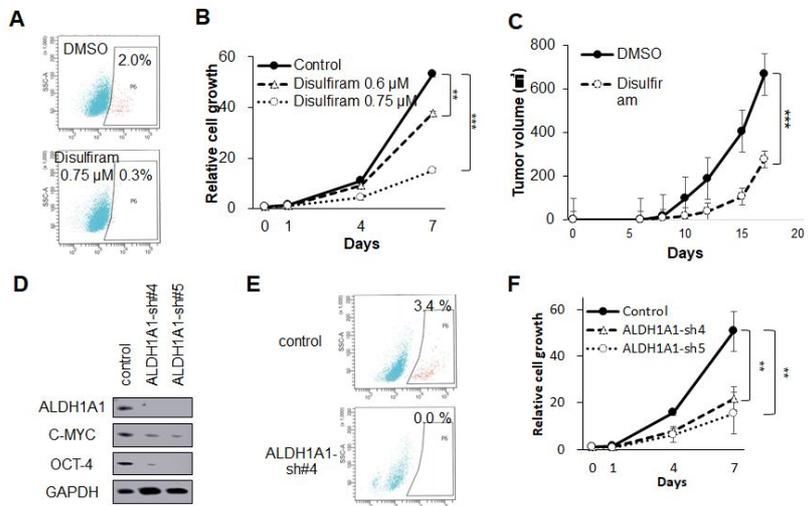


図2 ALDH活性抑制はスフェロイド形成能・腫瘍形成能を抑制する

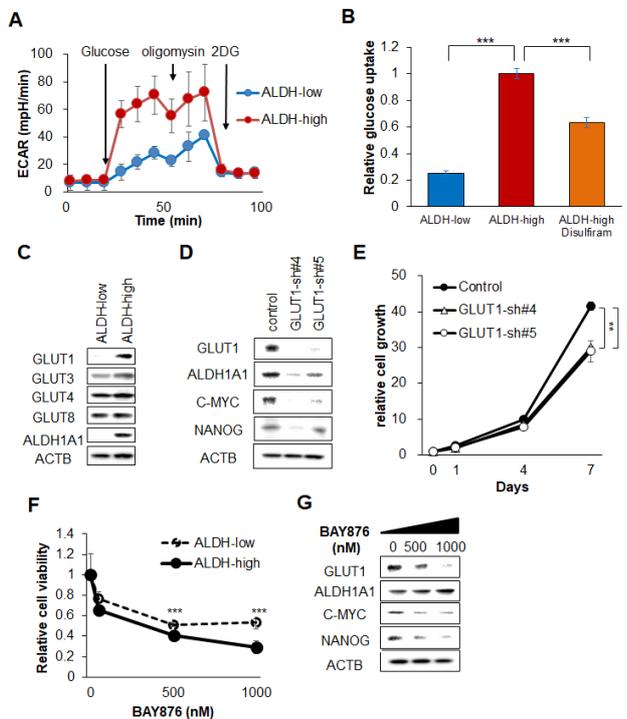


図3 糖輸送体GLUT1発現抑制はスフェロイド形成能を抑制する

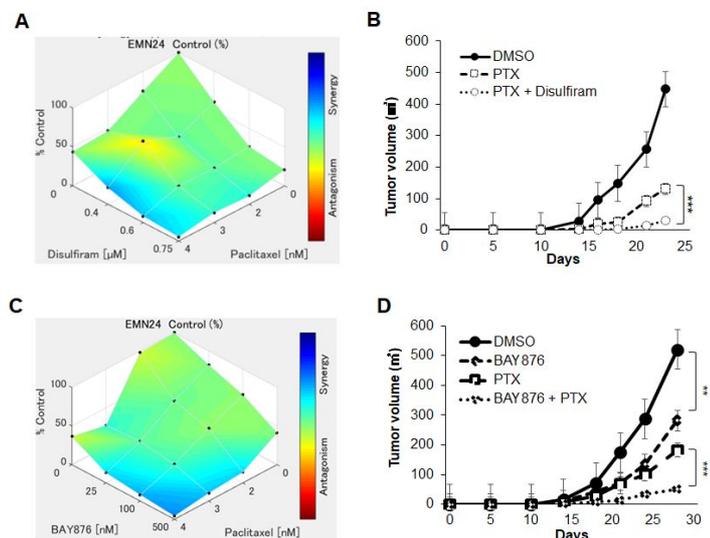


図4 ALDH阻害剤またはGLUT阻害剤とはパクリタキセルの併用は相乗的に腫瘍形成を抑制する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mori Y, Yamawaki K, Ishiguro T, Yoshihara K, Ueda H, Sato A, Ohata H, Yoshida Y, Minamino T, Okamoto K, Enomoto T	4. 巻 13
2. 論文標題 ALDH-dependent glycolytic activation mediates stemness and Paclitaxel resistance in patient-derived spheroid models of uterine endometrial cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 730
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2019.08.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ueda H, Mori Y, Yamawaki K, Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Sugino K, Yachida N, Yamaguchi M, Suda K, Tamura R, Yoshihara K, Okamoto K, Enomoto T.	4. 巻 2
2. 論文標題 Establishment of in vitro 3D spheroid cell cultivation from human gynecologic cancer tissues.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2021.100354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	榎本 隆之 (Enomoto Takayuki) (90283754)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------