

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390454

研究課題名（和文）癌幹細胞をターゲットにした新規卵巣癌治療薬の開発

研究課題名（英文）The development of novel therapeutic strategies for targeting ovarian cancer stem cells

研究代表者

片瀨 秀隆（KATABUCHI HIDETAKA）

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：90224451

## 研究成果の概要（和文）：

様々な腫瘍組織において自己複製能を有する癌幹細胞とそこから分化した癌細胞からなる階層性の存在が近年明らかにされ、その起源は正常組織内の組織幹細胞あるいは前駆細胞であるという見解が示されている。上皮細胞接着分子(Epithelial cell adhesion molecule: EpCAM)は細胞接着に関与するI型膜タンパクであり、胚性幹細胞や他の正常組織における組織幹細胞との関連性が指摘されている。また、様々な固形癌における癌幹細胞マーカーとしての報告があり、上皮性卵巣癌（卵巣癌）においても予後不良因子として重要である。われわれはこれまでの研究で、マウス卵巣における組織幹細胞の候補マーカーの同定を試みるとともに、同細胞集団に対して遺伝子操作による発癌誘導を行うことで癌幹細胞を頂点とした階層性を有する実験モデルを樹立することに成功した。

今回、樹立した卵巣癌幹細胞マウスモデルは、癌化の標的細胞ならびに発癌に関わる分子イベントの解析を可能にし、組織幹細胞ならびに癌幹細胞の包括的な理解、さらには創薬のための実験モデルとしても有用である。将来的には、卵巣癌幹細胞に関与する分子シグナルを標的とした卵巣癌治療への展開が期待される。

## 研究成果の概要（英文）：

Emerging evidence suggests that human cancers arise from normal stem cells, and are composed of hierarchies of cells sustained by tumor-initiating cells (T-ICs), conceptually termed cancer stem cells (CSCs). Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is a type I transmembrane glycoprotein that is expressed specifically in epithelial tissues and is overexpressed in some epithelial cancers. In normal tissues, EpCAM is expressed in several types of epithelial stem/progenitor cells and contributes to tissue development. On the other hand, a subpopulation of EpCAM-positive cells has been identified as CSCs in some human cancers. In the light of these considerations, we evaluated the EpCAM-positive cells for their stem cell properties in adult mouse ovary, and established the ovarian T-ICs by introduction of defined genetic elements in EpCAM-positive cells. EpCAM-positive cells possess the hallmarks of somatic stem cells and CSCs in this mouse model of ovarian tumorigenesis. Furthermore, our experimental mouse model facilitates further studies toward a comprehensive understanding of normal stem cells and CSCs in ovary. Ultimately, such studies will be imperative to define whether eradication of ovarian CSCs is critical for effective therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、産婦人科学

キーワード：上皮性卵巣癌・癌幹細胞・卵巣表層上皮・卵巣癌治療・卵巣癌モデル

1. 研究開始当初の背景

本邦において、上皮性卵巣癌（卵巣癌）は近年著しい増加を示しており、その死亡数は1950年から2000年の半世紀の間に11.5倍に増加している。卵巣癌は早期診断が困難であり、すでに腹膜播種や遠隔転移を来した進行癌で診断されることが多い。白金製剤やタキサン系薬剤の登場以来、5年生存率の向上をみてきたが、長期生存率は依然として不良である。初回治療が奏効し寛解が得られた場合でも、その多くの症例で抗癌剤耐性癌細胞の出現を免れず、再発を繰り返すことになる。

癌治療の領域において癌細胞の特性を規定する分子機構が明らかにされるに伴い、それらの機構に関与する分子標的を明確にし、その機能を特異的に制御する分子標的治療が、抗悪性腫瘍薬開発において中心的な役割を果たすようになってきた。実際、多くの悪性腫瘍において新たな分子標的薬が続々と臨床に導入され、その有効性が示されてきたが、卵巣癌に対する分子標的薬は未だ承認取得には至っていない。卵巣癌の再発症例、特に従来の抗癌剤治療に抵抗性の腫瘍においては、分子標的薬の重要性が今後さらに高まっていくことが予想される。新規分子標的薬の開発は現在の卵巣癌治療に課せられた焦眉の命題である。

従来の古典的な細胞障害性の抗癌剤は、“total kill theory”として強力な殺腫瘍効果をもって癌の制圧を目指すものであった。しかし、われわれが日常の卵巣癌診療においてしばしば遭遇する治療抵抗性あるいは寛解後の再発・転移など、既存の抗癌剤治療に対して限界を感じることも少なくない。このような治療抵抗性や再発において、一群の細胞集団である“癌幹細胞”の関与が指摘され、その知見が急速に集積されている。即ち、自己複製能をもつ癌幹細胞とそこから分化した癌細胞からなる階層性の存在が明らかにされ、その起源は正常組織内の組織幹細胞あるいは

は前駆細胞であるという見解が示されている。癌幹細胞は特殊な微小環境である“ニッチ”に存在することで、自己の細胞周期を静止期に保ち休眠状態のまま維持されていることが知られている。つまり、従来の細胞障害性抗癌剤は分裂・増殖が活発な癌前駆細胞あるいはより分化した癌細胞を標的にしているに過ぎず、階層性の頂点に位置する癌幹細胞の根絶には不十分であり、いわゆる“total kill theory”の完遂には至っていないことが窺われる。したがって、一時的な腫瘍の縮小効果が得られた場合においても、癌幹細胞が残存する限り再発が引き起こされる。

1997年に Bonnet *et al.*は、世界で初めて癌幹細胞の存在を証明した。彼らは、正常造血幹細胞がCD34陽性/CD38陰性の細胞分画に濃縮して存在していることに基づき、ヒト白血病細胞をCD34陽性/CD38陰性分画およびCD34陽性/CD38陽性分画にそれぞれ分離し免疫不全マウスへの移植を行った。その結果、CD34陽性/CD38陽性の細胞集団ではマウスに白血病を発症させることができなかったが、CD34陽性/CD38陰性の細胞では高率に白血病を発症させることを見出し、この細胞群を白血病幹細胞と称した。固形癌においては、2003年の乳癌幹細胞の発見を皮切りに、脳腫瘍、前立腺癌、大腸癌や膵臓癌などで相次いで癌幹細胞の存在およびそのマーカーとなる細胞表面抗原が報告された。

上皮細胞接着分子（EpCAM）は、細胞接着に関与するI型膜タンパクであり、胚性幹細胞や他の正常組織における組織幹細胞との関連性が指摘されている。一方、ヒト乳癌、肝臓癌、大腸癌、膵臓癌など様々な固形癌における癌幹細胞マーカーとして報告されている。これまでに卵巣癌幹細胞の細胞表面マーカーとして、CD44/CD117やCD133などが報告されているが、EpCAMを卵巣癌幹細胞のマーカーとする報告はみられていない。

## 2. 研究の目的

以上の背景から、卵巣癌治療において分子学的根拠に基づいた治療戦略が必要であることは明らかで、われわれは治療抵抗性ならびに再発の原因と考えられている癌幹細胞を標的とした卵巣癌の新規治療戦略を開発することを最終目標に掲げた。

従来の細胞障害性の抗癌剤治療は、慶應義塾大学医学部先端医科学研究所の佐谷秀行教授らが指摘する「芝刈り」的な治療にとどまり、一時的な腫瘍の縮小効果が得られた場合でも、「根」に相当する卵巣癌幹細胞が残存する限り再発を繰り返すことになる。

われわれは過去四半世紀にわたる卵巣癌研究の中で、卵巣癌の母細胞とされているヒト卵巣表層上皮 ovarian surface epithelium(OSE)を用いて染色体安定性の不死化細胞株 (HOSEC) を樹立し、この細胞に癌関連遺伝子を導入することで腫瘍形成性細胞株を作成することに成功した。しかし、*in vivo* で形成されたこの腫瘍の組織型は未分化癌であり、また多くの種類の癌関連遺伝子の導入が必要であったことから、樹立した不死化細胞を用いた実験の見直しを迫られた。その中で、前立腺癌や肺癌では、正常細胞から不死化の過程を経ることなく発癌モデルの樹立に成功している。ヒト卵巣における組織幹細胞に関する報告はこれまでほとんどみられず、またヒト卵巣癌に特異的な組織型(漿液性腺癌、粘液性腺癌、類内膜腺癌、明細胞腺癌)の発癌モデルは未だに皆無である。そこで、われわれは先ず卵巣における組織幹細胞の同定を試みるために、マウス卵巣を用いることで網羅的に組織幹細胞の候補マーカを検証した。

癌幹細胞を標的とした卵巣癌の新規治療戦略を開発するために、卵巣組織における組織幹細胞と癌幹細胞のそれぞれの特性および相互関係を究明し、また、組織幹細胞を含む細胞集団に対して不死化の過程を経ることなく癌関連遺伝子を導入することで、卵巣癌に特異的な組織型の発癌モデルの樹立を目指した。さらには癌幹細胞を頂点とした階層性を有する実験モデルを樹立することで卵巣癌幹細胞の生物学的特性を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

われわれは、マウス卵巣に存在する EpCAM 陽性細胞に特定の遺伝子操作を加えることにより、自己複製能と多分化能を獲得したうえで腫瘍を形成することができる細胞(induced ovarian tumor-initiating cell)の樹立を目指した。これら少数の細胞を免疫能が正常のマウスに同所移植することで、ヒト卵巣癌に生物学的および組織学的に類似した腫瘍を誘導することが可能であると考

えられる。形成された卵巣癌組織において、EpCAM 陽性の腫瘍細胞が癌幹細胞としての特性を有していることを検証する。フローサイトメトリーを用いることで癌幹細胞と非癌幹細胞の両方の性質を比較することが可能であり、これらの手法によって癌幹細胞と非癌幹細胞それぞれにおいて幹細胞関連遺伝子および抗癌剤耐性に関わる遺伝子等の *in vitro* での解析を行う。加えて、これらのマウス卵巣腫瘍において EpCAM 陽性細胞とヒト卵巣癌で癌幹細胞マーカーとして報告されている CD44 や CD117 陽性細胞との関連性が明らかにされている。したがって、卵巣癌マウスモデルで得られた結果に基づき、ヒト卵巣癌の臨床検体あるいは卵巣癌細胞株を用いることで、EpCAM がヒト卵巣癌幹細胞としての特性を有するかについて、あるいは CD44 および CD117 との相互作用についての検討を行う。具体的に、EpCAM 陽性あるいは EpCAM 陰性の腫瘍細胞において腫瘍形成性の比較を行い、さらに腫瘍形成性と非腫瘍形成性の違いが階層性(分化度)に基づくものか、あるいは可塑性に基づくものかについても解析を行う。両細胞群間において造腫瘍能の差が見出された場合、RNA 干渉法を用いた EpCAM 遺伝子の発現抑制あるいは EpCAM 遺伝子を EpCAM 陰性の細胞分画に強制発現させることで、EpCAM 遺伝子の下流シグナルの同定を試みる。これらの方法によって、癌幹細胞に関連した遺伝子発現パターンおよび特異的細胞表面抗原や転写因子の発現等を詳細に解析し、特に CD44 や CD117 との相互関係についての検証を行う。また、卵巣癌の臨床検体において、同定された分子シグナルが予後や再発に影響を及ぼすかについて免疫組織化学による検討を行い、その臨床病理学的意義について統計学的な解析を行う。さらなる展開として、われわれが樹立したマウスモデルを用いて、*in vivo* における癌幹細胞を標的とした抗体療法や抗癌剤治療との併用による治療効果の判定を行う。

## 4. 研究成果

マウス卵巣における EpCAM 陽性細胞は、サイトケラチン陽性の上皮細胞への分化能および sphere 形成能を有し、組織幹細胞様の性質を有していることが示された。また、発癌誘導実験においては、上記の方法により形質転換した細胞をマウス卵巣に同所移植することで、ヒト卵巣癌で見られる Type II 腺癌に組織的に酷似した腫瘍の形成が認められた。腫瘍細胞の同所移植後、約 3 週間程度で卵巣腫瘍の形成がみられ、ヒト卵巣癌と同様に血性腹水を伴い、腹膜播種による進展形式を呈する。また、形成された卵巣腫瘍は免疫組織化学にて、CA125、サイトケラチン、

EpCAM の発現が確認された。さらに、これらの卵巣腫瘍において EpCAM 陽性の腫瘍細胞が癌幹細胞としての特性を有していることを見出した。これらの卵巣癌マウスモデルは、インテグリンシグナル伝達システムにより、腫瘍の増殖、進展を定量的に評価することが可能である。これらの研究成果は、国内外の多くの学会にて発表し、研究論文として報告した。

またわれわれは、p16 ノックアウトマウスを用いた同様の実験系にて、より分化した Type I の卵巣癌モデルの樹立に成功しており、これらのデータに関しては、論文作成中である。

今回、樹立した卵巣癌幹細胞マウスモデルは、癌化の標的細胞ならびに発癌に関わる分子イベントの解析を可能にし、組織幹細胞ならびに癌幹細胞の包括的な理解、さらには創薬のための実験モデルとしても有用である。将来的には、卵巣癌幹細胞に関与する分子シグナルを標的とした卵巣癌治療への展開が期待される。

#### 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 9 件)

1. T. Motoshara, S. Masuko, T. Ishimoto, T. Yae, N. Onishi, T. Muraguchi, A. Hirao, Y. Matsuzaki, H. Tashiro, H. Katabuchi, H. Saya, O. Nagano. Transient depletion of p53 followed by transduction of c-Myc and K-Ras converts ovarian stem-like cells into tumor-initiating cells. *Carcinogenesis* 32: 1597-1696, 2011 査読有
2. F. Saito, H. Tashiro, Y. To, H. Ohtake, T. Ohba, A. Suzuki, H. Katabuchi. Mutual contribution of Pten and estrogen to endometrial carcinogenesis in a PtenloxP/loxP mouse model. *Int J Gynecol Cancer* 21: 1343-1349, 2011 査読有
3. O. Ishibashi, MM. Ali, SS. Luo, T. Ohba, H. Katabuchi, T. Takeshita, T. Takizawa. Short RNA duplexes elicit RIG-I-mediated apoptosis in a cell type- and length-dependent manner. *Science Signaling* 8: 4(198): ra74, 2011 査読有
4. T. Ishimoto, O. Nagano, T. Yae, M. Tamada, T. Motoshara, H. Oshima, M. Oshima, T. Ikeda, R. Asaba, H. Yagi, T. Masuko, T. Shimizu, T. Ishikawa, K. Kai, E. Takahashi, Y. Imamura, Y. Baba, M.

Ohmura, M. Suematsu, H. Baba, H. Saya. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell* 19: 387-400, 2011 査読有

5. K. Takaishi, Y. Komohara, H. Tashiro, H. Ohtake, T. Nakagawa, H. Katabuchi, M. Takeya. Involvement of M2-polarized macrophages in the ascites from advanced epithelial ovarian carcinoma in tumor progression via Stat3 activation. *Cancer Sci* 101: 2128-2136, 2010 査読有

6. K. Motoshara, H. Tashiro, Y. Taura, T. Ohba, H. Katabuchi. Immunohistochemical analysis of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes in human ovarian surface epithelium and epithelial ovarian carcinoma. *Med Mol Morphol* 43: 197-203, 2010 査読有

7. T. Motoshara, H. Tashiro, Y. Miyahara, I. Sakaguchi, H. Ohtake, H. Katabuchi. Long-term oncological outcomes of ovarian serous carcinomas with psammoma bodies: A novel insight into the molecular pathogenesis of ovarian epithelial carcinoma. *Cancer Science* 101: 1550-1556, 2010 査読有

8. K. Yoshihara, A. Tajima, T. Yahata, S. Kodama, H. Fujiwara, M. Suzuki, Y. Inishi, M. Hatae, K. Sueyoshi, H. Fujiwara, Y. Kubo, K. Kotera, H. Tashiro, H. Katabuchi, I. Inoue, K. Tanaka. Gene expression profile for predicting survival in advanced-stage serous ovarian cancer across two independent datasets. *PLoS ONE* 5: 9615, 2010 査読有

9. R. Sasaki, M. Narisawa-Saito, T. Yugawal, M. Fujita, H. Tashiro, H. Katabuchi, T. Kiyono. Oncogenic transformation of human ovarian surface epithelial cells with defined cellular oncogenes. *Carcinogenesis* 30: 423-431, 2009 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. The 12th Japan-Korea Joint Conference of Obstetrics and Gynecology. (2011年8月31日, Osaka, Japan) Lecture: Molecular Carcinogenesis in Ovarian Cancer 「Epithelial ovarian carcinogenesis: What

we have learned from human ovarian surface epithelial cells?]

H. Katabuchi.

2. The 50th annual congress of Taiwan Association of Obstetrics and Gynecology (March 12, 2011: Kaohsiung)

Long-term oncological outcomes of ovarian serous carcinomas with psammoma bodies.

T. Motohara, H. Tashiro, H. Ohtake, R. Honda, T. Ohba, H. Katabuchi.

3. 1<sup>st</sup> Asan Kumamoto-Joint Symposium on Gynecologic Cancer (February 19, 2011: Seoul, Korea)

Identification of EpCAM as a marker for somatic stem-like cells and cancer stem cells in mouse models of ovarian tumorigenesis.

T. Motohara, O. Nagano, H. Tashiro, H. Saya, H. Katabuchi.

4. Zhejiang University-Kumamoto University Life Science Symposium (2010年12月13日, Hangzhou, China) Lecture  
「Epithelial ovarian cancer toward the novel therapeutic strategy」

H. Katabuchi.

5. Asian Society of Gynecologic Oncology 1st International Workshop on Gynecologic Oncology (2010年8月1日, Seoul, Korea)  
Lecture: Molecular Targeted Therapy of Ovarian Cancer 「Putative precursor cells, risk factors, and molecular mechanisms of its carcinogenesis」

H. Katabuchi.

6. The 13th Japan-Korea Joint Meeting for Gynecological Pathology (2009年9月19日, Damyang, Korea) Lecture

「Pathophysiological dynamics of human ovarian surface epithelial cells in epithelial ovarian cancer」  
risk factors, and molecular mechanisms of its carcinogenesis」

H. Katabuchi.

7. The Inaugural Symposium of Asan Cancer Center (2009年4月1日, Seoul, Korea)  
Special lecture 「A new tool to investigate the tumorigenesis and therapeutic modalities of epithelial ovarian cancer」

H. Katabuchi.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片瀨 秀隆 (KATABUCHI HIDETAKA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：90224451

### (2) 研究分担者

田代 浩徳 (TASHIRO HIRONORI)

熊本大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：70304996

本原 剛志 (MOTOHARA TAKESHI)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10457591