

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 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791521

研究課題名（和文）子宮内膜癌幹細胞の同定と難治性癌治療法開発への応用

研究課題名（英文）Identification of cancer stem cells and establishment of new target therapy in endometrial cancer

研究代表者

中村 充宏（MITSUHIRO NAKAMURA）

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：50377397

研究成果の概要（和文）：子宮内膜癌において CD133 陽性細胞は自己増殖、分化そして造腫瘍能を有しており癌幹細胞マーカーであることを明らかにした。また CD133 は臨床病理学的に予後不良因子であった。また子宮内膜癌幹細胞を分子生物学的に解析した結果、抗癌剤に抵抗性を示す遺伝子及び浸潤、転移に関与する遺伝子の発現が亢進しており悪性度の高い細胞集団であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In endometrial cancer cells, CD133-positive cells had properties of self-renewal, tumorigenesis and differentiation, suggesting that CD133 was a potential cancer stem cell (CSC) marker. Immunohistological analysis showed that CD133 expression was significantly associated with overall survival and the independent predictive factor of survival. Furthermore, endometrial CSCs demonstrated high expression of genes associated with multi-drug resistance, invasion and metastasis, indicating that endometrial CSCs are aggressive malignant cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：婦人科腫瘍学

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：子宮内膜癌、幹細胞、CD133

1. 研究開始当初の背景

人類創生以来の難病である癌は、遺伝子異

常が本質であることが明らかとなり現在でも解明が続けられている。古くから癌においてはすべての細胞が自己複製能、無限増殖能

を有した均一な細胞集団、いわゆるモノクローナルな集団であると考えられてきた。しかしながら近年すべての癌細胞が上記の性質を有しているのではなく、自らと同じ細胞を維持する自己複製能、分化によって周囲の大多数の癌細胞を生み出す多分化能、そして高い増殖能力、造腫瘍能を持った少数の癌幹細胞が存在するのではないかと世界中で注目を集めている。

癌幹細胞に関する初めての論文は、Lapidot らが白血病において表面マーカーである CD34(+)CD38(-)の細胞が幹細胞の性質を有していることを報告している(Nature, 1994)。その後、乳癌(Ai-Haji et al. PNAS, 2003)、脳腫瘍(Singh et al. Nature, 2004)、肺癌(Eramo et al. Cell Death Differ, 2008)、膵臓癌(Li et al. Cancer Res, 2007)、大腸癌(O'Brien et al. Nature, 2007)、肝細胞癌(Yang et al. Cancer Cell, 2008)そして前立腺癌(Gu et al. Cancer Res, 2007)において、特定の表面マーカーを有する少数の細胞集団が癌幹細胞様の性格を持つのではないかとの報告が数多くなされている。しかしながら子宮頸癌、子宮体癌そして卵巣癌などの婦人科悪性腫瘍領域においてはこれまでほとんど報告がなされていない。

2. 研究の目的

婦人科悪性腫瘍の中でも、近年増加傾向にある子宮内膜癌に注目し癌幹細胞の同定を行う。同定された子宮内膜癌幹細胞を詳細に解析し、これらをターゲットにした分子標的治療の基礎実験を通じて難治性子宮内膜癌治療法開発への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた実験。

子宮内膜癌細胞株である Ishikawa、HEC1A、AN3CA、RL95-2、MFE280、MFE296 を用いた。これらの細胞について、表面マーカーである CD133、CD44、Hoechst44432 の発現をフローサイトメトリーにて検討した。発現が認められた細胞を CD133 陽性、陰性細胞に単離し細胞増殖能、造腫瘍能、分化能、自己増殖能、抗癌剤感受性について検討を行った。また分子生物学特徴を解析するためにマイクロアレイを用いて遺伝子解析を行った。得られた結果を基に詳細なる検討を行った。

(2) 臨床検体を用いた実験

子宮内膜癌の診断のもとに、手術にて切除した子宮内膜癌組織について同意を得た上で検体からパラフィン切片を作製し、免疫染色を行った。染色された細胞の局在、頻度を病理形態学的に検討した。また進行期や悪性度、転移、浸潤の有無や予後の関係についても検討し、臨床病理学的意義について解析を行った。

4. 研究成果

子宮内膜癌細胞株 6 種類について、CD133 の発現をフローサイトメトリーにて確認をしたところ 2 種類の細胞株(Ishikawa、MFE80)に 10-20%の頻度で CD133 陽性細胞を認めた。これらの細胞について CD133 陽性、陰性細胞に分離し検討を行った結果、CD133 陽性細胞は陰性細胞に比べ、著明な細胞増殖の亢進、in vitro、in vivo での造腫瘍能そして抗癌剤の抵抗性を認めた。また CD133 陽性細胞が自己複製に関与する遺伝子群の発現を有していること(自己複製能)や CD133 陽性細胞のみが陽性細胞を継代できる(分化、不均等分裂)ことを確認した。これらの結果より CD133 陽性細胞が癌幹細胞としての特徴を有して

おり CD133 が子宮内膜癌細胞における癌幹細胞マーカーであることを同定した。さらに当科での子宮内膜癌症例による免疫組織学的検討の結果、CD133 の発現は Overall survival と有意に相関し独立した予後因子であった。

更なる癌幹細胞マーカーを同定するため種々のマーカーを用いて検討を行ったところ、CD44 と Hoechst33342 (Side population) 陽性の細胞が癌幹細胞としての特徴を有していた。CD133 を含めた複数のマーカーを用いて癌幹細胞の絞り込みを行った結果 CD133+/CD44+/Side population の分画がより純化された癌幹細胞であることを突き止めた。

子宮内膜癌幹細胞の分子生物学的特徴について検討を行った。マイクロアレイを用いて幹細胞と非幹細胞との間で遺伝子発現 Profile を比較検討した。解析した約 25,000 遺伝子のうち約 500 遺伝子において癌幹細胞で発現が亢進していた。まず初めに、抗癌剤抵抗性遺伝子である ABCG2 に注目した。ABCG2 は Side population (SP) に関連する遺伝子であり SP 細胞が子宮内膜癌において癌幹細胞であることを明らかにしている。そこで子宮内膜癌細胞において SP 細胞が non-SP 細胞に比し、抗癌剤抵抗性であることを In vitro chemosensitivity assay にて確認した。次に CD133 陽性、陰性細胞において ABCG2 の発現を RT-PCR 法にて、SP 細胞に割合をフローサイトメトリーにて検討したところ、ABCG2 の発現、SP 細胞の割合共に CD133 陽性子宮内膜癌細胞において上昇していた。CD133(+)/SP、CD133(+)/non-SP、CD133(-)/SP、そして CD133(-)/non-SP の 4 分画に細胞を分離し細胞増実験を行ったところ、CD133(+)/SP 細胞が他の 3 分画細胞に比べ細胞増殖の亢進と造腫瘍能を有していた。以上の結果より

CD133(+)/SP 細胞がより純化された癌幹細胞であり治療性抵抗性に重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

次に MT1-MMP (MMP14) に注目し In vitro invasion assay にて癌幹細胞の浸潤能が有意に亢進していることを確認した。MT-MMP1 の発現を si-RNA で抑制したところ浸潤能は有意に減弱したことより MT-MMP 1 が内膜癌の浸潤、転移に中心的役割を演じている可能性が示唆された。

これらの結果は難治性子宮内膜癌のメカニズムの解明及び治療法の開発に有意義なものであると考えられる。

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 1 件)

- ① Nakamura M, Kyo S, Zhang B, Zhang X, Mizumoto Y, Takakura M, Maida Y, Mori N, Hashimoto M, Ohno S, Inoue M. Prognostic impact of CD133 expression as a tumor-initiating cell marker in endometrial cancer. Human Pathology, 41 (2010), 1516-1529, 査読有
DOI:10.1016/j.humpath.2010.05.006

[学会発表] (計 6 件)

- ① 中村 充宏、婦人科悪性腫瘍における癌幹細胞の同定と癌幹細胞をターゲットとした分子標的治療の基礎的研究、第 51 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会、平成 23 年 11 月 25 日、ホテルマリターレ創世 (福岡県)
- ② 中村 充宏、子宮内膜癌幹細胞の分化能に関する検討、第 70 回日本癌学会学術総会、平成 23 年 10 月 4 日、名古屋国際会議場 (愛知県)

③中村 充宏、子宮内膜癌幹細胞における遺伝子解析の検討、第 63 回日本産科婦人科学会総会学術講演会、平成 23 年 8 月 30 日、大阪国際会議場(大阪府)

④ Mitsuhiro Nakamura, Analysis of gene profile and identification of molecular targets in endometrial cancer stem cells, American Association for Cancer Research (AACR) 102th Annual Meeting, April 5, 2011, Orange country Convention center, (USA)

⑤中村 充宏、子宮内膜癌における癌幹細胞の同定とそれらをターゲットとした分子標的治療の基礎的研究、第 69 回日本癌学会学術総会、平成 22 年 9 月 24 日、大阪国際会議場(大阪府)

⑥中村 充宏、子宮内膜癌細胞における癌幹細胞マーカーの検索、第 9 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会、平成 22 年 9 月 10 日、大津プリンスホテル(滋賀県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 充宏 (MITSUHIRO NAKAMURA)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号：50377397

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし