

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 4 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22791549

研究課題名（和文） ALDH1 活性を指標にした子宮内膜・子宮体癌幹細胞の解析

研究課題名（英文） Analysis of ALDH1 activity in stem cells of endometrium and endometrial cancer

研究代表者

須賀 新 (SUGA SHIN)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70445542

研究成果の概要（和文）：正常子宮内膜組織の初代培養細胞には ALDH1 活性のある細胞集団をみとめた。高 ALDH1 活性細胞と低 ALDH1 活性細胞の間に HER2 の有意な発現の差はみとめなかった。子宮体癌幹細胞は ALDH1 の有意な発現亢進をみとめた。子宮体癌細胞株に dbpC を導入すると、幹細胞の割合が増加するとともに、ALDH1 の発現が亢進した。以上より、ALDH1 は子宮体癌幹細胞のマーカーになることが示された。

研究成果の概要（英文）：Primary cultured cells derived from normal human endometrium contained ALDH1-high population. There was no difference of expression of HER2 between ALDH1-high cells and -low cells. ALDH1 activity was enhanced in endometrial cancer stem cells compared with that in non-stem cells. Introduction of dbpC to endometrial cancer cells enhanced subpopulations of stem cells as well as the level of ALDH1 expression. These results demonstrated that ALDH1 was a candidate for marker of endometrial cancer stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

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

キーワード：子宮内膜 子宮体癌幹細胞 side population ALDH1

1. 研究開始当初の背景

最近、乳癌、脳腫瘍、白血病などの癌で癌幹細胞の存在が報告されている。

我々は組織幹細胞の同定に使用される

Hoechst33342 の取り込みの低い分画の細胞 (side population cells, 以下 SP 細胞) を分離する方法を用いて 正常子

宮内膜に SP 細胞が存在し幹細胞様の性質を持つことを報告した(図 1)

(K.Kato et al. Hum Reproduction, 2007)。また、最近、癌の初代培養細胞、子宮体癌細胞株 (Hec1) にも SP 細胞が存在し、nonSP 細胞に比べ間葉系細胞の性質が強くなること、運動能や造腫瘍能が亢進することを報告した(図 2) (K Kato et al.Am J Pathol, in press)。

SP 細胞以外に、aldehyde dehydrogenase activity(ALDH)1 活性をもつ細胞が幹細胞の特性をもつことが、血液、神経、白血病、多発性骨髄腫で報告されていた (Amstrong et al.2004;Hess et al. 2004,2006;Matsui et al.2004,Pearce et al.2005)。2007 年に Ginestier らは、正常乳腺および乳癌においても ALDH1 活性の高い細胞が、自己複製能や多分化能、造腫瘍能の亢進といった幹細胞の性質を示すことを in vitro で明らかにし、577 例の乳癌臨床検体を免疫染色法で解析し、ALDH1 の発現レベルが高いと予後が不良であることを報告した (Hazard ratio 1.76, $p<0.028$)。また、最近 Huang らは、正常大腸や大腸癌においても、ALDH1 活性が幹細胞のマーカーとなり、NOD/SCID マウスにおける腫瘍形成を亢進させることを報告した。

乳癌において、約 20~30%に HER2 の過剰発現があり、転移や再発率と関連が

あることが知られているが、2008 年 Korkaya らは、正常乳腺細胞に HER2 を過剰発現させると、ALDH1 活性の高い細胞が増加し、NOD/SCID マウスに移植すると過形成病変を形成すること、乳癌細胞に過剰発現させると、ALDH1 活性の高い細胞が増加し、in vitro での浸潤能が NOD/SCID マウスにおける造腫瘍能を亢進することを報告した。

以上より ALDH1 活性は組織、癌の種類を超えて幹細胞のマーカーになること、ALDH1 活性と HER2 発現の間には正の相関があり、HER2 過剰発現細胞は幹細胞の性質をもつことが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、最近幹細胞のマーカーとして報告され乳癌において HER2 発現との関連が示された aldehyde dehydrogenase activity(ALDH)1 活性の高い細胞を正常子宮内膜、子宮体癌の初代培養細胞から分離し、その性質を SP 細胞と比較しながら、幹細胞の特性をもつかを検討する。また、免疫組織染色法により ALDH1 や HER2 の発現を検討し正常子宮内膜は月経周期との、子宮体癌は組織分化度、進行期との相関を評価する。さらにヒト正常子宮内膜細胞株に活性化型 K-Ras および HER2 を過剰発現させ、それぞれの細胞の ALDH1

活性、SP 細胞の比率を比較するとともに、それぞれの高 ALDH1 発現細胞、SP 細胞の細胞特性、増殖、細胞死に関するシグナル経路の相違点を検討する。

3. 研究の方法

- 1) 同意を得られた子宮筋腫の患者から正常子宮内膜を、子宮体癌患者から子宮体癌組織を採取し、コラゲナーゼ処理し細胞を初代培養する。
- 2) Aldefluor kits を用いて、ALDH1 活性を解析するとともに、高 ALDH1 発現細胞と低 ALDH1 発現細胞を分取する。
- 3) 高 ALDH1 発現細胞と低 ALDH1 発現細胞を Hoechst 33342 で染色し、それぞれの SP 細胞の比率を比較する。
- 4) 高 ALDH1 発現細胞と低 ALDH1 発現細胞の HER2 発現を real-time PCR と Western blot 法で解析する。
- 5) SP 細胞と NSP 細胞を分離しタイムラプスビデオスコープにより、細胞分裂や運動能の変化を経時的に観察する。
- 6) 内因性 dbpC の発現がみとめられない子宮体癌 Ishikawa (IK) 細胞株に幹細胞との関連が示唆されている dbpC 発現ベクターを形質導入し、過剰発現株 (IK-dbpC 細胞) を樹立し、SP 細胞の出現と ALDH1 の発現を解析した。

4. 研究成果

- 1) 同意を得られた子宮筋腫の患者から正常子宮内膜組織を採取しコラゲナーゼ処理し細胞を初代培養した。
- 2) Aldefluor kits を用いて、ALDH1 活性を解析したところ、5 例中 3 例に

ALDH1 活性のある細胞集団をみとめた。高 ALDH1 活性細胞と低 ALDH1 活性細胞を分取した。分取した高 ALDH1 活性細胞と低 ALDH1 活性細胞を抗 ALDH1 抗体で染色し、発現を確認した。

3) HER2 の発現をリアルタイム PCR により解析したが、有意な発現の差はみとめなかった。

4) 次に子宮体癌細胞株 Hec1 より side population (SP) 細胞と non-SP 細胞を分離した。両者の細胞増殖能・ヌードマウス上の造腫瘍能、time-lapse videoscope 観察下での細胞運動能を解析したところ、SP 細胞は nonSP 細胞に比べ分化マーカーの発現が低下、長期増殖能・自己複製能を示し、運動能が著明に亢進していた。また、造腫瘍能も著明に亢進しており、腫瘍細胞だけではなく vimentin や α SMA 陽性の間質に富む腫瘍を形成した。さらに In vitro でも SP 細胞は α SMA 発現細胞への分化を示した。以上より、子宮体癌細胞株 Hec1 細胞の SP 細胞は癌幹細胞の性質を示し、著明な運動能亢進と間葉系細胞への分化能が子宮体癌幹細胞の特徴であると考えられた。

5) それぞれの細胞における ALDH1 の発現をリアルタイム PCR により解析したところ、SP 細胞において有意に発現の亢進をみとめ ALDH1 は子宮体癌幹細胞のマーカーであることが示唆された。

6) 内因性 dbpC の発現がみとめられない子宮体癌 Ishikawa (IK) 細胞株に dbpC 発現ベクターを形質導入し、過剰発現株 (IK-dbpC 細胞) を樹立した。

7) IK-dbpC 細胞は mock 細胞に比べて細胞増殖能が亢進し、幹細胞マーカー ALDH1 の発現が亢進していた。

8) 各細胞株の SP 細胞の割合を解析したところ、mock 細胞に比べ IK-dbpC 細胞において約 10 倍の SP 出現率をみとめた (mock:0.058%, IK-dbpC:0.64%, p=0.03)。

9) IK-dbpC-SP 細胞は長期増殖能を示し再解析により 25% と高率の SP 細胞の再出現をみとめたのに対し、IK-dbpC-nonSP 細胞は 2 週間以内に増殖は停止し細胞死に至った。

10) IK-dbpC 細胞に dbpC siRNA を導入したところ、ALDH1 発現の減少と SP 細胞の割合の減少をみとめた。

以上より ALDH1 の発現が幹細胞分画の side-population 細胞の出現率と相関することが明らかとなった。

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 6 件)

- 1) 今井幸, 須賀新 尾崎理恵, 利岡あゆみ, 木村美葵, 寺尾泰久, 加藤聖子 竹田省, 宮井健太郎 化学療法併用放射線療法が奏効した外陰癌の 1 例、日本産科婦人科学会東京地方部会誌、査読有、60、2011、56-60
- 2) 須賀新, 寺尾泰久, 阿部弥生, 加塚有紀, 金田容秀, 荻島大貴, 竹田省 後腹膜リンパ節郭清術後のリンパ膿瘍についての検討、日本産科婦人科感染症研究会学術講演会誌 査読有、26、2011、50-56
- 3) 須賀新, 寺尾泰久, 楠木総司, 木村美葵, 荻島大貴, 加藤聖子, 杉村基, 竹田省. 婦人科悪性腫瘍手術における深部静脈血栓塞栓症予防のための周術期管理について

心臓、査読無、7: 2010: 956-958

- 4) 須賀新, 木村美葵, 寺尾泰久, 荻島大貴, 竹田省 後腹膜リンパ節郭清術後のリンパ膿瘍についての検討、産婦人科の実際、査読無、59、2010、273-277
- 5) 寺尾泰久, 須賀新, 楠木総司, 木村美葵, 荻島大貴, 加藤聖子, 竹田省, 正岡亜希子, 樋野興夫, 福村由紀, 八尾隆史 子宮内膜症ダグラス窩深部病変から発生したと考えられる腺癌の一例、日本産科婦人科学会関東連合地方部会誌、査読有、47、2010、149-156
- 6) 楠木総司, 須賀新, 木村美葵, 寺尾泰久, 加藤聖子, 竹田省 腹膜偽粘液腫に対し炭酸水素ナトリウムで術中腹腔洗浄し、アミノ酸製剤でアルカロシスを是正しえた 1 例 日本産科婦人科学会東京地方部会誌、査読有、59、2010、214-218

[学会発表] (計 5 件)

- 1) 須賀新, 寺尾泰久, 竹田純, 氏平由紀, 楠木総司, 木村美葵, 金田容秀, 荻島大貴, 加藤聖子, 竹田省 婦人科悪性腫瘍手術における静脈血栓塞栓症に対する FDP-D 測定の有効性について、第 50 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会、2011.07.22-24 (札幌)
- 2) 須賀新, 尾崎理恵, 今井幸, 楠木総司, 金田容秀, 木村美葵, 寺尾泰久, 加藤聖子, 竹田省 骨外性子宮原発骨肉腫の一例、第 63 回日本産科婦人科学会学術集会、2011 8.29-31(大阪)
- 3) Shin Suga, Yasuhisa Terao, Soushi Kusunoki, Miki Kimura, Kiyoko Kato, Satoru Takeda Review of lymphoabscess following retro

peritoneal lymphadenectomy in the gynecological field、The 13rd.IGCS、2010/10/23-26 (Praque)

- 4) 須賀新, 楠木総司, 木村美葵, 寺尾泰久, 加藤聖子, 竹田省 後腹膜リンパ節郭清術後のリンパ腫瘍についての検討、第48回日本婦人科腫瘍学会、2010/7/8-10 (筑波)
- 5) 須賀新, 寺尾泰久, 楠木総司, 木村美葵, 荻島大貴, 加藤聖子, 竹田省 悪性腫瘍手術における静脈血栓塞栓症の周術期管理について、第62回日本産科婦人科学会総会、2010/4/23-25 (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須賀 新 (SUGA SHIN)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：70445542

(3) 連携研究者

加藤聖子 (KATO KIYOKO)
順天堂大学・医学研究科・准教授
研究者番号：10253527