

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390392

研究課題名(和文)子宮体癌幹細胞を標的にした新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of new target therapy for endometrial cancer stem cells

研究代表者

加藤 聖子 (Kato, Kiyoko)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10253527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,500,000円、(間接経費) 2,850,000円

研究成果の概要(和文)：我々は子宮体癌SP細胞はがん幹細胞の特性を持つことを報告した。SP細胞は既存の抗がん剤に対して抵抗性を持ち、新規薬剤の開発が必要である。マイクロアレイ解析にて、SP細胞ではEMTに関するシグナル伝達経路を構成する遺伝子群の発現が亢進していた。そこで、EMT阻害剤として報告されているsalinomycinのSP細胞に対する効果を解析した。salinomycinはSP細胞においてアポトーシスを誘導し、Wntシグナルを抑制することにより、細胞増殖を抑制した。また、運動能、浸潤能やマウス皮下への腫瘍形成も抑制し、子宮体癌幹細胞を標的とした治療薬の候補となることが示された。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that side-population (SP) cells in human endometrial cancer cells have features of cancer stem cells (CSCs). Hec1-SP cells showed enhanced migration and the potential to differentiate into the mesenchymal cell lineage. We analyzed the association of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) with the properties of endometrial CSC. We also assessed the effects of salinomycin (a compound with EMT-specific toxicity) on the proliferative capacity, migration and invasiveness of endometrial CSCs using Hec1-SP cells. We demonstrated that i) EMT processes were observed in SP cells, ii) the level of fibronectin was enhanced in SP cells and salinomycin reduced the level of fibronectin expression, iii) salinomycin induced apoptosis and inhibited Wnt signaling, and iv) salinomycin inhibited the proliferation, migration, invasiveness and tumorigenicity of SP cells. This is the first report of an inhibitory effect of salinomycin on the properties of endometrial CSCs.

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：子宮体癌 癌幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

### (1)子宮体癌幹細胞マーカーの同定と治療法の開発:

最近、乳癌、脳腫瘍、白血病など様々な癌で幹細胞の存在が報告され注目されている。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 (K.Kato. Hum Reprod, 2007)。また、癌の初代培養細胞、子宮体癌細胞株 (Hec1A) にも SP 細胞が存在し、nonSP(以下 NSP)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 (K.Kato. Am J Pathol, 2010)。

### (2)正常子宮内膜幹細胞の発癌機構への関与:

癌が正常組織幹細胞から発生するのか、あるいは分化細胞に遺伝子変異が起こり脱分化され癌化するのかは、未だ不明である。不死化ラット子宮内膜細胞 (RENT4 細胞) は、分化刺激により腺上皮および間質細胞の両方に分化するため前駆細胞の性質をもつことが報告されている。予備的実験で、RENT4にはSP細胞が存在し長期培養により分化マーカー (上皮—E-cadherin, CD9 間質—Vimentin, CD13) の発現上昇や細胞形態の変化が観察された。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、子宮体癌細胞株を用いて、SP 細胞からの癌幹細胞の同定・解析をさらにすすめ、1) 幹細胞と分化細胞との間でマイクロアレイを用いて発現量に差がある遺伝子を同定し、幹細胞マーカーとしての機能をもつかを検討するとともに 2) 幹細胞の特性における epithelial-mesenchymal-transition(EMT) の役割や運動能・浸潤能亢進に関与する分子機構の解明を行う。

(2) 本研究では、不死化ラット子宮内膜細胞株を用い、SP細胞を正常内膜幹細胞の、non-SP細胞を分化細胞のモデルとして、I型にみられる K-ras 遺伝子変異が SP細胞と nonSP細胞それぞれに起こった場合の造腫瘍能、細胞特性の違いを明らかにし、癌化への幹細胞・分化細胞の役割および遺伝子変異の関与を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1)子宮体癌幹細胞マーカーの同定と癌幹細胞を標的にした治療法の開発

我々は子宮体癌細胞株 Hec1 に SP細胞が存在し NSP細胞に比べ、未分化で造腫瘍能、運動能が亢進していることを見いだしている。SP細胞を分離培養し、自己複製能、間質への分化能を解析するとともに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。

未分化細胞・分化細胞の形質発現に関与する遺伝子を同定するため、マイクロアレイにより SP細胞・NSP細胞の間で発現に差があった遺伝子群を検索し、免疫染色法・ウエスタンブロット・real-time PCR で確認する。

EMT 阻害剤 Salinomycin を SP細胞に添加し、増殖能や運動能の変化を解析する。また、EMT 関連遺伝子、前年度同定された幹細胞マーカーの発現の変化を検討する。

### (2) 正常子宮内膜幹細胞の発癌機構への関与

ラット不死化子宮内膜細胞株の SP細胞を正常内膜幹細胞の、NSP細胞を分化細胞のモデルになるかを検討するため、まず、SP・NSP細胞を分離・培養後、不均等分裂・多分化能・自己増殖能を解析し SP細胞が幹細胞の性質をもつことを明らかにする。

SP細胞と NSP細胞のそれぞれに活性化型 K-Ras を導入した細胞株 (RENT4-SP-K12V, RENT4-NSP-K12V) を樹立する。両者の造腫瘍能を比較し K-ras 遺伝子変異が幹細胞に入った場合と分化細胞に入った場合の造腫瘍能

の違いを解析しがん化への幹細胞および K-ras 遺伝子変異の関与を明らかにする。

樹立したそれぞれの細胞の ER 活性やエストロゲン依存性増殖能、幹細胞マーカーの発現を解析するとともに、阻害剤やリン酸化特異的抗体を用いて、増殖・分化に必要なシグナル経路を検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1)子宮体癌幹細胞マーカーの同定と癌幹細胞を標的にした治療法の開発

子宮体癌幹細胞 (RK12V-SP 細胞) と非幹細胞 (RK12V-NSP 細胞) の間で発現の差がある遺伝子群の Pathway 解析を行ったところ、亢進している Pathway の上位 10 の内、8 つが EMT に関与するものであった (図 1)。

EMT に関与している遺伝子の内、fibronectin の発現が有意に上昇していた。

EMT 阻害剤の salinomycin を投与すると、子宮体癌幹細胞は非幹細胞とともに、細胞増殖は抑制された。その機構として、アポトーシスの誘導されていた。

また、salinomycin 投与により、fibronectin の発現は抑制され、運動能も抑制された。

マウスの皮下に子宮体癌幹細胞を移植したところ、salinomycin 投与群は非投与群に比べて、有意に腫瘍形成能が抑制された。

##### (2)正常子宮内膜幹細胞の発癌機構への関与:

ラットの不死化子宮内膜細胞 (RENT4) より分離した SP 細胞 (RSP 細胞) と NSP 細胞 (NSP 細胞) に活性化型 K-ras 遺伝子を形質導入したところ (RSP-K12V 細胞と PNSP-K12V 細胞)、RSP-K12V 細胞は RSP-NSP 細胞に比べて大きな腫瘍を形成した。また RSP-K12V 細胞のみ、継代的に腫瘍を形成した。

RSP 細胞、RSP-K12V 細胞、RSP-K12V 由来腫瘍細胞の順に c-Myc, Oct4 の発現が亢進して

いた。

RSP-K12V 細胞は RSP-NSP 細胞に比べて Estrogen Receptor の発現と転写活性能が亢進していた。

RSP 細胞と RSP-K12V 細胞は estrogen 依存性に増殖したが、RSP-K12V 細胞由来腫瘍細胞は、estrogen 非存在下でも存在下と同様に増殖した。

#### 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 12 件)

(1)Yusuf N, Inagaki T, Kusunoki S, Okabe H, Yamada I, Matsumoto A, Terao T, Takeda S, Kato K: SPARC was overexpressed in human endometrial cancer stem-like cells and promoted migration activity. Gynecol Oncol. (in press)(査読あり)

(2)Kusunoki S, Kato K, Tabu K, Inagaki T, Okabe H, Kaneda H, Suga S, Terao Y, Taga T, Takeda S: The inhibitory effect of salinomycin on the proliferation, migration and invasion of human endometrial cancer stem-like cells. Gynecol Oncol. 2013 Jun;129(3):598-605.

(3)Takeuchi T, Ohishi Y, Imamura H, Aman M, Shida K, Kobayashi H, Kato K, Oda Y: Ovarian transitional cell carcinoma represents a poorly differentiated form of high-grade serous or endometrioid adenocarcinoma. Am J Surg Pathol. 2013; 37(7): 1091-1099

(4)Yoneda T, Kuboyama A, Kato K, Ohgami T, Okamoto K, Saito T, Wake N: Association of MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro polymorphisms with risk of endometrial cancer. Oncol Rep. 2013;30(1): 25-34, 2013

(5)加藤聖子、楠木総司:

がん幹細胞を標的とする治療法の開発 産婦人科の実際 62(3):289-295, 2013

(6)Takao T, Asanoma K, Tsunematsu R, Kato K,

Wake N: The maternally expressed gene Tssc3 regulates the expression of Mash2 transcription factor in mouse trophoblast stem cells through the Akt-Sp1 signaling pathway. 2012; J Biol Chem. 287(51):42685-42694

(7) Kato K, Kusunoki S, Inagaki T, Yusuf N, Suga S, Terao Y, Arima T, Tsukimori K, Takeda S: Side-population cells derived from non-tumorigenic rat endometrial cells are a candidate cell of origin for malignant endometrial tumors. J Stem Cell Res Ther. 2012; doi:10.4172/2157-7633.S7-003

(8) Fukushima K, Tsukimori K, Li D, Takao T, Morokuma S, Kato K, Seki H, Takeda S, Matsumura S, Wake N: Effect of transient TCDD exposure on immortalized human trophoblast-derived cell lines. Hum Exp Toxicol. 2012; 31(6):550-556

(9) Kato K: Stem Cells in Human Normal Endometrium And Endometrial Cancer Cells: Characterization of Side-Population Cells. Kaohsiung Journal of Medical Sciences. 28(2), 63-71, 2012

(10) Kato K: Endometrial cancer stem cells: a new target for cancer therapy. Anticancer Res. 32(6), 2283-2293, 2012

(11) 加藤聖子:  
[子宮体癌の生物学的特性から診断、治療まで] 癌遺伝子と癌幹細胞  
産科と婦人科, 79 (2):203-208. 2012

(12) 加藤聖子:  
[婦人科悪性腫瘍の治療開発とそのシーズ] 子宮体癌・癌幹細胞の関連分子を標的とした治療法の開発  
産婦人科の実際, 61(2):235-243, 2012

〔雑誌論文〕(計 件)

(

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 加藤聖子: 子宮体がん幹細胞の生物学的

特性の解析. 日本内分泌学会学術総会. 2014.4.25 (福岡市)

(2) Kiyoko Kato: Development of new cancer therapy by targeting endometrial cancer stem cells. The 72<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2014.10.3. (Yokohama)

(3) 加藤聖子: 子宮内膜、子宮体癌幹細胞の同定と生物学的特性の解析. 日本内分泌学会九州地方会. 2013.8.24. (沖縄)

(4) 加藤聖子: 子宮体癌幹細胞の同定と新規治療法開発の試み. 関東産科婦人科連合学会. 2013.6.16. (東京)

〔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  
加藤 聖子 ( KATO KIYOKO )  
九州大学大学院医学研究院 教授  
研究者番号: 10253527

(2) 研究分担者  
加藤 和則 ( KATO KAZUNORI )  
東洋大学 理工学部 教授  
研究者番号: 60233780

(3) 研究分担者  
竹澤 俊明 ( TAKEZAWA TOSHIAKI )  
独立行政法人農業生物資源研究所 研究員

研究者番号：50301297