

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32206

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23659787

研究課題名(和文) ミューラー管悪性腫瘍における癌幹細胞の同定と新たな治療戦略の確立

研究課題名(英文) Establishment of cancer stem cells and the therapeutic strategy in malignant Mullerian tumors

研究代表者

江本 精 (MAKOTO, EMOTO)

国際医療福祉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：80258540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：婦人科腫瘍において最も悪性度が高く予後不良な腫瘍の一つである悪性ミューラー管腫瘍(子宮癌肉腫)の生物学的特性については依然として不明な点が多い。我々は過去に樹立したヒト子宮癌肉腫株FU-MMT-1(Emoto M. Cancer 1992)を用いて同腫瘍の癌幹細胞集団を選別した。同幹細胞集団はCD133陽性でOCT4, NANOG, SOX2, C-MYC, BMI-1を有意に発現し、同時にミューラー管遺伝子であるPAX2とWNT-4遺伝子の発現を認めた。CD133陽性FU-MMT-1細胞は高度の血管新生能を有しており、血管新生阻害療法が新たな治療戦略の一つとして有望である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The biological characteristics of malignant Mullerian tumors (Uterine carcinosarcomas) are still unclear. We identified the cancer stem cells in this tumor by using FU-MMT-1 cells, which was established by our own from human uterine carcinosarcoma (Emoto M. Cancer 1992). These cancer stem cells in FU-MMT-1 significantly expressed OCT4, NANOG, SOX2, C-MYC, BMI-1 as well as the Mullerian gene, PAX2 and WNT-4. The CD133 positive FU-MMT-1 cells also possessed high angiogenic activity (high expression of VEGF-A), thus, the anti-angiogenic therapy might be expected as a new therapeutic strategy for these tumors.

研究分野：婦人科腫瘍、癌幹細胞

キーワード：癌幹細胞 ミューラー管腫瘍 子宮癌肉腫 CD133 PAX2 血管新生 VEGF

## 1. 研究開始当初の背景

(1) がん幹細胞(Cancer Stem Cell)の追求は、将来のがん治療を根本的に大きく変動させる可能性を秘めている。近年の知見から、現行の化学療法や放射線療法は分化したがん細胞に対しては殺細胞効果を認めるが、がん幹細胞に対してはほとんどその効果を認めないことが明らかになった。つまり、悪性腫瘍の中に少数存在するとされるがん幹細胞が腫瘍全体をコントロールしているという説(Cancer Stem Cell Theory)が強く支持されるようになった (Nat. Immunol 5,738;2004)。

(2) 現行の治療法では大幅な治癒率の向上は期待薄であり、がん幹細胞を標的とする新たながん治療戦略の開発が特別に注目されているのである。現在、あらゆる悪性腫瘍においてがん幹細胞を探索する研究が活発に行われ始めたが、婦人科領域ではがん幹細胞の同定はまだ明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では婦人科悪性腫瘍の主体である子宮がん(ミューラー管がん)のがん幹細胞を追求し、新たな治療法を創案するのが目的である。我々は婦人科がんの中でも最も未分化であり且つ多分化能を有するミューラー管悪性腫瘍に注目し、がん幹細胞の追求を行ってきた(Emoto; Cancer 1993, Virchow arch 1997)。本腫瘍はがん肉腫であり、以前から幹細胞腫瘍(Stem Cell Malignancy)ではないかと推察されていた極めて悪性度が高く予後不良な腫瘍である。また、我々は本腫瘍の血管新生が他の婦人科がんと比較して極めて高度であることも初めて報告し新たな治療戦略を提案してきた(Emoto; Hum Pathol 1999, Gynecol Oncol 2003, Cancer Sci 2007, Cancer Sci 2010)。従って、本腫瘍の幹細胞研究を行うことは婦人科領域のみならず軟部組織に発生する悪性腫瘍の根源を追求し、がん幹細胞医学の発展に貢献できうるものと考えている。

(2) CD133 は幹細胞マーカーの一つと考えられており、神経幹細胞に発現が認められている表面抗原である。我々が樹立したミューラー管悪性腫瘍株である FU-MMT-1(Emoto; Cancer 1992)における CD133 陽性細胞集団の性状について解析した結果、CD133 陰性細胞集団と比較して有意に高い細胞塊形成能、増殖能、コロニー形成能、異種移植能を認めた。これらの事実は子宮がんにおけるがん幹細胞の同定に有用である可能性が示唆され、これにおいても第48回日本癌治療学会学術集会でのシンポジウム『がん幹細胞医学からがん根治療法への発展』において報告した(江本 精,他)。

(3) わが国のみならず多くの先進国において死因の第一位は悪性腫瘍である為、治療戦略の改変は急務であり医療経済面からもがん幹細胞の研究の推進は必要不可欠な最重要課題の一つである。我々はミューラー管がん幹細胞の同定に最も近いところに位置していると考えられるので、本研究はがん幹細胞医学の発展に十分に貢献できる可能性があり、がん治療の核心的アプローチを導き出す可能性を秘めている。

(4) 本研究期間中にミューラー管悪性腫瘍(子宮がん、他)のがん幹細胞集団の同定を行い、その実現性は高い。まず、がん幹細胞に係る重要な遺伝子とされる OCT4, NANOG, SOX2, C-MYC 及び BMI-1 等の遺伝子発現をミューラー管腫瘍において明らかにしたい。次に、幹細胞マーカーとされる CD133 や CD44, CD29, CD90 等を用いて腫瘍細胞の分離を行い、がん幹細胞集団の同定を行いたい。さらに、子宮発生の源である胎生期ミューラー管形成に関与する PAX2 や WNT4 遺伝子発現を調べ、これらのがん幹細胞集団がミューラー管起源であるかどうかを確認する予定である。また、これらで分離選別した細胞集団ががん幹細胞集団であるかどうかについて in vivo 実験で十分に評価を行う必

要がある。本研究において、子宮がんを初めてするミューラー管由来悪性腫瘍のがん幹細胞が同定される可能性は十分にある。予想される結果として、ミューラー管がん幹細胞が同定または選別されれば婦人科領域の悪性腫瘍の治療戦略が確実に進歩し、現行の治療法における不必要な治療手段は自ずと淘汰されるであろう。医療経済の見地からも、がん幹細胞医学の発展はがん医療費の抑制に直結すると期待される。

### 3. 研究の方法

(1)がん幹細胞集団の分離:我々が樹立し報告した3種のヒト子宮がん肉腫株 FU-MMT-1, -2, -3 (Emoto; Cancer 1992, Cancer 1993)を用いる。本腫瘍株の研究では、高度な増殖能と多分化能は既に我々は報告している (Cancer 1993)。この株はミューラー管がん幹細胞を追求していくモデルとしての必要条件を十分に満たしている希少な株である。初年度は主としてがん幹細胞の分離を:幹細胞表面マーカーである CD133,CD44,CD29,CD90 を用いて細胞をフローサイトメトリー (FACS Vantage; Becton Dickinson) 法で各種マーカー陽性とマーカー陰性細胞集団に分離して性状分析を行う。

(2)がん幹細胞集団の絞り込み:幹細胞表面マーカー用いた細胞のフローサイトメトリーによる絞り込みを更に進める為に、2種(例えば CD133 と CD44 ) または 3 種 ( 例 え ば CD133,CD44,CD29) でマーカー多重陽性とマーカー多重陰性細胞分画の分離に務める。CD133 抗原は、神経や造血幹細胞などの正常幹細胞に発現する表面マーカーであるが、最近のがん幹細胞の研究によって、CD133 陽性細胞が白血病、脳腫瘍(Glioma, Glioblastoma)、消化器癌、Melanoma、頭頸部扁平上皮癌、ユーイング肉腫、前立腺癌などでの幹細胞表面マーカーとして発現を認めているため、本研究の代表的なマーカーと成りうる。更に、初年度と同様に常時他の表面マーカーである CD44(間葉系幹

細胞マーカー)、CD29, CD90, CD34 を用いて幹細胞集団をセルソーターで分離して性状分析を行う。

(3)Side Population 細胞分画:CD133 または CD44,CD29,CD90 のマーカー陽性集団を DNA 結合色素である蛍光色素 Hoechst33342 で染色し、UV レーザーで展開する。その結果、Hoechst33342 を排出する能力の高い細胞群、つまり、蛍光強度の低い細胞群を認識し、これの細胞を side population 細胞 (SP 細胞)として回収、同定する。分離した SP 細胞の増殖能や異種移植能を調べ、non-SP 細胞の性状と比較検討を行う。通常、non-SP 細胞集団は分化した細胞が多く含まれており、幹細胞はほとんど含まれてないと考えられている。

(4)多分化能:CD133 陽性細胞集団の分離培養を行い、神経、軟骨、脂肪、骨等への間葉系分化能を分化培地で培養し、酵素法や免疫組織化学的に染色を行う。抗体は Vimentin と S-100 蛋白を用いて、Oil-Red や ALP 染色を行う。Vivo では、CD133 陽性細胞集団と陰性細胞集団及び SP 細胞集団の移植腫瘍について同様に分化能を検討し、Western blot 法や定量的 RT-PCR 法にて mRNA レベルで調べる。

(5)自己複製能:細胞クローニングにより細胞1個から自己複製能を調べる。

(6)Sphere 形成能:細胞株の無血清培養条件下での浮遊細胞塊(sphere)形成能を調べ異種移植能の解析を行う。

(7)細胞増殖能:CD133 陽性細胞集団と陰性細胞集団の増殖能の差異を Ki-67 抗体で調べる。

(8)アポトーシス:CD133 陽性細胞集団と陰性細胞集団の増殖能の差異を Tunnel 法で調べる。

(9)コロニー形成能:限界希釈法による細胞コロニーリングにより細胞1個からのクローン性コロニー形成能とその増殖能を調べる。

(10)異種移植能:CD133 陽性細胞集団と陰性細胞集団を各々ヌードマウスまたは NOD/SCID マウス皮下に移植し腫瘍形成能を調べる。付着した腫瘍組織の性状分析を行い、さらに異種への継代を行い増殖能や分化能を調べる。

(11)血管新生能:CD133 陽性細胞集団と陰性細胞集団の血管新生能の差異を VEGF, FGF, TGF- $\beta$ ,PDECGF,TSP-1 等のマーカーを用いて蛋白と mRNA レベルで比較する。同様に、マウス移植腫瘍についても血管新生能の差異を調べる。特に VEGF-A の発現が幹細胞集団に高いのではないかと推察している(平成 22 年第 48 回日本癌治療学会学術集会でのシンポジウム『軟部肉腫における治療戦略』において報告した(江本 精,他)。

(12)CD133+細胞の幹細胞遺伝子解析:幹細胞遺伝子とよばれる b-catenin, Oct-3/4, Bmi-1, SMO, Notch-1 の発現の亢進の有無を RT-PCR 法や Western blot 法を用いて調べる。

(13)浸潤能:CD133 陽性細胞集団と陰性細胞集団の各々についてマトリゲル培地を用いて浸潤能を調べる。

(14)マイクロアレイ法:CD133 陽性細胞集団と陰性細胞集団の幹細胞遺伝子発現の差異、および SP 細胞集団の幹細胞遺伝子発現について GeneChip Expression Array 解析を行う。

(15)抗癌剤耐性:がん肉腫は現行の各種抗癌剤に対する耐性が強い腫瘍と考えられるため、CD133 陽性細胞集団や sp 細胞集団について細胞膜タンパク質 ABC トランスポーター MDR 遺伝子や multi-drug resistant protein (MRP),

breast cancer resistant protein の発現の有無を調べる。また、抗癌剤耐性にかかわる他の因子であるメタルチオネイン、グルタチオン、トポイソメラーゼ II の発現についても上記細胞集団を比較して調べる。

(16)分化誘導治療法:我々の有するヒトがん肉腫株を用いた preliminary data では CD133 陰性細胞群を移植した腫瘍では、骨への分化能が明らかに亢進している結果が得られている。そこで、代表的な骨形成因子である Bone morphogenetic protein (BMP) -2 の遺伝子を CD133 陽性細胞集団または SP 細胞集団に導入してミューラー管幹細胞治療の基礎とする。因に、C3H10T1/2 細胞に BMP-2,-4 遺伝子を導入した結果、骨芽細胞や軟骨細胞だけでなく脂肪細胞へも分化したことが報告されている。

#### 4. 研究成果

(1)我々は過去に樹立したヒト子宮癌肉腫株 FU-MMT-1(Emoto M. Cancer 1992)を用いて CD133 を表面マーカーとして同腫瘍の癌幹細胞集団を選別した。

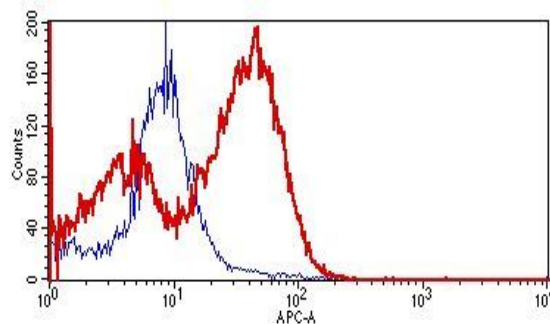


図 1: FU-MMT-1 株には高い頻度で CD133 陽性細胞が含まれる

(2)同癌幹細胞集団は CD133 陽性で幹細胞遺伝子と考えられる OCT4, NANOG, SOX2, C-MYC, BMI-1 を有意に発現し、同時にミューラー管遺伝子である PAX2 と WNT-4 遺伝子の発現を認めた。さらに、CD133 陽性細胞は脂肪や軟骨への分化能を有していた。

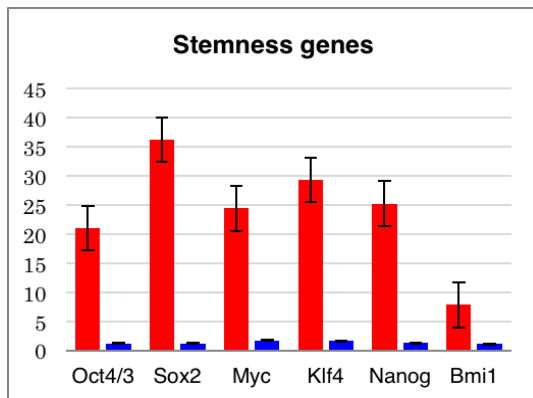


図2: FU-MMT-株 CD133 陽性細胞の幹細胞遺伝子の発現

(3) CD133 陽性 FU-MMT-1 細胞(子宮癌肉腫の癌幹細胞集団)はマウス子宮への異種移植において腫瘍形成と認め、同移植腫瘍は有意に継代された。

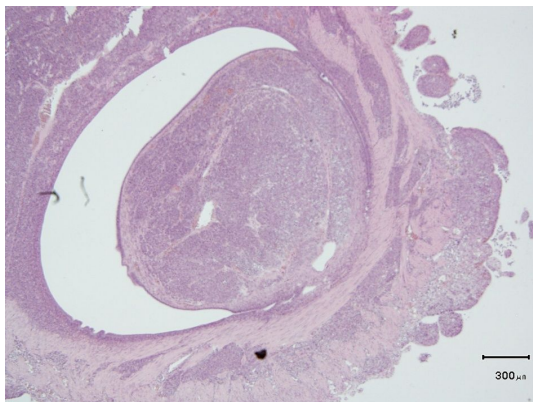


図3: CD133 陽性 FU-MMT-1 細胞 マウス移植腫瘍の組織像 (HE 染色)

(4) CD133 陽性 FU-MMT-1 細胞は高度の血管新生能(VEGF)を有しており、血管新生阻害療法が新たながん幹細胞治療戦略の一つとして有望である可能性が示唆された。

(5) 臨床的検討においても子宮癌肉腫の摘出腫瘍組織での強い CD133 発現は、予後不良因子と成り得ることも判明した。

##### 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 6 件)

(1) Chojiamts B, Jimi S, Naganuma Y, Matsumoto T, Kuroki M, Iwasaki H, Emoto

M. CD133 Cells in Carcinosarcoma (Malignant Mixed Mullerian tumor) of the Uterus Have Cancer Stem Cell-like Properties. Stem Cells、査読有、29:1485-1495, 2011

(2) Emoto M, Sadamori R, Hachisuga T, Kawarabayashi T, Miyamoto S. Clinical usefulness of contrast-enhanced color Doppler ultrasonography in invasive and noninvasive gestational trophoblastic diseases: a preliminary study. J Reprod Med、査読有、56:224-234, 2011

(3) Naganuma Y, Chojiamts B, Shirota K, Nakajima K, Ogata S, Miyamoto S, Kawarabayashi T, Emoto M. Metronomic doxifluridine chemotherapy combined with the anti-angiogenic agent TNP-470 inhibits the growth of human uterine carcinosarcoma xenografts. Cancer Sci、査読有、102:1545-1552, 2011

(4) Chojiamts B, Naganuma Y, Nakajima K, Kawarabayashi T, Miyamoto S, Tachibana K, Emoto M. Metronomic irinotecan chemotherapy combined with ultrasound irradiation for a human uterine sarcoma xenograft. Cancer Sci、査読有、102:452-459, 2011

(5) 江本 精、子宮癌肉腫の診断と治療、日本臨床、査読無、Vol.80、2012、pp. 442-446

(6) 江本 精、子宮体がんの特殊型に対する治療戦略、査読無、Vol.67、2013、pp. 485-490

[学会発表] (計 1 件)

江本 精、ミューラー管癌幹細胞の追究と血管性ニッチを標的とした新たな治療戦略、第53回日本臨床細胞学会学術集会、教育講演、2012年6月2日、幕張メッセ、千葉市

[図書] (計 2 件)

(1)江本 精、中外医学社、婦人科がん化学療法ハンドブック (子宮肉腫)、2011、87-95

(2)江本 精、中外医学社、婦人科診療ハンドブック (子宮肉腫の治療法) 2014、343-351

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

江本 精(EMOTO, Makoto)

国際医療福祉大学・保健医療学部・教授

研究者番号:80258540

(2)研究分担者:なし

(3)連携研究者:なし