

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：24592508
研究課題名(和文)子宮内膜癌幹細胞の解析と難治性癌治療法開発への応用

研究課題名(英文)Analysis of endometrial cancer stem cells

研究代表者
中村 充宏(Nakamura, Mitsuhiro)
金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：50377397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜癌においてCD133が癌幹細胞マーカーであることを報告してきた。今回、子宮内膜癌幹細胞の多分化能として血管への分化について検討を行った。

子宮内膜癌細胞をマウスの皮下に接種し形成された腫瘍を組織学的に検討したところ癌組織だけでなく血管組織を構築していた。血管を構成している内皮細胞は抗ヒトCD31抗体陽性であり、癌細胞から血管内皮細胞に分化している可能性が示唆された。CD133陽性の子宮内膜癌細胞はin vitroにおいて血管様構造を構築したのに対し、陰性細胞では認められなかった。またCD133陽性細胞はVEGFR-1の発現が亢進していた。低酸素下では血管様構造構築の維持が認められた。

研究成果の概要(英文)：Previous our study demonstrated that CD133+ endometrial cancer cells showed tumorigenic and self-renewal ability, suggesting that CD133 was a potential CSC marker in endometrial cancer. In this study, we focused on multilineage differentiation and investigated an ability of endothelial differentiation in endometrial CSCs. Immunohistochemistry of subcutaneous xenografts showed that human endometrial tumors contained human vessels labeled by human-specific anti-CD31 antibodies. Endothelial tube formation assay (in vitro angiogenesis) revealed that isolated CD133+ endometrial cancer cells could show tube formation while CD133- cells could not. CD133+ cells expressed VEGFR-1 higher than CD133- cells. Furthermore, in vitro angiogenesis assay demonstrated hypoxic condition could promote and keep tube formation in CD133+ cells, but not CD133- cells.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮内膜癌 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍における幹細胞の存在が注目され、様々な癌腫において癌幹細胞 (Cancer stem cells ; CSCs) に関する報告がなされている。

これまで我々は、子宮内膜癌において CD133 が癌幹細胞マーカーであること報告した (Nakamura et al. Hum Pathol, 2010)。CD133 陽性子宮内膜癌細胞は陰性細胞に比し、高い造腫瘍、自己複製能を有しており、抗癌剤抵抗性であり臨床的には独立予後不良因子であった。また CD133 陽性細胞は浸潤、転移の遺伝子である MT1-MMP の発現が亢進しており著明な浸潤能を有していた。CD133 以外にも CD44 が CSC のマーカーであり Side population に属する細胞集団が CSCs の特徴を有していることを明らかにした。

癌幹細胞の特徴として高い腫瘍形成能と自己複製能、さらに多分化能を有することが挙げられる。これまでの研究は我々の研究も含め腫瘍形成能と自己複製能に関するものほとんどであり癌幹細胞の多分化能について明らかになっていないのが現状である。

2. 研究の目的

子宮内膜癌細胞の分子生物学的特徴を多分化能の観点から検討し、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

今回我々は、癌幹細胞の血管内皮細胞への分化に注目し研究を行った。

- (1) 免疫染色；抗ヒト CD31 抗体を用いた。
- (2) 細胞培養；子宮内膜癌細胞株である Ishikawa、MFE280、正常子宮内膜上皮細胞

から樹立した細胞株である hTERT-E6/7-KRAS 細胞そして文書で同意の得られた子宮内膜癌患者の癌組織から樹立した子宮内膜癌細胞 (T1、T2) を DMEM + 10% FBS にて 37 °C、5%CO₂ のもとで培養を行った。低酸素への誘導は 100 μM deferoxamine mesylate (DF0) を用いた。

- (3) フローサイトメトリー；CD133、CD31 そして VEGFR-1 の抗体を用いた。
- (4) PCR；VEGF-A、-B そして -C の発現を半定量 PCR 法にて測定した。
- (5) In vitro angiogenesis assay；96well Plate の上に ECM gel を加え血管内皮細胞へ分化を誘導し血管様構造の構築を光学顕微鏡にて確認した。

4. 研究成果

患者の同意を文書で得た上で採取した正常子宮内膜上皮細胞にヒトパピローマウイルス (HPV) の Oncogene である E6/E7、テロメラーズの触媒サブユニットである hTERT 及び K-RAS 遺伝子を導入し子宮内膜癌細胞を樹立した (EM-E6/7/hTERT/KRAS 細胞)。この細胞をヌードマウスの皮下に接種にしたところ腫瘍の形成が認められ、組織学的に検討したところ癌組織だけでなく血管組織を構築していた。この血管を構成している内皮細胞を血管内皮細胞マーカーである抗ヒト CD31 抗体に染まったことから、この細胞はヒト由来であり癌細胞から血管内皮細胞に分化している可能性が示唆された。

そこで癌幹細胞との関係を検討するため、子宮内膜癌細胞を癌幹細胞マーカーである CD133 を用いて陽性、陰性細胞に分離し In vitro Endothelial Tube Formation Assay に

て血管内皮細胞への分化について検討を行った。その結果 CD133 陽性細胞が血管様構造を構築したのに対し、陰性細胞では認められなかった。また血管内皮細胞に発現している VEGFR-1 の発現を検討したところ CD133 陽性細胞での発現が亢進していた。一方、VEGFR-1 のリガンドである VEGF-A、B、C の発現についてはいずれも CD133 陽性、陰性細胞との間に有意な差を認めなかった。

次に患者の同意を得た上で採取された子宮内膜癌組織から樹立した 2 種類の細胞株 (T1 細胞及び T2 細胞) と (E6/E7/hTERT/KRAS 細胞)、そして子宮内膜癌細胞株 2 種類 (Ishikawa 及び MFE280) の計 5 種類について検討を行った。

フローサイトメトリーにて癌幹細胞マーカーである CD133 の発現を調べたところ、5 種類すべてに CD133 の発現が認められた。これらの細胞を CD133 陽性、陰性細胞に分離し In vitro endothelial tube formation assay にて血管内皮細胞への分化について検討を行った。MFE280 以外の 4 種類の細胞において CD133 陽性細胞が血管様構造を構築したのに対し、陰性細胞では認められなかった。MFE280 は CD133 陽性、陰性共に血管様構造を構築しなかった。これら 4 種類の細胞を低酸素下にて培養したところ 2 種類 (T2 細胞及び E6/E7/hTERT/KRAS 細胞) の細胞で血管内皮細胞マーカーである CD31 の発現が増加した。これら 2 種類の細胞を CD133 陽性、陰性細胞に分離し各々低酸素の有無の下 In vitro endothelial tube formation assay を施行したところ低酸素下での CD133 陽性細胞に血管様構造の促進、維持が認められた。

癌幹細胞が血管内皮細胞への分化に関与している可能性が示唆された。またその分化に低酸素が寄与していることも明らかとなった。改めて癌幹細胞をターゲットとした治療法の開発が必要であると考えられた。

<引用文献>

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. *Hum Pathol* 41(11): 1516-29, 2010.

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 3 件)

1. Nakamura M, Zhang X, Mizumoto Y, Maida Y, Bono Y, Takakura M, Kyo S. Molecular characterization of CD133+ cancer stem-like cells in endometrial cancer. *Int J Oncol.* 44(3):669-77, 2014. doi:10.1002/ccd.25282. 査読有
2. Zhang X, Kyo S, Nakamura M, Mizumoto Y, Maida Y, Bono Y, Takakura M, Fujiwara H. Imatinib sensitizes endometrial cancer cells to cisplatin by targeting CD117-positive growth-competent cells. *Cancer Lett.* 345(1):106-14, 2014. doi:10.1016/j.canlet.2013.11.020. 査読有
3. Nakamura M, Takakura M, Fujii R, Maida Y, Bono Y, Mizumoto Y, Zhang X, Kiyono T, Kyo S. The PRB-dependent FOXO1/IGFBP-1 axis is essential for progesterin to inhibit endometrial epithelial growth. *Cancer Lett.* 336(1):68-75, 2013. doi: 10.3892/ijo.2013.2230. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

1. 婦人科領域における癌幹細胞マーカーの
検索

中村充宏

第19回生殖フォーラム

平成26年5月9～10日 常磐(山口市)

2. 子宮内膜症におけるCD44の役割について

中村充宏 京哲 高倉正博 水本泰成

保野由紀子 藤原浩

第66回日本産科婦人科学会総会学術講演
会

平成26年4月18～20日 国際フォーラム
(東京都)

3. Imatinib sensitizes endometrial cancer
cells to cisplatin by
targeting CD117-positive
growth-competent cells

Mitsuhiro Nakamura, Satoru Kyo, Xiuzhi
Zhang, Masahiro Takakura, Yasunari
Mizumoto, Yukiko Bono, Toshiyuki Sasagawa,
Hiroshi Fujiwara. American Association
for Cancer Research (AACR) 105th Annual
Meeting 2014 San Diego, USA, April 5-9,
2014

4. 低酸素は子宮内膜癌幹細胞の血管内皮細
胞への分化に寄与している

中村充宏 高倉正博 毎田佳子 水本泰
成 保野由紀子 京哲

第65回日本産科婦人科学会総会学術講演
会

平成25年5月10～12日 ロイトン札幌(札
幌市)

5. Hypoxia enhances tumor vascularization
by endothelial differentiation of

endometrial cancer stem cells

Mitsuhiro Nakamura, Xiuzhi Zhang,
Masahiro Takakura, Yoshiko Maida,
Yasunari Mizumoto, Yukiko Bono, Toshiyuki
Sasagawa, Satoru Kyo. American
Association for Cancer Research (AACR)
104th Annual Meeting 2013 Washington, DC,
USA, April 6-10, 2013

6. 低酸素は子宮内膜癌幹細胞の血管内皮細
胞への分化に寄与している

中村充宏 京哲 張秀智 高倉正博 毎
田佳子 水本泰成 保野由紀子 井上正樹

第71回日本癌学会総会学術講演会

平成24年9月19～21日 ロイトン札幌(札
幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 充宏 (NAKAMURA MITSUHIRO)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号・50377397

(2) 研究分担者

京 哲 (KYO SATORU)

島根大学・医学部・教授

研究者番号・50272969

(3) 連携研究者

該当なし