

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592511

研究課題名(和文) 子宮頸癌の癌幹細胞同定と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the new therapy for cervical cancer and cancer stem cells
identification of cancer stem cells

研究代表者

水野 美香 (MIZUNO, MIKA)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：50588837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：放射線治療は子宮頸癌に有効であるが、照射範囲の再発、照射中の憎悪が問題とされる。今回、頸癌細胞株を用いて、がん幹細胞(cancer stem cell：CSC)の同定と、放射線耐性の関与について検討した。Side populationにより、細胞株からCSCが豊富とされる集団と残りの集団を抽出。この2群でCSC markerの発現、分化能、増殖能、また、放射線照射し耐性能について検証し、SPはCSCの性格を有し、放射線耐性をもつことが示唆された。今後、研究を進めることで、照射後の再発・転移のメカニズムの解明につながる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Radiotherapy is effective for cervical cancer. However, prior findings indicate that therapeutic failure for these tumors is often associated with the development of radioresistance. We aimed to investigate the possibility of an association between a stem cell-like characters and radiation-resistance in human cervical cancer cells(HeLa). Side-population cells (SP) and non-SP cells (NSP) in HeLa were isolated using flow cytometry with Hoechst 33342 efflux. SP showed a higher expression of cancer stem markers than NSP. SP tended to form spheroids and showed a higher level of tumorigenicity. Furthermore, nude mice performed by subcutaneous injection of SP showed greater tumor growth compared with NSP. SP showed a higher tumorigenicity and lower apoptotic potential than NSP, leading to radiation-tolerance. SP in HeLa showed higher-level stem cell-like properties and radioresistance than NSP. SP might be valuable for new therapeutic approaches for radiation-resistant cervical cancer.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：がん幹細胞 放射線治療 子宮頸癌 アポトーシス 放射線耐性

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌は、好発年齢が 30 代後半より 40 代前半にあり、若年者の増加が言われている。治療は、手術療法のみならず、放射線治療が有効である。しかしながら、一部に放射線治療中の憎悪や、再発転移巢の放射線耐性が問題とされる。癌細胞の中に自己複製能と多分化能を有する少数の癌幹細胞が存在し、この細胞が起源となり癌組織を形成していると考えられている。癌幹細胞は抗癌剤や放射線治療に対し抵抗性を示し、さらにこれらオンコジェニックストレスにより悪性化能を獲得するため、癌治療のターゲットとして注目されている。

2. 研究の目的

近年様々な癌種において癌幹細胞の同定の試みの報告がなされているが、子宮頸癌では未だ癌幹細胞に関連する報告はない。今回我々は子宮頸癌において癌幹細胞を同定し、子宮頸癌の治療法の中心となる放射線感受性への関与について検討した。

3. 研究の方法

幹細胞の同定法として ATP-binding cassette(ABC)トランスポーターの色素である Hoechst33342 を用いた side population (SP) を選択した。子宮頸癌細胞株 HeLa cell を fluorescence-activated cell sorting (FACS) を用いて、癌幹細胞の富集団と考えられる SP 細胞と non-SP (NSP) 細胞に分離した。CD133+細胞を分離し、更に Sphere 形成法を併用する事によって、より純度の高いがん幹細胞が分離・同定・維持できると考えた。この SP 細胞ががん幹細胞の性格、機能を有することを検証した。

(1) 幹細胞の性格、機能解析

in vitro 実験において Western blotting にて癌幹細胞関連マーカー遺伝子 (CXCR4、Oct3/4、CD133、SOX2) の発現を比較検討。また、この 2 群を培養し、細胞増殖能を MTS assay を用い確認、および再度 side population を行い、それぞれの分化傾向を確認。

in vivo 実験では、分離した SP 細胞と NSP 細胞のそれぞれを Balb/c ノドマウスに皮下移植し、progenitor cell (未分化な状態に保たれている組織を構成する細胞の一種で、特定の細胞に分化するものや、様々な細胞に分化する能力) としての特性を確認する。ノドマウスの皮下に移植された細胞が生着、腫瘍形成、腫瘍増大を継続的に計測し、SP と NSP 群において比較した。

(2) 放射線耐性の関与を検証

in vitro 実験において、この 2 群に放射線を照射し、照射前後の形態的变化を確認後、継続的な変化をコロニー形成能とトリパンブルー染色を行い cell viability (細胞生存) で評価。更に、この 2 群をアネキシン V-ヨウ化プロピジウム (PI) による FACS を施

行し、アポトーシスを確認。

放射線照射後の放射線耐性の関与を検討。子宮頸癌細胞株 HeLa に、放射線線量 2 G を 10 回照射したのち、side population を行い、SP の発現量を確認。

予備実験として 6cm dish に 1×10^3 ずつ SP, NSP を添加し、放射線線量 0.4.8.12.16Gy 照射し、コロニー形成について検討し、至適線量を決定。その後、照射後に継続的にアポトーシスマーカーである PARP/ cleaved PARP の発現を Western blotting にて解析

放射線照射後に、肝がんなどで放射線耐性との関与が指摘されているチロシンキナーゼレセプターである c-Met の発現および、DNA 損傷の修復に関わる G2 checkpoint の gatekeeper の一つで、放射線感受性に関与するといわれている Wee1 を Western blotting にて解析。

統計学的解析は、すべて 2 群の平均値を対応のない t 検定を用いた。

尚、本文中のデータ、図表は、5. 主な表論文等 [雑誌論文] (1) より引用している。

4. 研究成果

SP 細胞は、ABC トランスポーターの色素 (Hoechst3334) 排泄能を利用して得られる細胞分画のことで、verapamil で阻害されると検出されなくなる。今回、子宮頸癌細胞株 HeLa を用いて、この SP 群と NSP 群を分離し、研究をおこなった (図 1)。

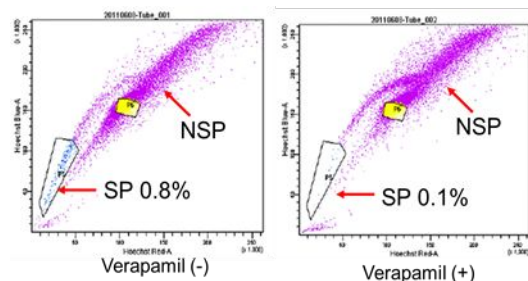


図 1 子宮頸癌細胞株 HeLa を用いた side population

(1) 幹細胞の性格、機能解析

分離した SP と NSP 集団において、癌幹細胞関連マーカー遺伝子として有名な CXCR4、Oct3/4、CD133、SOX2 の発現をウエスタンブロット解析にて検討した (図 2 A)。SP 群は NSP 群と比較して、発現レベルは高かった。また、SP 群と NSP 群を 1 週間培養し、再度、side population を行った (図 2 B)。SB 群からは、SP と NSP の集団がみられたが、NSP 群からは NSP の集団しかみとめられなかった。このことは、SP 群には、自己複製能と多分化能を有している可能性が示唆された。

SP と NSP を 6 cm の非接着性の培養皿で長期培養し、形態的变化と増殖能、アポトーシ

ス进行评估した。SP、NSP 細胞を 100 個ずつ 12

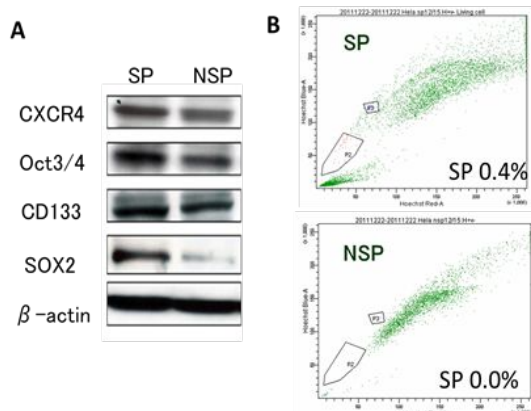


図2 A: がん幹細胞関連遺伝子の発現の 2 群間の比較、B: SB 群 NSB 群を 1 週間培養後に再度 side population 施行

日間培養した後、細胞の形態的变化を評価したところ、SP 細胞は NSP 細胞に比べ、よりおおきなコロニーを形成した(図 3A)。また、NSP 群では、浮遊細胞や凝集塊が多くみられたことより、アネキシン V-PI による FACS を用いて、アポトーシスを評価した。NSP 細胞 (29.4%) は SP 細胞 (15%) と比較し、アポトーシスの割合が高かった(図 3B)。さらに、96 穴のプレートで、SP、NSP 各々 1 個ずつ入れ、14 日間培養し、形態的变化を評価した(図 3C)。コロニー形成総数は NSP 細胞の方が多く認められた(全コロニー形成数; SP: NSP, 33: 52)、直径 1mm 以上のコロニー形成は SP 群に多くみられた(径 1mm 以上のコロニー数; SP: NSP, 33: 27、径 2mm 以上のコロニー数; SP: NSP, 19: 2)。96 穴のプレートで、SP、NSP 各々 10 個ずつを撒き、9 日目と 21 日目の細胞増殖能を MTS アッセイを用い、評価したところ、SP 細胞の方が、いずれの時期においても、高い viability (細胞生存率) を示した(図 3D)

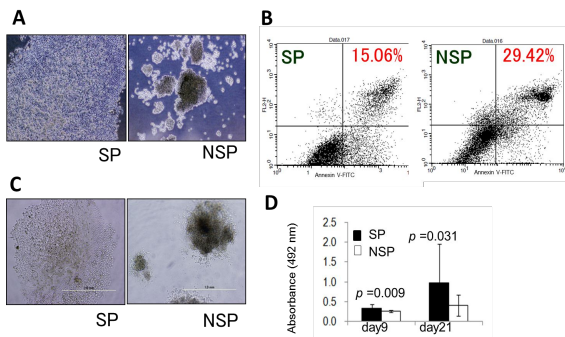


図3 長期培養後の細胞の形態的变化

in vivo 実験

SB、NSP を異なる細胞数 (1×10^2 , 1×10^3) で 6 週令のメスのヌードマウスの背部の皮下

にそれぞれ接種し、腫瘍形成と腫瘍増殖を 70 日間にわたり評価した(図 4A)。 1×10^2 細胞数接種マウスでは、3 匹中に接種後 40 日後 SP 1 匹のみ、 1×10^3 細胞数接種マウスでは 3 匹中接種後 47 日後 SP 3 匹、65 日後に NSP は 1 匹のみの背部に腫瘍形成を認めた。70 日後に摘出した腫瘍重量は、SP 細胞を接種したマウスの方が NSP 細胞より、重い傾向がみられた (0.46 ± 0.26 , 0.22g)(図 4B)。

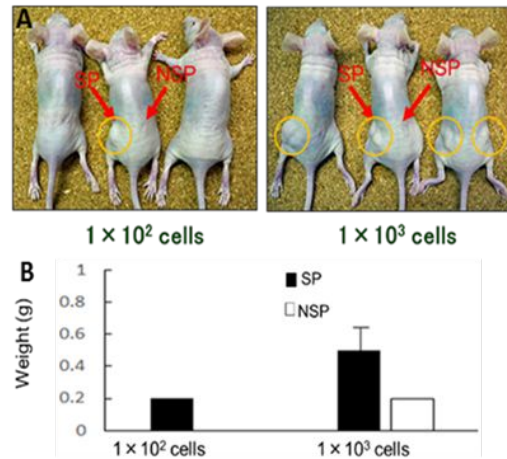


図4 ヌードマウスの皮下に SP 細胞、NSP 細胞接種後の腫瘍形成

(2) 放射線耐性能の検証

SP 細胞、NSP 細胞に線量 6Gy の放射線を照射し、照射前後の形態的变化を確認した。照射前は前述のとおりであるが(図 3A)、照射後は、NSP 細胞では断片化したコロニー形成を認めた(データなし)。SP と NSP 細胞をそれぞれ 100 細胞ずつ 12 穴の培養皿にまき、24 時間後 4Gy を照射、10 日後のコロニー形成能を評価した(図 5A)。形成したコロニーの大きさも数も SP 細胞の方が NSP 細胞より大きく、NSP では直径 500 μm 以上のコロニーは認められなかった(図 5B)。トリパンブルー染色を行い cell viability (細胞生存) で評価した(図 5C, D)。SP 細胞では 79%、NSP 細胞では 64% であり、SP 細胞集団で高い viability を示した。更に、アネキシン V-PI で FACS を施行し、アポトーシスを評価した。後期アポトーシスは、SP 細胞で 4.91%、NSP 細胞で 20.46% と NSP の方がより高頻度に認められた(図 5E)。

子宮頸癌細胞株 Hela を培養し、放射線線量 2 Gy を 10 回照射したのち、side population を FACS により行ったところ、非照射群は SP の比率は 0.2% に対し、照射群は 3.9% であった(図 6A)。このことにより、放射線照射をすることにより、放射線抵抗性を持つ SP 細胞が惹起される可能性が示唆された。

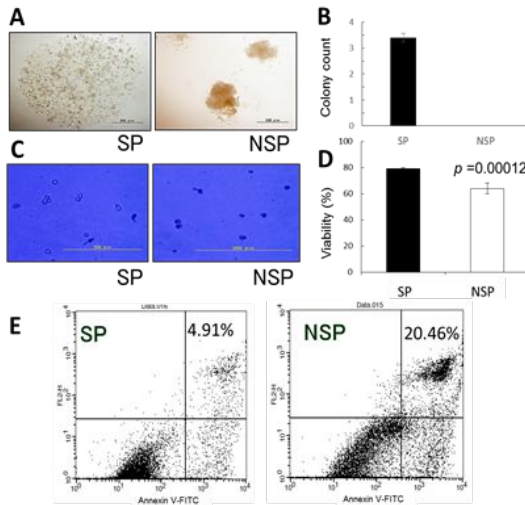


図 5 放射線照射後の形態的变化とアポトーシス

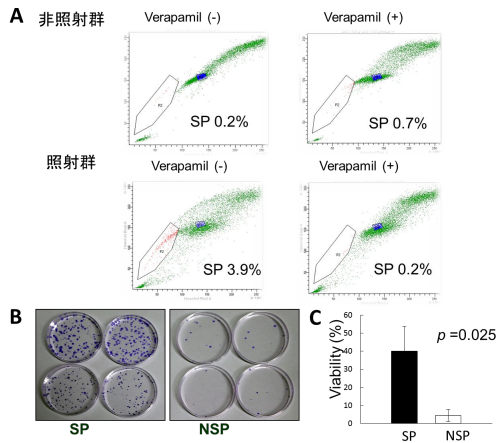


図 6 A:子宮頸癌細胞株 HeLa の放射線照射後の side population、B :SB,NSB 放射線照射後の細胞生存

6 cmの培養皿に 1×10^3 ずつの SP, NSP の細胞を撒き、0、4、8、12、16Gy 照射し、線量依存性のコロニー形成(数、サイズ、形態)を調べた。照射後 96 時間後に、クリスタルバイオレット染色を行い、検討した(データ図示なし)。8Gy 以上の照射量の暴露により、SP,NSP いずれも細胞は死滅することが示された。4 Gy 照射した際の結果を示す(図 6 B,C)が、コロニー数は SP 細胞の方が有意に増加していた。SP 細胞,NSP 細胞に 4 Gy 照射後のアポトーシスを評価。6 cmの培養皿に 2 群の細胞を入れ、120 時間後に 4Gy 照射し、照射 1、3、6、24 時間後に、アポトーシスマーカーと言われる PARP/ cleaved PARP の発現をウエスタンブロットにより解析した(図 7)。NSP では cleaved PARP の発現が SP より高発現しており、NSP のアポトーシスが示

唆された。

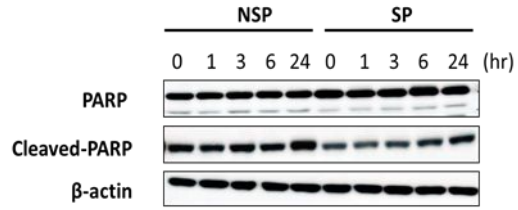


図 7 放射線照射後の PARP/ cleaved PARP の発現

放射線耐性の関与がいわれている c-Met の発現と放射線感受性の関与が報告されている Wee1(図 8 B)においてウエスタンブロットにて解析した。c-Met は、肝がんなどで放射線耐性との関与が言われている肝細胞増殖因子の受容体チロシンキナーゼである。1 週間培養した SP, NSP に 4Gy または 8Gy 照射し、照射 5 分および、10 分後に回収し、c-Met の発現をウエスタンブロットにより解析した(図 8 A)。SP 細胞において、いずれの条件でも NSP より c-Met は高発現しており、SP 細胞が放射線耐性と関与していることが示唆された。また、DNA 損傷の修復に関わる G2 checkpoint の gatekeeper の一つで、放射線感受性に関与するといわれている Wee1 に着目し、ウエスタンブロットで発現を検討した(図 8 B)。SP ,NSP に対して、4Gy 照射した群と非照射群 (control) で microarray を行い、照射群で非照射群と比較して有意に発現の差があるもののうち、Wee1 の発現を確認した。SP 細胞において非照射時、4Gy 照射時ともに NSP 細胞より高発現を示し、Wee1 が SP の放射線耐性に関与していることが示唆された。

最後に、今回、子宮頸癌細胞株 HeLa において、SP 集団は癌幹細胞様の性質をもつことが示された。すなわち、腫瘍形成能・増殖能が高く、SP および NSP 細胞の分化能をもち、またアポトーシスを起こす割合は低い。また、SP 細胞は NSP 細胞と比較し、より放射線耐性を示すことが示唆された。SP 細胞をターゲットとしたがん幹細胞が関与した放射線耐性を今後更に検討することで、臨床問題とになっている放射線照射後の再発・転移のメカニズムの解明につながる可能性が示唆された。しかしながら、今回、他の子宮頸癌細胞株でも同様の検討を行っているが、分離した SP の処理、取扱いに非常に難渋し、同様の結果を得ることができなかった。また、子宮頸癌および、婦人科癌の転移のメカニズム、治療耐性において、上皮間葉転換誘導(EMT)が言われている。これらは、我々の研究室でも、積極的に研究を行ってきた。その中で、EMT 調整因子である snail, Slung, SIP, TWIST などが子宮頸癌の予後不良因子である可能性が示唆された(雑誌

論文(2))、今回、SP細胞とこれらの因子も関連も展開しているが、まだ結果の報告に至ってはならず、さらなる検討が必要と考えている。

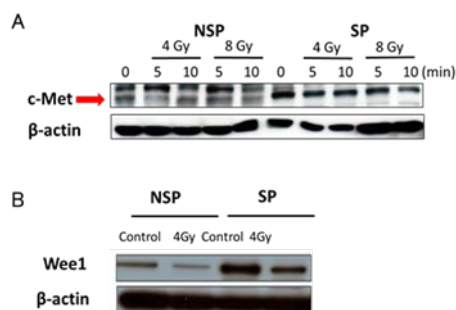


図8 放射線照射後のc-Met, Wee1の発現

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 2 件)

(1) Kumazawa S, Kajiyama H, Umezu T, Mizuno M, Suzuki S, Yamamoto E, Mitsui H, Sekiya S, Shibata K, Kikkawa F. Possible association between stem-like hallmark and radioresistance in human cervical carcinoma cells. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* Vol. 40, No. 5: 1389-1398, May 2014. 査読あり doi:10.1111/jog.12357

(2) Kajiyama H, Shibata K, Umezu T, Mizuno M, Suzuki S, Yamamoto E, Kikkawa F. Expression of Twist enhances risk of poor oncologic outcome in patients with stage Ib to II cervical carcinoma with lymphovascular space involvement. *Hum Pathol.* 2013 Feb;44(2):181-8. 査読あり。doi: 10.1016/j.humpath.2012.05.015

[学会発表](計 3 件)

(1) 熊澤詔子、水野美香、柴田清住、梶山広明。子宮頸癌における癌幹細胞の同定と放射線耐性への関与。第64回日本産科婦人科学会 学術講演会。2012年4月13日~15日、兵庫県神戸市、神戸ポートピアホテルおよび神戸国際展示場

(2) 水野美香、梶山広明、柴田清住。ワークショップ ~子宮頸がん初期病変に対する新規治療の展望~5-Aminolevulinic Acidを用いた光線力学療法。第56回日本婦人科腫瘍学会学術講演会。2014年7月17日~19日、栃木県宇都宮市、栃木県総合文化センター

(3) 水野美香、梶山広明、柴田清住。Symposium: Photodynamic Therapy using 5-Aminolevulinic Acid for Cervical Cancer. ~From basic research to clinical trials ~2nd International ALA and Porphyrin Symposium (IAPS2), November 15-16, 2014 in Tokyo. The Institute of Medical Science, the University of Tokyo, Minato-Ku, Tokyo

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 美香 (MIZUNO, Mika)
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号: 50588837

(2) 研究分担者

柴田 清住 (SHIBATA, Kiyosumi)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 90335026

(3) 研究協力者

梶山 広明 (KAJIYAMA, Hiroaki)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 00345886

熊澤 詔子 (KUMAZAWA, Shoko)