

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791729

研究課題名(和文) ヒト卵巣がん幹細胞における幹細胞制御因子の役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of stemness factor in ovarian cancer stem cell

研究代表者

石黒 竜也 (Ishiguro, Tatsuya)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：80625690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト卵巣がん臨床検体を用い、血清を含まない浮遊条件下での培養系においてがん細胞の安定培養を試みた。我々はスフェロイド細胞とよばれる特異な細胞形態を呈する細胞の安定的な培養に成功した。これらスフェロイド細胞は腫瘍形成能や自己複製能・分化能などのがん幹細胞性質を持つ事を確認した。また幹細胞因子の発現抑制により同細胞の増殖・生存が抑制された。一方で、分化誘導後の細胞も腫瘍の形成能が確認、分化誘導後の細胞を血清を含まない浮遊条件下での培養を行うと、スフェロイドの再形成を認め、幹細胞因子の再上昇を認めた。以上より、卵巣がんにおいてがん細胞の両方向性の変化(分化可塑性)が存在する事が示された。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSC) can self-renew, differentiate and recapitulate the tumors. In the absence of serum, CSC from some solid tumors are capable of proliferation in vitro under sphere-forming conditions. We have established spheroid culture conditions for cultivating ovarian cancer cells derived from surgical specimen. These spheroid cells are tumorigenic when explanted into immunodeficient mice, and immuno-histological analysis indicates that the resulting tumors are indistinguishable from the originals. When serum is added to the in vitro culture media, the spheroid cells differentiate. shRNA-mediated knockdown of stemness factor inhibited cell proliferation. The differentiated cells, when returned to the sphere-forming serum-free conditions, were capable of reforming spheroids and re-expression of the stem cell markers. These findings indicated that the differentiation of the spheroid stem cells was highly reversible.

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：癌幹細胞 卵巣がん

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは婦人科悪性腫瘍において最も予後不良な疾患であり、新たな治療法の確立が望まれている。

がん幹細胞はがんの進展・再発・転移・治療抵抗性に密接に関わる細胞集団として考えられている。

2. 研究の目的

我々はヒト卵巣がんよりがん幹細胞を抽出し単離増殖する目的で、卵巣漿液性腺がん患者の手術検体由来のがん細胞の安定培養を行った。この特徴的な形態を呈するスフェロイド細胞のがん幹細胞性質の確認を行うとともに「幹細胞性」の造腫瘍能に対する役割を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 同意の得られた卵巣がん患者より提供された手術検体を酵素処理した後、遠心分離法により卵巣がん細胞を分離する。これらの細胞を用い、低接着プレートに改変した ES 細胞用の培地中で卵巣がんスフェロイド細胞の培養を行った。

(2) 次に、形成されたスフェロイド細胞のがん幹細胞としての性質を確認した。がん幹細胞の特性として、(A)造腫瘍能、(B)幹細胞マーカーの発現、(C)分化能が重要である。そこで以下の実験を行った。(A)スフェロイド細胞の造腫瘍能を明らかにするため、免疫不全マウスへのスフェロイド細胞投与による皮下および腹腔内腫瘍形成能の検証。また形成された腫瘍と臨床組織検体における組織型の差異の検証。(B)western blot, real time 法によるタンパク・RNA レベルにおける Sox2, Nanog などの幹細胞マーカーの発現の確認。(C) *in vitro* における血清添加に伴う分化能の有無の検証。

(3) ついでレンチウイルスベクターによる shRNA 導入により幹細胞因子 Sox2・ALDH1A1 の発現を抑制し、*in vitro* におけるスフェロイド細胞増殖能の変化を確認した。

(4) 上記分化誘導後の細胞のスフェロイド培地での再培養による細胞の形態・発現変化を確認した。

4. 研究成果

(1) 18 例中 5 例の進行漿液性腺がん患者由来のスフェロイド細胞の安定培養に成功した。一方、他の組織型の卵巣がん検体由来のスフェロイド細胞の培養には至らなかった。

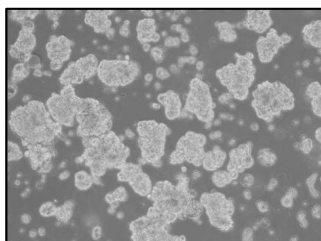


図 1: 卵巣がんスフェロイド細胞

(2) これらの卵巣漿液性腺がん由来スフェロイド細胞は免疫不全マウスへの移植投与によって腫瘍を形成し、組織学的形態ならびに特殊免疫染色像 (Pax8, CA125, WT-1, HE4, p53) から、形成された腫瘍は由来となる臨床腫瘍組織検体と区別できない組織学的特性を持つ腫瘍であった。またスフェロイド細胞では Sox2, Nanog, ALDH1A1 などの幹細胞マーカーを高発現し、一方 *in vitro* における血清添加による分化誘導後は分化マーカー CK7 の発現上昇が見られた。

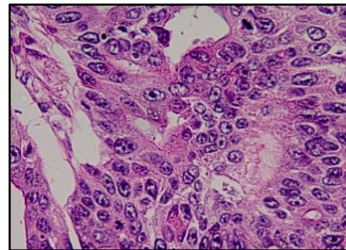
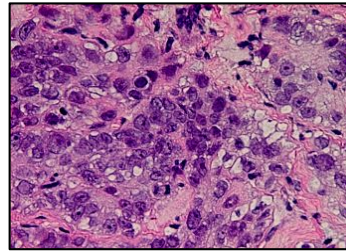
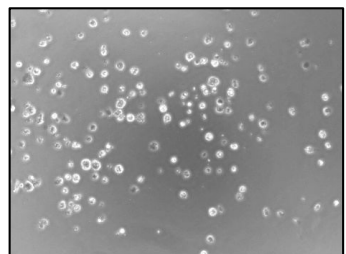
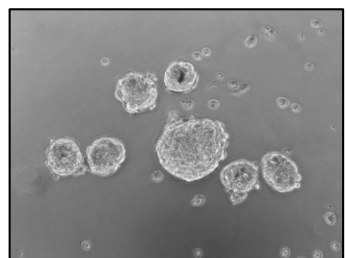


図 2: HE 染色 (上)スフェロイド細胞移植後形成腫瘍, (下)臨床腫瘍

(3) 加えてレンチウイルスベクターによる shRNA 導入により幹細胞因子である Sox2 ならびに ALDH1A1 の発現を抑制するとスフェロイドの形成および細胞の増殖が著明に抑制された。



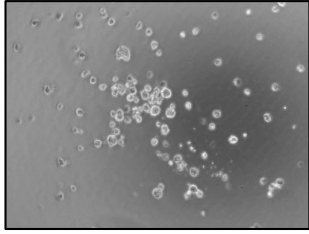


図 3 : スフェロイド細胞の生存抑制
(上) sh-control (中) sh-Sox2 (下) sh-ALDH1A1

同結果より、これらスフェロイド細胞はがん幹細胞の特性を有する細胞集団であるという事を確認した。

(4) 同スフェロイド細胞由来の分化誘導後細胞をスフェロイド培地で再培養を行うと、スフェロイドの再形成を認めた。これら再形成されたスフェロイド細胞は幹細胞因子の再上昇および分化マーカーの再低下を認めた。

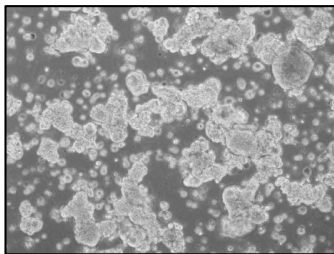
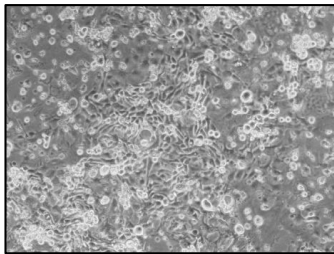


図 4 : (上)分化誘導後細胞, (下)再形成スフェロイド細胞

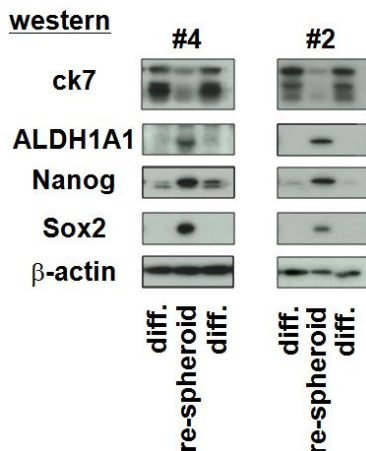


図 5 : 幹細胞因子の発現変動(western blot 法)

以上より、卵巣がん幹細胞において幹細胞因子が生存・増殖に必須である事、ならびに卵巣がんにおいてがん幹細胞と非がん幹細胞間での分化可塑性が存在する事が示された。

卵巣がん幹細胞の詳細な生化学的研究報告は少なく、またこれまでのところ卵巣がんにおける分化可塑性を証明した報告はない。今回の我々の研究結果は卵巣がん幹細胞を標的とした新たな治療戦略の礎となり得る重要な知見である。

今後は更なる生化学的特徴の解明を目指すとともに、既存の治療薬に対する反応性との関わりについてえ追求する予定である。

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) Differential expression of nanog1 and nanogp8 in colon cancer cells.

Tatsuya Ishiguro, Ai Sato, Hirokazu Ohata, Hiroaki Sakai, Hitoshi Nakagama, Koji Okamoto.

Biochemical and Biophysical Research Communications 2012;418:199-204.

査読あり

(2) miR-493 induction during carcinogenesis blocks metastatic settlement of colon cancer cells in liver

Koji Okamoto, Tatsuya Ishiguro, Yutaka Midorikawa, Hirokazu Ohata, Masashi Izumiya, Naoto Tsuchiya, Ai Sato, Hiroaki Sakai, Hitoshi Nakagama

The EMBO Journal 2012;31:1752-1763.

査読あり

(3) Induction of the Stem-like Cell Regulator CD44 by Rho Kinase Inhibition Contributes to the Maintenance of Colon Cancer -Initiating Cells

Hirokazu Ohata, Tatsuya Ishiguro, Yuki Aihara, Ai Sato, Hiroaki Sakai, Shigeki Sekine, Hirokazu Taniguchi, Takayuki Akasu, Shin Fujita, Hitoshi Nakagama, and Koji Okamoto

Cancer Res 2012;72:5101-5110.

査読あり

[学会発表](計2件)

(1) in vitro cultivation and characterization of cancer stem cells derived from human ovarian cancer

Tatsuya Ishiguro, Hirokazu Ohata, Hitoshi Tsuda, Takahiro Kasamatsu, Takayuki Enomoto, Kenichi Tanaka, Hitoshi Nakagama, and Koji Okamoto

72nd Annual meeting of the Japanese Cancer Association 2013, Yokohama

October 3-5, 2013

(2) ヒト卵巣がん検体由来がん幹細胞の in vitro 培養系の確立とその生化学的特性の解明

石黒竜也, 榎本隆之, 田中憲一

第 65 回日本産婦人科学会学術総会 2013, 札幌

May 10-13, 2013

〔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

石黒 竜也 (Tatsuya Ishiguro)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号 : 80625690

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :