

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893057

研究課題名(和文) iPSCを用いた分化誘導癌幹細胞モデル(子宮頸癌モデル)に関する研究

研究課題名(英文) Study on establish cancer stem cell model (cervical cancer model) using iPSC.

## 研究代表者

足立 克之 (ADACHI, KATSUYUKI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90735200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は子宮頸癌の癌化モデルを確立し、iPS細胞からの扁平上皮・円柱上皮境界細胞の分化誘導が目的であった。京都大学iPS研究所が健常人より樹立したiPS細胞の培養を行い培養条件の最適化、安定的培養を行うことが出来るようになった。iPS細胞から中間中胚葉への分化については既報があるためそのMethodを参考にしiPS細胞より中間中胚葉への分化誘導を行った。形態学的に変化を見るだけでなく中間中胚葉マーカーが誘導された細胞に発現していることをPCRや免疫染色にて確認した。さらにそこにHPV6, E7遺伝子を導入し子宮頸癌がん化モデルを作成した。今後はこれを用いて薬剤耐性の機序などを解明する。

研究成果の概要(英文)：A objective of this study is to establish a cancer stem cell model of cervical cancer. First, the differentiation of original squamous epithelium, and reverse cell in SC junction from induced pluripotent stem cells was one of our objectives. A summary: We have started the culture of the induced pluripotent stem cells established in Kyoto University, and provided kindly. Then, I optimized the culture condition and came to be able to culture it stably. We have guided them differentiate to intermediate mesoderm from induced pluripotent stem cells, by referring to Method reported by previous publications. Not only we focused a change morphologically, but also confirmed that they became positive of OSR1, WT1, EYA1, and intermediate mesodermal markers. We have confirmed that we developed a kind of cervical cancer stem cell model from iPS.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：iPS細胞 Reverse cell 子宮頸癌

## 1. 研究開始当初の背景

近年、「がん幹細胞」に関する研究は飛躍的に進展し、がん発症の分子機序の解明のみならず、「がん幹細胞」を標的とする新しい治療法が模索されつつある。これは手術で根治したようにみえても再発が起こりうること、あるいは化学療法が一見奏功したようにみえても再発・転移しうることなどがその根拠とされており、現在までに急性骨髄性白血病や大腸がんなどにおいては「がん幹細胞」が同定・単離されるに至っている。一方、申請者らのグループが長年取り組みを続けてきた子宮頸がんについては、確固たる「がん幹細胞」の報告はいまだになされていない。子宮頸癌の癌幹細胞モデルを樹立することが転移・再発機構の解明、さらには薬剤耐性に対する研究モデル、薬剤の効果判定に利用できるモデルとなりうることから新規薬剤開発にも役立つ可能性があった。

## 2. 研究目的

本研究課題の目的は、ヒト iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell) を用い、子宮頸がん幹細胞を含めた「子宮頸がんのがん化モデル」を確立することにある。申請者は現在までに、樹立するのがきわめて難しいとされてきたヒト栄養膜幹細胞 (trophoblast stem cell; TS 細胞) モデルを iPS 細胞から確立することに成功しており、本研究課題においてもこのような分化誘導技術を積極的に活用した。また、本研究課題により患者皮膚あるいは健常者より樹立された子宮頸がん幹細胞モデルにおいて薬剤反応性を比較する、あるいはウイルス感染を伴うエピゲノム異常などの解析が可能になり、iPS 細胞を用いた個別医療や創薬開発の新しい可能性に繋がるものと期待している。

### 研究の学術的背景

子宮頸がんの発症過程において、ほぼ 100% がヒトパピローマウイルス (HPV) の感染が起因となっていることが知られている。また 16 型や 18 型をはじめとするハイリスク HPV の存在が指摘されているが、一方で感染そのものよりも持続感染の期間が長いほどリスクが高いことも明らかとなっている。すでに市場で HPV 16, 18 に対する予防ワクチンの摂取が行われているものの、副反応などの観点からもさらなる改善が期待されている。また HPV 既感染者に対しては、この予防ワクチンはほぼ無効であることから、既感染者に対する治療戦略を構築することはきわめて重要であると考えている。

申請者らの研究グループは 15 年以上にわたり、子宮頸がん発症における治療を目的

とした主に免疫学的観点からの研究に取り組んできた。現在まで、特に HPV 感染からのがん化とその治療法の開発についてさまざまな研究成果を積み重ねてきた (Taguchi A, Adachi K, et al. PLoS One 2014; Kawana, K., Adachi, K., et al. Open Virol J 2013; Kojima, S. Adachi, K. Am J Reprod Immunol. 2012; Adachi, K., Vaccine, 2010)。たとえば、子宮頸部上皮内腫瘍性病変に対する免疫療法が一定の治療効果を示すことを明らかにしてきたが、いかに優れた免疫治療であったとしてもそれと同時にいわゆる直接的な殺腫瘍効果を有する抗がん剤 (化学療法) の開発を進める必要がある。

このように抗がん剤を腫瘍特異的にいかに効果的に、かつ正常組織への影響を少なくすることができるのかを考える場合、「がん幹細胞」の概念は重要で、近年になって「がん幹細胞」を標的とする新しい治療法が特に注目されるようになってきている。たとえば、腫瘍で認められるヘテロな集合体のうちごく一部に幹細胞 (親細胞) があり大半が娘細胞であれば、後者をいくら標的としても再発、再増悪は防ぐことは難しい。逆に、親細胞を攻撃することができれば腫瘍の撲滅につながることを期待できる。

申請者はミズーリ大学留学中にシグナル伝達阻害剤などを用いることで、樹立するのがきわめて難しいとされてきたヒト栄養膜幹細胞 (trophoblast stem cell; TS 細胞) モデルをヒト iPS 細胞から樹立することに成功し、またその分子経路の一端を解明した (Telugu, B.P.\*, Adachi, K\*. Placenta. (\*co-first authors) 2013; Amita, M., Adachi, K. Proc Natl Acad Sci 2013)。以上を踏まえて本研究では「子宮頸がん幹細胞モデル」の確立を目標に実験を実施した。

## 3. 研究の方法

本研究の目的は子宮頸癌の発がんモデルを作ることであることから本研究では以下の項目を実施した。

1. まず iPS 研究所で樹立した iPS 細胞を培養継代し、iPS 細胞を子宮頸部の扁平上皮円柱上皮境界 (SC junction) モデル細胞へと誘導した。iPS 細胞から中間中胚葉への分化については既に既報があるためその Method を参考にし CHIR99021, および TTNPB を添加することで iPS 細胞より中間中胚葉への分化誘導を行った。

2. RT-PCR にて遺伝子発現を確認し、免疫染色やウエスタンブロット法にてタンパク発現をみることで、CAGE 法で網羅的遺伝子発現解析をすることで誘導した細胞が本当に

SC junction のモデルであるかを確認した。形態学的に変化を見るだけではなく中間中胚葉のマーカーである OSR1, WT1, EYA1 が誘導された細胞に発現していることを免疫染色にて確認した。今回は次世代型シーケンサーである CAGE は使用せずこの遺伝子発現を RT-PCR や免疫染色にて確認した。さらに中間中胚葉に分化した細胞に Keratinocyte-SFM を添加し培養を行うと p63, CK17, CK5 などの Reverse cell のマーカーと考えられているタンパクの発現が上昇していた。これらは PCR や免疫組織染色にて確認した。現段階では Reverse cell と断定することは難しいものの、Reverse cell like なものは確立しえたと考えている。

3. 扁平上皮 円柱上皮境界モデル細胞に子宮頸がんの原因となる HPV E6, E7 を遺伝子導入した。

4. さらに RT-PCR にて RNA の発現を確認し、免疫染色やウエスタンブロット法にてタンパクの発現を確認し遺伝子導入細胞が子宮頸がんのモデルであるかを確認した。今後の発展としてはこの樹立した細胞株にさらに改良を加えて子宮頸がん化モデルとして使用に耐えるものとしていく。

#### 4. 研究成果

子宮頸がん化モデル（癌幹細胞モデル）を作成するために iPS 細胞より既報の Method を用いて中間中胚葉までの分化に成功した。さらにそこにサイトカインを加えることによって Reverse cell like の細胞集塊を樹立することに成功した。PCR、免疫染色などで当初から私たちが想定していた子宮頸部上皮に分化したことを確認したうえで E6, E7 を遺伝子導入するところまで到達した。ある種の細胞株の樹立には成功したといえる。しかし、現時点では他者を納得させるだけの外的条件を満たさないため今後はサイトカインの添加だけでは 3D カルチャーなどを用いて、またマイクロアレイの結果を参照しながらこの細胞株の特徴を表していく。

一方で私たちの研究室では上記のような子宮頸がん幹細胞モデルだけではなく、(iPS からの癌幹細胞モデルの樹立がまだ志半ばであったことから) 別の方法論で幹細胞手段を得ることとなった。

一般的に癌の細胞株は接触性のプレートで培養しているが非接触培地を用いて Sphere を形成させることでその細胞集団が幹細胞性を獲得することを見出した。しかし iPS 細胞のから癌幹細胞を樹立するために非接触培地を利用する方法は新規のものではなく既報を参考にして行った。EGF や bFGF などに加えなくても非接触培地に蒔くことで Sphere を形成して幹細胞マーカーの発現が

上がることまでは証明された。

さらに 3D カルチャーを行ったうえでアミノ酸代謝などに着目しメタボローム解析を行ったところ一般的には癌細胞は解糖系でエネルギーを得ていると考えられたはずが、実は TCA 回路を回してエネルギーを得ているのではないかという仮説にたどり着いた。

特に、グルタミンやトリプトファンなどが 3D カルチャー下の細胞群で多く認められ今後はここに着目して研究を進めていく予定としている。

#### 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 6 件)

1. Spheroid cancer stem cells display reprogrammed metabolism and obtain energy by actively running the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Sato M, Kawana K, Adachi K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, Nishida H, Inoue T, Taguchi A, Takahashi J, Eguchi S, Yamashita A, Tomio K, Wada-Hiraike O, Oda K, Nagamatsu T, Osuga Y, Fujii T. *Oncotarget*. 2016 PMID: 27120812
2. Measurement of endometrial thickness by transvaginal ultrasonography to predict pathological response to medroxyprogesterone acetate in patients with grade 1 endometrioid adenocarcinoma. Sato M, Arimoto T, Kawana K, Miyamoto Y, Ikeda Y, Tomio K, Tanikawa M, Sone K, Mori-Uchino M, Tsuruga T, Nagasaka K, Adachi K, Matsumoto Y, Oda K, Osuga Y, Fujii T. *Mol Clin Oncol*. 2016 4(4):492-496. PMID: 27073648
3. Systemic delivery of siRNA by actively targeted polyion complex micelles for silencing the E6 and E7 human papillomavirus oncogenes. Nishida H, Matsumoto Y, Kawana K, Christie RJ, Naito M, Kim BS, Toh K, Min HS, Yi Y, Matsumoto Y, Kim HJ, Miyata K, Taguchi A, Tomio K, Yamashita A, Inoue T, Nakamura H, Fujimoto A, Sato M, Yoshida M, Adachi K, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Oda K, Nagamatsu T, Nishiyama N, Kataoka K, Osuga Y, Fujii T. *J Control Release*. 2016 10;231:29-37.

PMID: 26979870

4. Decreased expression of the plasminogen activator inhibitor type 1 is involved in degradation of extracellular matrix surrounding cervical cancer stem cells.  
Sato M, Kawana K, Adachi K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, Nishida H, Inoue T, Taguchi A, Takahashi J, Kojima S, Yamashita A, Tomio K, Nagamatsu T, Wada-Hiraike O, Oda K, Osuga Y, Fujii T.  
Int J Oncol. 2016, 48(2):829-35.  
PMID: 26676222
5. Clinical significance of Gremlin 1 in cervical cancer and its effects on cancer stem cell maintenance.  
Sato M, Kawana K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, Nishida H, Inoue T, Taguchi A, Takahashi J, Adachi K, Nagasaka K, Matsumoto Y, Wada-Hiraike O, Oda K, Osuga Y, Fujii T.  
Oncol Rep. 2016, 35(1):391-7. PMID: 26530461
6. Heightened potency of human pluripotent stem cell lines created by transient BMP4 exposure.  
Yang Y, Adachi K, Sheridan MA, Alexenko AP, Schust DJ, Schulz LC, Ezashi T, Roberts RM. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015, 5;112(18):E2337-46. PMID: 25870291

〔学会発表〕(計 4 件)

1. HLA-G expression of cervical reserve cell-like cells regenerated from human induced pluripotent stem (iPS) cells and its relationship with cervical cancer stem cells in immune escape.  
Masakazu Sato · Kei Kawana · Asaha Fujimoto · Katsuyuki Adachi · Ayumi Taguchi · Mitsuyo Yoshida · Hiroe Nakamura · Aki Yamashita · Juri Takahashi · Kazunori Nagasaka · Takahide Arimoto · Katsutoshi Oda · Yutaka Osuga · Tomoyuki Fujii.  
2015 年 第 30 回 日本生殖免疫学会学術集会 熊本県民交流館パレオ(熊本県、熊本市)
2. Cancer related fibroblasts (CAFs) control killer activity of natural killer cell through the poliovirus receptor (PVR: CD155) and have an important role for tumor expansion.  
Tomoko Inoue · Kei Kawana · Katsuyuki Adachi · Ayumi Taguchi · Ken Nagamatsu

· Masakazu Sato · Mitsuyo Yoshida · Juri Takahashi · Asaha Fujimoto · Hiroe Kamoto · Aki Yamashita · Kazunori Nagasaka · Yutaka Osuga · Tomoyuki Fujii

2015 年 第 30 回 日本生殖免疫学会学術集会 熊本県民交流館パレオ(熊本県、熊本市)

3. The modulation of adaptive immune response by oncogene K-ras; mouse model of ovarian cancer.  
Juri Takahashi · Kei Kawana · Ayumi Taguchi · Mitsuyo Yoshida · Hiroe Nakamura · Asaha Fujimoto · Masakazu Sato · Tomoko Inoue · Katsuyuki Adachi · Kazunori Nagasaka · Katsutoshi Oda · Yutaka Osuga · Tomoyuki Fujii  
2015 年 第 30 回 日本生殖免疫学会学術集会 熊本県民交流館パレオ(熊本県、熊本市)
4. Contribution of STAT3 on the resistance of cervical cancer against TRAIL-induced apoptosis.  
Hiroe Nakamura · Kei Kawana · Ayumi Taguchi · Mitsuyo Yoshida · Masakazu Satoh · Asaha Fujimoto · Katsuyuki Adachi · Kaori Koga · Katsutoshi Oda · Yutaka Osuga · Tomoyuki Fujii  
2015 年 第 30 回 日本生殖免疫学会学術集会 熊本県民交流館パレオ(熊本県、熊本市)

〔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

足立克之 (ADACHI, Katsuyuki)  
東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 90735200

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :