

平成 22 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591942

研究課題名（和文） 卵巣癌の腫瘍幹細胞に発現する分子を標的にした新たな癌分子治療の確立に関する検討

研究課題名（英文） Establishment of newly cancer therapy for expression of target molecules with cancer stem cells in ovarian carcinoma

研究代表者

安田 真一（YASUDA SHIN-ICHI）

獨協医科大学 医学部 主任

研究者番号：60133279

研究成果の概要（和文）：

我々は卵巣癌幹細胞に発現する分子を解析し、より卵巣癌幹細胞に特異な分子を見出し、これを標的とした新しい選択的がん治療法を確立すれば期待できる治療成績を得ることが出来るのではという考えから検討を行った。まず細胞周期の休止期 G0 期を検出する方法にて、癌幹細胞の G0 期の細胞では抗癌剤排泄に関与する ABCG2 とフォークヘッド型転写因子で G0 期を制御する遺伝子 FOXO3a、ユビキチンリガーゼサブユニット FBw 7 の特異発現と ABCG2 遺伝子を調節する microRNA の強発現を見出した。一方、SP 細胞の検出法では高頻度の SP 細胞を有する明細胞線癌株を見出した。本細胞は臨床像と似た脂肪細胞様の形態を呈し、脂肪細胞に特異的遺伝子 PPAR $\gamma$  遺伝子が強発現しており、抗癌剤が効きにくいことおよび未分化維持に関連するのではと推測された。マイクロアレーにてもこの関連の遺伝子が得られた。

研究成果の概要（英文）：

We assumed that we can obtain favorable therapy results by establishing a new selective cancer therapy through analyzing an expressed molecular to ovarian cancer stem cells, selecting more specific molecular to ovarian cancer stem cells, and use them as a marker for the therapy. Firstly, In cell cycle G0 phase, we detected three genes; ABCG2 which relate to anticancer drug efflux, FOXO3a that is a G0 phase suppressor gene and specific expression of ubiquitin ligases subunit FBw7. We also detected high expression of microRNA for regulating ABCG2 gene in G0 cells. Whereas, By side population (SP) method, we detected the cancer stem cell in clear cell adenocarcinoma which include high frequency SP cells. Since these cells showed adipocytes-like character similar to a clinical picture and PPAR $\gamma$  that specific gene to adipocytes was highly expressed, an anticancer drug does not effect well and maintain of cell undifferentiation. We detected similar genes at microarray.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：腫瘍幹細胞 ヒト卵巣癌 分子治療標的 マイクロRNA 明細胞腺癌

1. 研究開始当初の背景

これまでの癌に対する大部分の研究は、癌組織や癌細胞株のヘテロクローンな細胞集団に対して行われてきた。これらの方法に基づいた成果での卵巣癌細胞の治療に対して十分満足な結果が得られていない要因として、標的遺伝子の発現がヘテロクローンの個々の細胞でまちまちであるためと考えられた。最近 成体の正常組織幹細胞の存在と関連して、多くの腫瘍でヘテロクローンの癌細胞の集団中にも自己複製能および不均等分裂能を有したごく少数の癌特異的幹細胞が存在することが示されており、この細胞が腫瘍増殖の制御等をしているようであることから、この癌幹細胞を標的にする癌治療法が考えられた。

2. 研究の目的

我々は卵巣癌幹細胞に発現する分子を解析し、この細胞がこれまでヘテロクローン細胞集団を対象に解析されてきた種々の知見・治療と違うところを検索すれば、より卵巣癌幹細胞に特異的な分子が見出せ、これを標的とした新しい選択的がん治療法を確立すれば期待できる治療成績を得ることが出来るのではと考えた。そこで卵巣癌幹細胞に発現する分子の検索をし、この制

御を検討することを目的にした。

3. 研究の方法

(1)卵巣癌細胞株を細胞周期の休止期 G0 期を検出する方法にて腫瘍幹細胞を分離することを試みた。即ち Pyronin Y および Hoechst 33342 で染色した細胞を FACS Aria に解析した。Hoechst 33342 はバイオレットレーザーで励起してバイオレットを 450nm にて、また Pyronin Y は 488nm にて励起して FL-2 578nm にて測定を実施し G0 細胞と非 G0 細胞を分離した。そして腫瘍幹細胞に発現する分子を RT-PCR にて検索した。また腫瘍幹細胞に発現する microRNA を検索した。

(2)卵巣癌細胞株をHoechst 33342で染色した細胞をMoFloフローサイトメーターにて解析およびソーティングは解析した。なお解析およびソーティング条件は紫外線レーザーにて励起して 422/44BPと590/35BPの2つの波長フィルターを用いてHoechst redとHoechst blueを測定し、阻害剤 verapamilにより消失する細胞をHoechst 色素の排泄能の高い集団のSide population (SP)とし癌幹細胞の同定・分離をし、この細胞の分子解析をRT-PCRおよびマイクロアレイにて解析し

た。

#### 4. 研究成果

(1)細胞周期の休止期G0期を検出する方法により分離した腫瘍幹細胞に発現する分子

G0細胞には抗癌剤排泄に関与するABCトランスポーターGタイプのABCG2とフォークヘッド型転写因子でG0期を制御する遺伝子FOXO3aの発現が見られた。さらに腫瘍抑制遺伝子で、ユビキチンリガーゼサブユニットFBw7がG0分画で強発現していた。またABCG2遺伝子を調節するmicroRNAの強発現を見出した。

(2)Hoechst 色素染色によるSP細胞の解析

明細胞癌細胞株に高頻度のSP細胞を呈するものを見出した。この細胞にはABCG2とMDR-1遺伝子が強発現していた (Fig 4)。

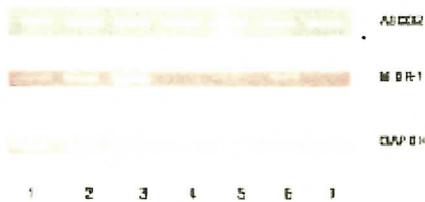
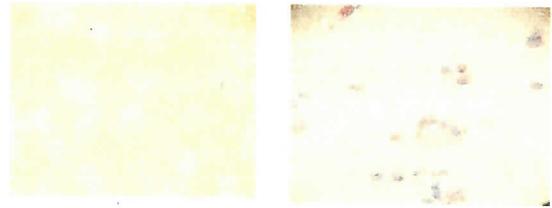


Fig 4 Drug resistance genes expression of ovarian cancer cell lines

1 OVCAR3 2 OVCAR4 3 OVCAR5 4 SKOV3 5 OVCAR8 6 OVCAR9 7 OVCAR10

またこの細胞は高度に脂肪の蓄積をして脂肪細胞様に変化する性状を呈して抗癌剤が効きにくくなっていると思われた (Fig 3)。これに関連の脂肪細胞関連遺伝ADRP、脂肪細胞に特異的発現する遺伝子PPAR $\gamma$ が強発現しており、PPAR $\gamma$ が未分化状態の維持に関与しているのではと推測された。マイクロアレイでも細胞周期、転写因子とエネルギーに関連する分子が得られた。また、SP細胞が培養器材へ吸着能が強いことを見だし、これらのリガンド分子が生体内の特定場所やニッチへの接着に関与するのではと考えられた。



Phasecontrast

Oil Red O stain

#### 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. Imai Y, Ohmori K, Yasuda S, Wada M, Suzuki T, Fukuda K, Ueda Y  
Brest cancer resistance protein/ABCG2 is differentially regulated downstream of extracellular signal-regulated kinase Cancer Sci. 査読有 100(8) 1118-1127, 2009

2. Akatsuka K, Kaburagi T, Yasuda S, Ohmori K, Abe K, Sagara H, Ueda Y, Nagao K, Imura J, Imai Y

Impact of functional ABCG2 Polymorphisms on the adverse effects of gefinib in Japanese patients with non-small lung cancer, Cancer Chemother Pharmacol, 査読有 211-216, 2009

[学会発表] (計3件)

1. Yasuda S, Nonaka Y, Imura I, Imai Y, Fukasawa I, Kobayashi K, Inaba N

The analysis of cell cycle in G0 phase method for cancer stem cells

68<sup>th</sup> Ann Meet Japanese Cancer Association, Oct. 1-3, 2009, Yokohama

2. Imura I, Tomita S, Ichikawa K, Yasuda S, Fukui K, Sekikawa A, Iguchi H, Fujimori T  
Do the TJ factor participate for formation

of spheroid in pancreatic cancer cells?

68<sup>th</sup> Ann Meet Japanese Cancer Association, Oct.

1-3, 2009, Yokohama

3. 井村譲二、富田茂樹、市川一仁、安田真一、  
福井広一、関川 昭、藤盛孝博  
膵癌胞の spheroid 形成の tight junction  
因子の関与  
第 97 回日病理学会 5 月 2009 京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安田 真一 (YASUDA SHIN-ICHI)

獨協医科大学 医学部 主任

研究者番号：60133279

### (2) 研究分担者

稲葉 憲之 (INABA NORIYUKI)

獨協医科大学 医学部 教授

研究者番号：70114238

### 研究分担者

深澤 一雄 (FUKASAWA ICHIO)

獨協医科大学 医学部 教授

研究者番号：00189911