

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09994

研究課題名(和文) 子宮頸癌幹細胞における放射線抵抗性機序の解明と癌幹細胞標的放射線治療法の確立

研究課題名(英文) Identification of the mechanisms of radioresistance in cancer stem cells.

研究代表者

小川 和彦 (OGAWA, KAZUHIKO)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40253984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、子宮頸癌幹細胞における放射線抵抗性機序の解明を行い、癌幹細胞を標的とした新規放射線治療法の開発に向けての基盤を構築することを目的とする。研究により、癌幹細胞と非癌幹細胞の間には、mRNAでは43の遺伝子、miRNAでは5つにおいて4倍以上の発現変化の違いが認められた。具体的にはmRNAでは、ADAMT55, FRMD3, COL8A1, miRNAはhas-miR-377-3p、has-miR-654-3p等である。miRNAに関しては、miR-654-3pにおいて、TCGAのデータを使用した予後解析の検討では、高値群では定値群と比較して優位に予後が良好であった。

研究成果の概要(英文)：This study has investigated the mechanisms of radioresistance concerning uterine cervical cancer stem cells, and explored the innovative treatments for cancer. We have identified the 43 mRNAs and several miRNAs that significantly differed in expressions between cancer stem and non-cancer stem cells. These mRNA includes ADAMT55, FRMD3, COL8A1, and miR-377-3p, has-miR-654-3p in miRNA. Concerning miR-654-3p, significant difference in survivals were observed between patients with high expression and those with low expression using TCGA database. We will continue the studies especially using the clinical samples in future.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：癌幹細胞 放射線治療 子宮頸癌

1. 研究開始当初の背景

現在、我が国において癌の死亡数と罹患数は、人口の高齢化を主な要因として共に増加し続けている。子宮頸癌における日本における発生率・死亡率については、衛生状態の改善やがん検診の普及などによって1980年代以降、減少傾向であったが、2000年代になって再び増加傾向となっている。さらには、発展途上国においては、発生率・死亡率ともに最も高い疾患の一つで、その予防と対策は重要な課題となっている。

子宮頸癌に対する治療の主体は手術と放射線治療であり、早期においては放射線治療単独においてもI期で80-90%、II期で60-80%と比較的良好な成績が報告されている。我が国では高齢者人口の増加が続いており、高齢者でも体にあまり負担をかけずに「切らずに」癌を治すことが可能である放射線治療への要請はますます高まると予想される。しかしながら、進行期における治療成績は不良であり、III期では40-60%、IVA期では10-20%程度の生存率となっている。従って、進行期においての治療成績は改善の余地が残されているのが現状であり、さらなる治療成績の改善が必要である。さらには、初期であっても放射線治療抵抗性である腫瘍が少なからず認められ、より効果的な治療法の開発が望まれている。

近年、基礎研究において「癌幹細胞」とよばれる放射線治療抵抗性、抗癌剤抵抗性を示す、癌細胞の中でも1%程度の細胞集団の存在を示す報告が数多くなされ、放射線治療後の再発に深く関わっていることが明らかとなってきた (Nature 2003, Nature 2006 など)。1997年に造血器腫瘍で初めて癌幹細胞が報告されたが (Nat Med 1997)、その後様々な固形腫瘍で癌幹細胞の存在が明らかとなってきた (Nature 2005; Stem Cell 2007, etc)。癌幹細胞は、自己複製能、多分化能と腫瘍形成能を有した細胞であると定義される。癌幹細胞は、抗癌剤療法・放射線療法へ抵抗性を示す根源であると考えられ、癌幹

細胞から非癌幹細胞が発生することにより、腫瘍体積が増大し病態を悪化させる (Nature 2001)。従って、放射線治療成績のさらなる改善には、このような癌幹細胞を標的として根絶するようなアプローチでの研究も重要である。しかしながら、子宮頸癌幹細胞における放射線耐性機序を含めた報告は現在のところ認められず、子宮頸癌幹細胞における放射線耐性の全容については明らかとなっていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は、子宮頸癌幹細胞における放射線抵抗性機序の解明を行い、癌幹細胞を標的とした新規放射線治療法の開発に向けての基盤を構築することを目的とする。癌幹細胞の放射線抵抗性の機序については、現在までに脳腫瘍や乳癌細胞株等で、(1) DNA 損傷修復機能の亢進 (Bao et al. Nature, 2006)、(2) 活性酸素種の活性低下 (Diehn et al. Nature, 2009)、(3) 自己複製遺伝子発現による細胞増殖の増大 (Wang et al. Stem Cells, 2010) というような点が示唆されているのみであり、子宮頸癌幹細胞の放射線抵抗性機序については明らかになっていない。子宮頸癌幹細胞の放射線抵抗性機序が明らかとなり、その抵抗性を示す機序を標的とした新規治療法を開発することができれば、子宮頸癌に対してより効果的な放射線治療を行うことが可能となり、子宮頸癌(特に進行性腫瘍や難治性腫瘍)の根絶化に向けて大きく寄与することが期待される。

3. 研究の方法

【研究内容(概要)】本研究では、子宮頸癌癌幹細胞における放射線抵抗性機序の解明を行い、癌幹細胞を標的とした新規放射線治療法の開発に向けての基盤を構築する。癌細胞の中において、およそ1%以下の比率で存在する癌幹細胞のイメージング技術を細胞に導入することにより、現在我々は、子宮頸癌の癌幹細胞を光らせるZsGreen-degronタンパクの細胞への導入

によって癌幹細胞を蛍光顕微鏡で容易に同定し、セルソーターで回収する方法を既に確立している。この延長線上に本研究を位置づけている。今回同定できた細胞における自己複製能、多分化能、造腫瘍能が非癌幹細胞と比較してそれぞれ有意に増強していた。さらには、放射線抵抗性についても、癌幹細胞は非癌幹細胞と比較して有意に放射線耐性であった。

平成27年度

1 子宮頸癌幹細胞における放射線抵抗性機序の解析

2 種類の子宮頸癌細胞 (Hela, CaSki) を使用する。両細胞共に、ZsGreen-degron を用いた手法により、それらの癌幹細胞の同定 (自己複製能、多分化能、腫瘍形成能あり) と可視化を既に完了している (Ogawa K, et al. 投稿中)。本研究では、これらの細胞を使用して検討を行う。

癌幹細胞関連細胞伝達経路の検討

現在までの報告による DNA 損傷修復機能の亢進、活性酸素種の活性低下、自己複製遺伝子発現による細胞増殖の増大が子宮頸癌幹細胞の放射線抵抗性に関与しているかどうかの検討を行う。具体的には、癌幹細胞群、非癌幹細胞群における DNA repair (H2AX 等)、ROS、Self-renewal (Wnt/ -Catenin, Sonic Hedgehog, Notch, Bmi-1 等) に関連する遺伝子や蛋白発現の検討を行う。そして、確認できた子宮頸癌細胞の放射線抵抗性に関与する経路をウイルスベクターを用いてノックダウンあるいは過剰発現させた細胞に放射線照射を行い、放射線抵抗性のメカニズムを解明する。その際に、照射線量については1回照射で2-10 Gyを行い、癌幹細胞群、非癌幹細胞群の細胞生存曲線の比較を行う。

上皮間葉系形質転換 (Epithelial Mesenchymal Transition (EMT)) 経路の検討

従来から、「癌幹細胞」から「非癌幹細胞」の流れは一方であると思われてきたが、最近種々のストレスにより「非癌幹細胞」から「癌幹細胞」が逆方向に脱分化(先祖返り)する可能性が指摘され、報告されてきた(Nature 2011; Cell 2013)。この脱分化(先祖返り)は、親玉の「癌幹細胞」の増加や活性化を通じて、浸潤・再発・転移を来す原因になると考えられ、臨床的に現行抗癌剤・放射線療法に困難を極める結果となる。放射線療法施行時における先祖返りを来すメカニズムの解明を行うことができれば、難治性悪性腫瘍の治療成績を格段に向上させることが強く期待される。現時点では、上皮間葉系形質転換 (EMT) における TGF β , ZEB1, 2 の系路であり、特に遊離癌幹細胞で活性化した PLS3 系路 (Cancer Res 2013) が最も重要であると考えられる。今回の検討では、主に癌幹細胞に対して TGF- を投与することにより、細胞の増加が認められるかの検討を行う。

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

これまでに指摘されている癌幹細胞の放射線抵抗性メカニズムのみならず、全く新しいメカニズムの探索を網羅的に行う。まず、in vitro で癌幹細胞と非癌幹細胞で比較しながら、cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析する。特に、細胞周期や放射線 DNA 損傷修復に関連する遺伝子発現や CD133, ALDH, CD44+CK17+ 等の子宮頸癌に関連すると考えられる細胞表面マーカーや臨床的悪性度と予後との関連が報告されている Oct4, Nanog, Nucleostemin, musashi1 等の遺伝子発現にも注意を払う。マイクロアレイで同定された遺伝子群の発現状況の確認は real-time PCR、蛋白発現は Western blotting にて行う。さらに、と同様にノックダウンや過剰発現を行うことによりメカニズムの同定を行う。

平成27年度以降

1 同定した標的遺伝子群による放射線耐性のマウス実験での確認

同定した候補遺伝子を、ウイルスベクターを用いてノックダウンまたは過剰発現させた癌幹細胞を作成する。そして NOD/SCID マウスに移植し、放射線照射 (2-10 Gy) を行い、腫瘍の放

射線感受性の変化を確認し、また癌幹細胞の real-time での変化を観察する。さらに腫瘍を摘出して、候補遺伝子やそれに関連した遺伝子発現を免疫染色にて解析する。間質の影響についても確認を行う。

2 同定した標的遺伝子群を標的とした治療 阻害剤によるマウス実験での放射線耐性改善の確認

1と同様に NOD/SCID マウスに癌幹細胞を移植し腫瘍を形成させてから、同定した候補標的遺伝子の関連する放射線抵抗性 pathway の阻害剤をマウスに投与しながら放射線照射を行い、腫瘍の感受性の増加を確認する。

3 新規併用療法(化学療法、分子標的療法)の開発

新規抗癌剤、新規分子標的薬を用いた細胞機能実験と解析を行う。今回の候補については、一般的な各種抗癌剤 (CDDP, 5FU, TXN, ADR 等)、分子標的薬 (EGFR inhibitor, PARP inhibitor 等)に当科で行っている薬剤スクリーニング(玉利慶介、科学研究費助成事業 挑戦的萌芽 2014-2015 にて助成中)で同定された薬剤の使用も試みる。

1)新規抗癌剤、新規分子標的薬使用濃度を選定する目的で様々な濃度に希釈された抗癌剤、分子標的薬を投与した細胞生存率を Colony formation assay、細胞増殖能を MTT assay を用いて評価する。生存率及び増殖能に変化が見られた薬剤濃度を以降の実験に用いる。

2)細胞に対して 非処置群 (Control)、新規抗癌剤または分子標的薬単独投与群、X線照射群、新規抗癌剤または分子標的薬とX線併用群に分けて、それぞれの細胞生存率を Colony formation assay、細胞増殖能を MTT assay、接着能を Adhesion assay、遊走能を Boyden chamber assay、浸潤能を Matrigel invasion assay を用いて評価し、新規抗癌剤・分子標的薬による細胞致死効果及び転移能を分析する。

上記の検討により同定した薬剤を使用し、マウス実験により殺腫瘍効果及び転移阻害効果を確認する。さらには高圧酸素療法(科学研究費助成事業 平成 24 - 26 年度基盤Cによる研究)等による癌幹細胞に対する治療効果の検討を行う。

4 臨床検体における同定遺伝子発現と予後との関連の検討

2000 - 2013 年の子宮頸癌根治的放射線治療後の約 100 症例における治療前生検組織の検討を行う。同定した放射線抵抗性関連遺伝子発現の程度を免疫組織学的染色にて行う。HPV の感染、HPV subtype と同定遺伝子群との関連や、同定遺伝子群と臨床的予後との関連についても検討する。

4 . 研究成果

癌幹細胞群、非癌幹細胞群における DNA repair (H2AX 等)、ROS、Self-renewal (Wnt/ -Catenin、Sonic Hedgehog、Notch、Bmi-1 等)に関連する遺伝子や蛋白発現の検討の結果、一部の遺伝子群が癌幹細胞にて有意に発現が上昇していた。次に、確認できた子宮頸癌細胞の放射線抵抗性に関与する経路をウイルスベクターを用いてノックダウンあるいは過剰発現させた細胞に放射線照射を行い、放射線抵抗性のメカニズムの解明を目指した。照射線量については 1 回照射で 2-10 Gy を行い、癌幹細胞群、非癌幹細胞群の細胞生存曲線の比較を行った。更に、Hela の癌幹細胞、非癌幹細胞において、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。まず、in vitro で癌幹細胞と非癌幹細胞で比較しながら、cDNA マイクロアレイを用いて網羅的解析を行った。その結果、mRNA では 43 の遺伝子、miRNA では 5 つにおいて 4 倍以上の発現変化が認められた。具体的には mRNA では、ADAMT55、FRMD3、COL8A1、miRNA は has-miR-377-3p、has-miR-654-3p 等である。その後、マイクロアレイで同定された遺伝子群の発現状況の確認を real-time PCR、蛋白発現は

Western blotting にて行った。mRNA に関しては、up-regulation の FOXF1, down-regulation している POSTIN に着目した。miRNA に関しては、miR-654-3p では、Data from the Cancer Genome Atlas (TCGA)のデータを使用した予後解析の検討では、高値群では定値群と比較して優位に予後が良好であった ($p < 0.05$)。また、代謝面においては、ポリアミンが LSD1 を介して、癌幹細胞の epigenetics を制御することが明らかとなった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

ポリアミンは LSD1 を介して癌幹細胞のエピジェネティクスを制御する。玉利慶介、石井秀始、金野雅充、浅井歩、小関準、虎谷昌保、土岐祐一郎、森正樹、小川和彦。日本癌学会総会記事 76 回 Page P-1207(2017.09)

〔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

小川 和彦 (OGAWA Kazuhiko)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40253984

(2)研究分担者

石井 秀始 (ISHII Hideji)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10280736

(3)研究分担者

木村 正 (KIMURA Tadashi)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90240845

(4)連携研究者

なし

(5)研究協力者

なし