

令和元年5月23日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08649

研究課題名(和文) 悪性腫瘍における腫瘍幹細胞の可塑性を制御する因子の解析

研究課題名(英文) Analysis of plasticity of cancer-initiating cells in malignant tumors

研究代表者

池田 純一郎 (Ikeda, Jun-ichiro)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20379176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜癌の腫瘍細胞株を用いて、腫瘍幹細胞の可塑性を惹起しやすい状態とそうでない状態の細胞でRNA-seq解析を行ったところ、可塑性を惹起しやすい状態で発現の高いglycoprotein M6B (GPM6B)が、子宮内膜癌の病理組織標本でALDHの陽性領域に一致するようにGPM6B陽性細胞がみられる症例が認められ、惹起しにくい状態で発現するglycine N-methyltransferaseによってグリシンから生成されるサルコシンを腫瘍細胞株に投与すると、濃度依存性にALDHの高活性細胞の割合が減少する傾向がみられた。これらは腫瘍幹細胞の可塑性の制御に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍の中には化学療法や放射線療法に抵抗性で、再発や転移の原因になるとされる「腫瘍幹細胞」と呼ばれる細胞群が存在し、「腫瘍幹細胞」の制御ががん治療の重要な鍵となっている。従来、「腫瘍幹細胞」から「腫瘍幹細胞」と「非腫瘍幹細胞」が生み出され、「非腫瘍幹細胞」から「腫瘍幹細胞」にはならないとされてきたが、「非腫瘍幹細胞」が「腫瘍幹細胞」に転換しうる「可塑性」を有することが報告され、治療を考える上でより複雑な状況になってきている。この可塑性のメカニズムを解明することでがん治療への応用につながる可能性があり、本研究成果は学術的にも社会的にも意義あるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：RNA-seq analysis was performed on cells in a state in which cancer-initiating cells (CICs) were likely to cause plasticity and in a state in which CICs were not easily induced using endometrioid carcinoma cell lines. Glycoprotein M6B (GPM6B) found in a state in which plasticity was likely to occur was immunohistochemically expressed in agreement with the ALDH-positive area in endometrioid carcinoma cases. When sarcosine, which was produced from glycine by glycine N-methyltransferase, which was expressed in a state that was difficult to induce CICs, was administered to cancer cell lines, the proportion of cells with high ALDH activity was decreased in a concentration-dependent manner. It was suggested that these factors might be involved in the control of CIC plasticity.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腫瘍幹細胞 病理学 子宮内膜癌 アルデヒド脱水素酵素 可塑性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は、早期発見や治療法の開発などによって治癒しうる疾患になりつつあるが、依然として死因の第一位である。また、罹患数も増加傾向にあり医療費高騰の一因となっている。医療費削減のためには腫瘍と診断された際に各々の腫瘍の個性に応じた治療法を選択する必要がある。そのためには、対象となる腫瘍の性格を精細に判定することが求められる。

2. 研究の目的

腫瘍は単一クローンに由来するが多様性のある集団であり、その中に腫瘍幹細胞とよばれる化学療法や放射線療法に抵抗性で再発や転移の原因となる一群の小集団が存在するとされており、悪性腫瘍の治療を考えるうえで重要な要因である。これまで腫瘍幹細胞は自分自身を複製すると同時に非腫瘍幹細胞を産生するが、非腫瘍幹細胞からは腫瘍幹細胞は生み出されないとされてきた。しかし近年、非腫瘍幹細胞からも腫瘍幹細胞が形成されるといふ、いわゆる「可塑性」がみられることがわかり(図1)、この可塑性を制御することが悪性腫瘍の治療において重要な要因になると考えられる。そこで、我々は様々な腫瘍における腫瘍幹細胞の可塑性を検討し、それを制御する因子を同定することを計画した。

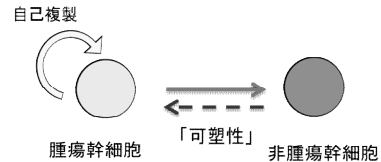


図1 腫瘍幹細胞と非腫瘍幹細胞の関係

3. 研究の方法

(1) 腫瘍細胞株を FACS にて腫瘍幹細胞を多く含むと考えられる画分を単離する。同時に腫瘍幹細胞が存在しないとされている画分(非腫瘍幹細胞)もコントロールとして単離する。具体的には、腫瘍細胞株を用いて腫瘍幹細胞マーカーの候補として報告されているアルデヒド脱水素酵素(ALDH)活性について ALDEFLUOR 法を用いて染色を行い、発現レベルの高い画分、低い画分を単離する。

(2) 腫瘍幹細胞と非腫瘍幹細胞を単離後 12 時間培養し、ALDEFLUOR 法にて ALDH 陽性細胞、陰性細胞を検討すると、ALDH 陽性細胞からは ALDH 陽性、陰性いずれの細胞集団も産生される。一方、ALDH 陰性細胞からは、ほとんどが ALDH 陰性細胞となるが、ALDH 陽性細胞も産生されてくる。この ALDH 陰性から ALDH 陽性に変換された細胞集団が、腫瘍幹細胞の可塑性の結果生じた集団である(図2)。つまり、腫瘍幹細胞の可塑性の指標は、ALDH 陰性から陽性に変換した細胞の割合となる。本研究では、非腫瘍幹細胞 (ALDH 陰性細胞) から腫瘍幹細胞 (ALDH 陽性細胞) への変換率に及ぼす腫瘍幹細胞自身の影響を調べるが、非腫瘍幹細胞と腫瘍幹細胞を混在させると混在する腫瘍幹細胞自身の ALDH 活性が、非腫瘍幹細胞から新たに変換された腫瘍幹細胞の ALDH 活性をマスクしてしまう。

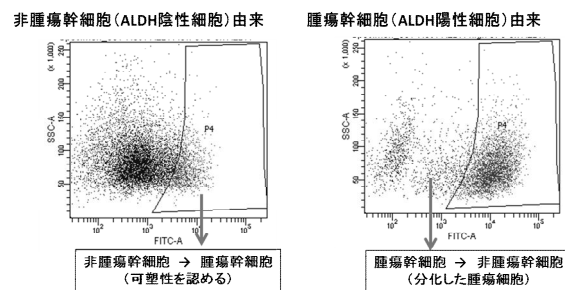
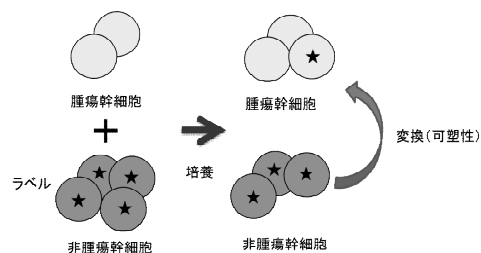


図2 腫瘍幹細胞の可塑性の解析

そこで、非腫瘍幹細胞を予め赤色色素でラベルして、腫瘍幹細胞と共培養する。その後、ALDEFLUOR 法を行い、赤色色素でラベルされた細胞のみの ALDH 活性に着目することで、非腫瘍幹細胞から腫瘍幹細胞への変換効率を計算することができる(図3)。



(3) 腫瘍幹細胞の可塑性について、ALDH 陽性細胞で可塑性を惹起しやすい状態と惹起しにくい状態の間でマイクロアレイまたは RNA-seq を利用し、腫瘍幹細胞自身もつ可塑性制御因子を同定する。これにより、腫瘍幹細胞と非腫瘍幹細胞の可塑性を制御する因子が明らかとなる。

腫瘍幹細胞への変換率の算出

A= (●) (非腫瘍幹細胞)の数

B= (★) (非腫瘍幹細胞から腫瘍幹細胞に変換した細胞)の数

変換率 (%) = $B / (A + B) \times 100$

図3 非腫瘍幹細胞から腫瘍幹細胞への変換率の算出

(4) 同定した因子が実際の臨床検体でも特異的であるかについて、臨床検体の腫瘍細胞に可塑性を制御する腫瘍幹細胞由来因子を作用させることでの腫瘍幹細胞への変換率を検討する。必要に応じて NOD/SCID マウスに腫瘍を移植し由来因子を作用させることによる腫瘍動態の変化も検討する。また、病理組織標本上での可塑性を制御する腫瘍幹細胞由来因子の描出を行い、予後との関係や組織学的な存在部位を確認する。

4. 研究成果

(1) 子宮内膜癌の腫瘍細胞株を用いて、多くの腫瘍で腫瘍幹細胞のマーカーとされている ALDH をターゲットとして腫瘍幹細胞および非腫瘍幹細胞を多く含む画分を分取し、非腫瘍幹細胞から腫瘍幹細胞への変換における腫瘍幹細胞自身の関与を検討した。その結果、腫瘍幹細胞は、自己複製能が高い時には可塑性を惹起する能力が高いが、自己複製能が低く分化傾向が高い時には逆に可塑性を抑制する傾向があることがわかった。また、メッシュを用いて細胞同士の接触を調節することにより、可塑性を惹起する能力は腫瘍幹細胞と非腫瘍幹細胞の直接接触を介するが、抑制する能力は液性因子の介在を示唆する結果が得られた(図4)。さらに、可塑性を惹起する能力は腫瘍幹細胞を維持する性質が強いものほど高い傾向がみられた。

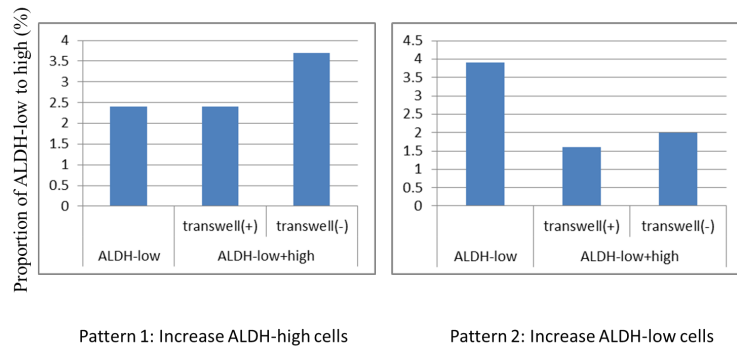


図4 腫瘍幹細胞の可塑性の検討

(2) ALDH をターゲットとして可塑性を惹起しやすい状態とそうでない状態の細胞を採取し、そこから RNA を抽出して RNA-seq 解析を行った。その結果、可塑性を惹起しやすい状態で発現の高い遺伝子と可塑性を来たさずにより分化する方向へ向かう場合に発現の高い遺伝子について複数の候補が検出された。より分化する方向へ向かう際に発現する遺伝子として glycine N-methyltransferase (GNMT) が候補となり、GNMT のよってグリシンから生成されるサルコシンを腫瘍細胞株に投与すると、濃度依存性に ALDH の高活性細胞の割合が減少する傾向がみられた。また、可塑性を惹起しやすい状態で発現の高い、神経発生にも関与する glycoprotein M6B (GPM6B) について子宮内膜癌の病理組織標本で免疫染色を行ったところ、ALDH の陽性領域に一致するように GPM6B 陽性細胞がみられる症例が認められ、腫瘍幹細胞の可塑性の惹起に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 22 件)

- (1) 田原紳一郎, 池田純一郎 (他 8 名, 9 番目) SDPR Regulates ALDH1 via ILK Signaling in Endometrioid Carcinoma Cells. *Cancer Sci*, 2019;110:1804-1813. 査読有
doi: 10.1007/s10120-018-00918-4.
- (2) 多根井智紀, 池田純一郎 (他 11 名, 10 番目) Cascade Reaction in Human Live Tissue Allows Clinically Applicable Diagnosis of Breast Cancer Morphology. *Adv Sci (Weinh)*. 2018;6(2):1801479. 査読有
doi: 10.1002/advs.201801479
- (3) 和田直樹, 池田純一郎 (他 8 名, 9 番目) Effect of glutamine on lymphoplasmacytic lymphoma, especially on the viewpoint of the differentiation into vulnerable subpopulation. *Pathol Res Pract*. 2018; 214(10):1667-1674. 査読有
doi: 10.1016/j.prp.2018.08.019.
- (4) 倉重真沙子, 池田純一郎 (他 9 名, 8 番目) Origin of cancer-associated fibroblasts and tumor-associated macrophages in humans after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Commun Biol*, 2018 Sep 3;1:131. 査読有
doi: 10.1038/s42003-018-0137-0.
- (5) 内田儀一郎, 池田純一郎 (他 4 名, 3 番目) Effect of plasma-activated medium produced by direct irradiation on cancer cell killing. *Japanese Journal of Applied Physics*, 2018; 57:096201. 査読有
- (6) 三嶋千恵子, 池田純一郎 (他 9 名, 3 番目) Mutational analysis of AKT1 and PIK3CA in intraductal papillomas of the breast with special reference to cellular components. *Am J Pathol*, 2018;188(5):1106-1112. 査読有
doi: 10.1016/j.ajpath.2018.01.005.
- (7) 朴幸基, 池田純一郎 (他 8 名, 9 番目) Adenylosuccinate lyase enhances aggressiveness of endometrial cancer by increasing killer cell lectin-like receptor C3 expression by fumarate. *Lab Invest*, 2018;98(4):449-461. 査読有
doi: 10.1038/s41374-017-0017-0.
- (8) 池田純一郎 (他 5 名, 1 番目) Plasma-activated medium (PAM) kills human cancer-initiating

cells. Pathol Int, 2018;68:23-30. 査読有

doi: 10.1111/pin.12617.

(9)野島聡, 池田純一郎 (他 15 名, 14 番目) CUBIC pathology: three-dimensional imaging for pathological diagnosis. Sci Rep, 2017 Aug 24;7(1):9269. 査読有

doi: 10.1038/s41598-017-09117-0.

(10)松井崇浩, 池田純一郎 (他 9 名, 6 番目) Non-labeling multiphoton excitation microscopy as a novel diagnostic tool for discriminating normal tissue and colorectal cancer lesions. Sci Rep, 2017;7:6959. 査読有

doi:10.1038/s41598-017-07244-2

(11)和田直樹, 池田純一郎 (他 5 名, 2 番目) Effect of plasma-activated medium on the decrease of tumorigenic population in lymphoma. Pathol Res Pract, 2017;213(7):773-777. 査読有

doi: 10.1016/j.prp.2017.04.003.

(12)大島健司, 池田純一郎 (他 10 名, 10 番目) Argininosuccinate Synthase 1-Deficiency Enhances the Cell Sensitivity to Arginine through Decreased DEPTOR Expression in Endometrial Cancer. Sci Rep, 2017;7:45504. 査読有

doi: 10.1038/srep45504.

(13)池田純一郎 (他 8 名, 1 番目) Immunohistochemical analysis of the novel marginal-zone B-cell marker IRTA1 in malignant lymphoma. Hum Pathol, 2017;59:70-79. 査読有

(14)大野将一, 池田純一郎 (他 15 名, 2 番目 <co-first authors>) Comprehensive phenotypic analysis of knockout mice deficient in cyclin G1 and cyclin G2. Sci Rep, 2016;6:39091. 査読有

doi: 10.1038/srep39091.

(15)田原紳一郎, 池田純一郎 (他 6 名, 7 番目) S100A4 accelerates the proliferation and invasion of endometrioid carcinoma and is associated with the 'MELF' pattern. Cancer Sci, 2016;109:1345-1352. 査読有

doi: 10.1111/cas.12999.

(16)池田純一郎 (他 6 名, 1 番目) ID1 upregulation and FoxO3a downregulation by Epstein-Barr virus-encoded LMP1 in Hodgkin lymphoma. Mol Clin Oncol, 2016;5:562-566. 査読有

[学会発表] (計 53 件)

(1)池田純一郎 (他 3 名, 1 番目) Therapeutic strategy using non-thermal plasma for cancers targeting cancer-initiating cells ISPlasma2019 / IC-PLANTS2019 2019 年

(2)池田純一郎 (他 8 名, 1 番目) 子宮頸内臓癌におけるがん幹細胞の可塑性に関する検討 第 107 回日本病理学会総会 2018 年 ロイトン札幌, 札幌文芸館

(3)田原紳一郎, 池田純一郎 (他 6 名, 7 番目) SDPR は子宮体部類内臓癌の幹細胞性に関わり、上皮間葉転換を促進する 第 107 回日本病理学会総会 2018 年 ロイトン札幌, 札幌文芸館

(4)倉重真沙子, 池田純一郎 (他 8 名, 7 番目) immunoFISH で探索した異性間骨髄移植後のヒトの二次性腫瘍における癌線維芽細胞とマクロファージの起源 第 107 回日本病理学会総会 2018 年 ロイトン札幌, 札幌文芸館

(5)本山雄一, 池田純一郎 (他 3 名, 2 番目) 心移植後にみられた舌平滑筋腫瘍の一例 第 107 回日本病理学会総会 2018 年 ロイトン札幌, 札幌文芸館

(6)田原紳一郎, 池田純一郎 (他 6 名, 7 番目) SDPR は ILK を介して子宮体部類内臓癌の上皮間葉転換を促進する 第 15 回日本病理学会カンファレンス 2018 年 名鉄犬山ホテル (愛知)

(7)大島健司, 池田純一郎 (他 7 名, 8 番目) D-セリン合成酵素 Serine racemase は大腸癌細胞の増殖を促進する 第 15 回日本病理学会カンファレンス 2018 年 名鉄犬山ホテル (愛知)

(8)和田直樹, 池田純一郎 (他 8 名, 9 番目) リンパ形質細胞性リンパ腫の分化に対してグルタミンが及ぼす効果について 第 15 回日本病理学会カンファレンス 2018 年 名鉄犬山ホテル (愛知)

(9)大島健司, 池田純一郎 (他 1 名, 2 番目) セリンラセマーゼは大腸癌の新たな治療標的となり得る 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 大阪国際会議場, リーガロイヤルホテル大阪

(10)前野悦子, 池田純一郎 (他 5 名, 2 番目) ホジキンリンパ腫におけるプラズマ活性溶液による抗腫瘍効果の検討 第 59 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 2018 年 ロイトン札幌, さっぽろ文芸館

(11)長友忠相, 池田純一郎 (他 8 名, 9 番目) 当院の呼吸器 EBUS-TBNA 穿刺材料における細胞診検査の現状について 第 59 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 2018 年 ロイトン札幌, さっぽろ文芸館

(12)藤埜友稀奈, 池田純一郎 (他 7 名, 8 番目) 神経内分泌への分化を示す乳癌の細胞像について 第 43 回臨床細胞学会大阪府支部学術集会 2018 年 大阪大学 銀杏会館

(13)和田直樹, 池田純一郎 (他 7 名, 8 番目) プラズマ照射培養液のリンパ形質細胞性リンパ腫への効果 第 106 回日本病理学会総会 2017 年 京王プラザホテル

(14)池田純一郎 (他 1 名, 1 番目) プラズマ活性溶液 (PAM) を用いた腫瘍 (がん) 幹細胞を標的とした抗腫瘍効果の検討 第 106 回日本病理学会総会 2017 年 京王プラザホテル (東京)

- (15)大島健司, 池田純一郎 (他 8 名, 8 番目) アルギニン合成律速酵素 ASS1 による mTOR シグナルを介した腫瘍浸潤制御機構 第 14 回日本病理学会カンファレンス 2017 年 名鉄犬山ホテル (愛知)
- (16)大島健司, 池田純一郎 (他 1 名, 2 番目) ADSL は NK cell receptor 分子である KLRC3 の発現制御を介して子宮内膜癌の増殖 浸潤を促進する 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 パシフィコ横浜
- (17)前野悦子, 池田純一郎 (他 4 名, 5 番目) 唾液腺導管癌の一例 第 58 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 2017 年 大阪国際会議場
- (18)池田純一郎 (他 2 名, 1 番目) 低温大気圧プラズマによる腫瘍 (がん) 幹細胞を標的としたがん制御の検討 第 105 回日本病理学会総会 2016 年 仙台国際センター
- (19)和田直樹, 池田純一郎 (他 1 名, 2 番目) リンパ形質細胞性リンパ腫における CXCL12-CXCR7 シグナル 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 パシフィコ横浜
- (20)田原紳一郎, 池田純一郎 (他 1 名, 2 番目) S100A4 は子宮内膜癌の増殖と浸潤を促進する 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 パシフィコ横浜
- (21)池田純一郎 (他 0 名, 1 番目) Anti-cancer effect of non-thermal plasma on cancer initiating cells: a new medical application for cancer therapy. 第 57 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) /The 19th International Congress of Cytology (ICC 2016) 2016 年 パシフィコ横浜
- (22)池田純一郎 (他 3 名, 1 番目) THERAPEUTIC APPROACH FOR CANCER-INITIATING CELLS WITH NON-THERMAL PLASMA. The 3rd International Workshop on Plasma For Cancer Treatment (IWPCT2016) 2016 年 ワシントン DC
- (23)池田純一郎 (他 0 名, 1 番目) 腫瘍 (がん) 幹細胞を標的とした大気圧プラズマ技術を用いた新たな腫瘍制御法 名古屋大学「プラズマ科学プラットフォーム」開所記念講演会・見学会 2016 年 名古屋大学
- (24)池田純一郎 (他 5 名, 1 番目) Effect of plasma-activated medium (PAM) on cancer-initiating cells for cancer therapy 6th International Conference on Plasma Medicine (ICPM-6), 2016, Bratislava, Slovakia
- (25)池田純一郎 (他 0 名, 1 番目) Therapeutic approach for cancer-initiating cells with non-thermal plasma: for new medical application Workshop for Current concept for LTP at atmospheric pressure in medical practice 2016 年 München, Germany
- (26)池田純一郎 (他 5 名, 1 番目) ANTI-CANCER EFFECT ON CANCER-INITIATING CELLS TREATED WITH PLASMA-ACTIVATED MEDIUM (PAM) IN CANCER CELLS. International Conference on Plasma Medical Science Innovation 2017(ICPMSI2017) 2017 年 名古屋大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。