

令和元年6月17日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11131

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた分化誘導癌幹細胞モデル作成と新たな治療標的の探索

研究課題名(英文) Cervical cancer stem cell model derived from iPS cells to investigate new therapeutic targets

研究代表者

足立 克之 (Adachi, Katsuyuki)

埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・病院 婦人科・副部長

研究者番号：90735200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞から中間中胚葉を経てSCJに存在するリザーブ細胞モデルを作成した。このiPS細胞由来リザーブ細胞は、CK7、AGR2、CD63、MMP7などのSCJ markerを発現した。さらにiPS細胞由来リザーブ細胞を培養条件を変えると一部は扁平上皮に一部は腺上皮に分化した。さらにHPV16、HPV18遺伝子を導入したiPS細胞由来子宮頸癌幹細胞を樹立した。子宮頸癌の組織は初代培養することは困難であり、本研究で得られた知見に立脚し患者本人の子宮頸部細胞由来iPS細胞より子宮頸がんの癌幹細胞モデルを樹立しさらなる個別化医療への応用に繋げることができると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸癌は婦人科悪性腫瘍の中で乳癌について多い疾患である。近年では子宮頸癌検診の推進で早期でみつかる症例も増えているが、一方で再発症例については未だ治療の選択肢が少ない。一般的な化学療法だけではなく今後はより個別化された新規な治療開発が望まれているため、本研究は子宮頸癌の癌幹細胞に着目しその特徴から患者の個別化するための治療標的分子を見つけることに注力した。iPSCより子宮頸癌の癌幹細胞モデル樹立を目指し一部達成した。これは将来的には癌患者個人よりiPSCを樹立し、個別の子宮頸癌癌幹細胞モデルを使用し薬剤感受性テストやその他の治療感受性テストを行うことで個別化医療への応用が可能となると期待する。

研究成果の概要(英文)：We established a reserve cell model that exists in SCJ from human iPS cells via intermediate mesoderm. The iPS cell-derived reserve cells expressed SCJ markers such as CK7, AGR2, CD63 and MMP7. When the culture conditions were changed, iPS cell-derived reserve cells were partially differentiated into squamous epithelium and partly into glandular epithelium. It is important findings that these cells are reserve cells. Then, cervical cancer stem cells into which HPV16 and HPV18 genes introduced were established. Based on the findings obtained in this study, establishing a cancer stem cell model for cervical cancer from the patient's own cell-derived iPS cells will lead to further personalized medicine.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：子宮頸癌 iPSC 組織幹細胞 リザーブ細胞 個別化医療

## 1. 研究開始当初の背景

### ・子宮頸癌治療の現状

子宮頸癌はヒトパピローマウイルス (HPV) 感染により引き起こされる癌である。最近では HPV ワクチンが開発されたが、日本ではまだ多くの子宮頸がん患者が存在する。検診の発達により上皮内癌など前がん状態でみつかるとともに、発見時にはすでに進行している症例も多い。また再発症例については治療を目指すことは難しく化学療法などの治療の選択肢が少ない現状がある。免疫療法など新規治療も散見されているが、今後はより個別的な新規治療薬開発が望まれている。

本研究では Precision medicine をキーワードに子宮頸がんの癌幹細胞に着目した。癌幹細胞の特徴は自己複製能、多分化能があることである。一般の腫瘍組織では癌化した癌幹細胞 (Cancer stem cell, CSC) が増殖する中で、自己複製能を喪失しながら分化傾向を有する細胞 (娘細胞) の集団へと移り変わっていくが、癌幹細胞から種々の細胞に分化していきモノクローナルな細胞集団ではなく多様性のある細胞集団となっていくことを腫瘍内不均一性 (Heterogeneity) と呼ぶ。この腫瘍内不均一性が治療抵抗性を示すうえでとても大事な特徴となる。その特徴から患者の個別化を行い、さらに治療への感受性から通常の癌細胞とはことなる治療標的分子を見つけることに注力した。また最終的には iPSC より子宮頸癌の癌幹細胞モデル樹立を目指した。

## 2. 研究の目的

ヒト iPSC 細胞から子宮頸がん癌幹細胞の樹立することと、さらに患者由来細胞より子宮頸がん癌幹細胞を樹立し、それを利用することで治療標的の個別化とそれに対応した個別化医療を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### ・ヒト iPSC 由来誘導子宮頸がん幹細胞モデルの樹立

癌幹細胞の単離方法として、腫瘍表面抗原を使用する方法がある。一方で組織の中から癌細胞モデルを樹立するには、1) 患者子宮頸癌細胞を初代培養する方法、2) 患者子宮頸癌組織より PDX (Patient-derived Xenograft) を作成する方法、3) 患者組織より iPSC を作成、さらに分化誘導により子宮頸がん幹細胞モデルの樹立する方法などが考えうる。本研究では iPSC 細胞からリザーブ細胞へ分化誘導させ、さらに HPV がん遺伝子を導入することで子宮頸癌幹細胞モデルの作成を試みた。

HPV は子宮頸部、腔部に感染がおこるが、子宮頸癌の発生母地は S-C junction と考えられている。そこに存在するリザーブ細胞が子宮頸癌の母地となる組織幹細胞であると仮説を立てた。まず iPSC に対して CHIR99021 および TTNPB を添加して中間中胚葉へ分化誘導を行った。OSR1 などの中間中胚葉マーカーの上昇の有無などを確認し、中間中胚葉に分化していることを確認した。さらに基質をコラーゲン IV へ変更し、培養液をケラチノサイト SFM へ変更し中間中胚葉からリザーブ細胞への分化誘導を試みた。誘導後にリザーブ細胞のマーカーである p63, CK17, CK8, CK5 や S-C junction のマーカーである CK7 AGR2 CD63 MMP7 GDA や Müller 管由来である ER ER CA125 などの発現も確認した。さらに誘導した細胞が子宮頸部の組織幹細胞・リザーブ細胞であることを確認するためにマトリゲル中での 3 次元培養や air-liquid interface culture を行うことで分化の方向性を示し腺上皮や扁平上皮に分化することを確認した。

## 4. 研究成果

ヒト iPSC 細胞から中間中胚葉を経て SCJ に存在するリザーブ細胞モデルを樹立した。この iPSC 細胞由来リザーブ細胞は、SCJ marker である CK7, AGR2, CD63, MMP7 などを発現した。さらに iPSC 細胞由来リザーブ細胞に HPV16, HPV18 遺伝子を導入した iPSC 細胞由来子宮頸癌幹細胞を樹立した。今後はこれらを用い患者由来の細胞より子宮頸がん癌幹細胞を誘導し、薬剤感受性や治療感受性をみることでさらなる個別化医療への応用へ繋げることが出来ると考えている。

<引用文献>

1. Alison MR et al. Finding cancer stem cells: are aldehyde dehydrogenases fit for purpose? J Pathol. 2010 ;222(4):335-44.
2. Shu-Yan Liu et al, High aldehyde dehydrogenase activity identifies cancer stem cells in human cervical cancer. Oncotarget. 2013 4(12): 2462–2475.
3. Martens JE et al. Distribution pattern and marker profile show two subpopulations of reserve cells in the endocervical canal. Int J Gynecol Pathol. 2009 ;28(4):381-8. PMID: 19483623
4. Martens JE, et al. Reserve cells in human uterine cervical epithelium are derived from müllerian epithelium at midgestational age. Int J Gynecol Pathol. 2007 Oct;26(4):463-8. PMID: 17885499
5. Morbini P et al, Markers of squamocolumnar junction cells in normal tonsils and oropharyngeal cancer with and without HPV infection. Histol Histopathol. 2015 ;30(7):833-9.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Sato M, Adachi K, Kawana K, et al. (2017) Regeneration of cervical reserve cell-like cells from human induced pluripotent stem cells (iPSCs): A new approach to finding targets for cervical cancer stem cell treatment. Oncotarget. PMID: 28402962
2. Sato M, Adachi K, Kawana K, et al. (2016) Spheroid cancer stem cells display reprogrammed metabolism and obtain energy by actively running the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Oncotarget. PMID: 27120812
3. Sato M, Adachi K, Kawana K, et al. (2016) Decreased expression of the plasminogen activator inhibitor type 1 is involved in degradation of extracellular matrix surrounding cervical cancer stem cells. Int J Oncol. PMID: 26676222
4. Sato M, Adachi K, Kawana K, et al. (2016) Clinical significance of Gremlin 1 in cervical cancer and its effects on cancer stem cell maintenance. Oncol Rep. PMID: 26530461

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 第 70 回 日本産科婦人科学会学術集会  
シンポジウム 1 (腫瘍) (2018 年)  
癌幹細胞の個別化とそれに対応した個別化医療の開発～子宮頸癌を中心に

〔図書〕(計 1 件)

1. 医学のあゆみ  
258 巻 2 号 (2016 年) パピローマウイルス最前線  
・ HPV 感染細胞を標的とした免疫療法の開発

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究協力者

研究協力者氏名： 川名敬、佐藤 雅和

ローマ字氏名： Kei Kawana, Masakazu Sato

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。