

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16786

研究課題名（和文）3次元がん幹細胞培養系を用いた、卵巣がん腹膜播種促進メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the promotion mechanism of ovarian cancer peritoneal dissemination using a three-dimensional cancer stem cell culture system

研究代表者

山脇 芳（Yamawaki, Kaoru）

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：90650622

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：がん幹細胞性能をもつ腹水由来の卵巣がんスフェロイド細胞を新規樹立し、スフェロイド細胞パネルを作成することに成功した。次に、卵巣がんスフェロイド細胞を用いた解析により、卵巣がん幹細胞のプラチナ製剤に対する治療抵抗性獲得と腹膜播種能に寄与する分子として、ペントースリン酸経路に関連する酵素であるG6PDを同定する事に成功した。マウス腹膜播種モデルにおいて、G6PD阻害剤をシスプラチンと併用して投与することにより、プラチナ抵抗性卵巣がんスフェロイドのマウス腹膜播種を抑制することが明らかとなった。本研究の結果から、G6PDはプラチナ抵抗性と腹膜播種に必須の役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは不均一な組織であり、その中にはがんの持つ再発、転移、治療抵抗性などの難治性の根源であるがん幹細胞が存在すると言われている。がん幹細胞を解析するツールとして、我々は患者由来がん幹細胞（スフェロイド細胞）の3次元培養系を樹立している。今回この培養系を活用した解析により、卵巣がん幹細胞のもつ治療抵抗性や腹膜転移能は解糖系の側副路であるペントースリン酸経路を活性化することにより獲得されていることが示された。患者由来がん幹細胞培養系を用いて卵巣がん幹細胞の治療抵抗性、腹膜転移能とペントースリン酸経路の活性化との直接的な関連性を示した報告は未だないため、本研究成果は学術的意義があると言える。

研究成果の概要（英文）：We newly established ovarian cancer spheroid cells derived from ascites, which have cancer stem cell potential, and created a spheroid cell panel. Next, by using the ovarian cancer spheroid cells, we identified G6PD, an enzyme related to the pentose phosphate pathway, as a molecule that contributes to the acquisition of platinum resistance and peritoneal seeding ability of ovarian cancer stem cells. In a mouse model of peritoneal dissemination, administration of a G6PD inhibitor in combination with cisplatin suppressed peritoneal dissemination of platinum-resistant ovarian cancer spheroids in mice. The results of this study suggest that G6PD plays an essential role in platinum resistance and peritoneal dissemination.

研究分野：産婦人科学

キーワード：卵巣がん がん幹細胞 腹膜播種 治療抵抗性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、卵巣がんを含む多くのがん種において、幹細胞性質を有したがん幹細胞が存在し、がんの持つ再発、転移、治療抵抗性などの難治性の根源であることが示されており、がん幹細胞を標的とする治療が注目されている。なかでも、寛解ののちに再発を高頻度できた卵巣がんの臨床的なふるまいは、卵巣がん幹細胞の存在を示唆していると言える。申請者らは、患者由来3次元培養法であるスフェロイド細胞培養系を新規に確立しており、スフェロイド細胞はがん幹細胞能を有し、かつ臨床がんの特性を保持している細胞集団であると考えられる。卵巣がん患者由来のスフェロイド細胞を解析することにより、再現性が高く、臨床応用可能な研究成果が得られることが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究はこれまでの成果をもとに、卵巣がん幹細胞培養系を利活用することで、卵巣がん幹細胞のもつ治療抵抗性因子や腹膜播種促進因子を同定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 卵巣がんスフェロイド細胞の新規樹立とスフェロイド細胞パネルの作成

卵巣がん患者腹水中のがん細胞より、安定的に3次元培養可能な卵巣がん幹細胞(スフェロイド細胞)の新規樹立を目指した。上皮性卵巣がんには代表的な4つの組織型(漿液性、粘液性、類内膜、明細胞)があり、治療成績や臨床予後もそれぞれ異なっているため、4つの組織型を含むスフェロイド細胞パネルの作成を行った。

#### (2) 卵巣がんスフェロイド細胞の腹膜播種能の確認とルシフェラーゼ発現細胞の作成

すでに樹立済みで、安定培養可能な卵巣がんスフェロイド細胞をマウス腹腔内に投与を行い、腹膜播種能の有無を確認した。また、*in vivo*イメージングシステムを用いた発光強度評価を行うため、腹膜播種能をもつスフェロイド細胞に対し、レンチウイルスベクターシステムを用いてルシフェラーゼ発現スフェロイド細胞を作成した。

#### (3) 卵巣がんスフェロイド細胞を用いた治療抵抗性因子、腹膜播種能獲得因子の同定

卵巣がん治療のキードラッグであるプラチナ製剤の漸増投与を続け、継代培養を長期間繰り返すことで、新規にプラチナ治療抵抗性スフェロイド細胞の樹立を行った。親細胞と抵抗性細胞の網羅的遺伝子発現解析(RNAシーケンス)を行うことで抵抗性細胞で高発現している遺伝子群を抽出した。

#### (4) 卵巣がんスフェロイド細胞のマウス腹膜播種モデルを用いた検証

(3)の結果より、抵抗性細胞でペントースリン酸経路関連遺伝子群が発現上昇しており、ペントースリン酸経路の律速酵素であるG6PDの発現増加が認められたが、G6PDの薬剤による阻害によりプラチナ製剤への抵抗性が解除されることをルシフェラーゼ発現スフェロイド細胞を用いたマウス腹膜播種モデルを用いた解析で証明した。

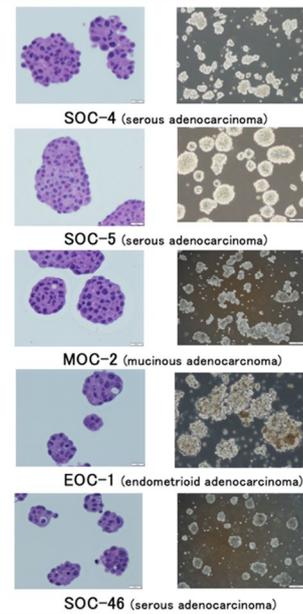
### 4. 研究成果

(1) 卵巣がんを代表とする4つの組織型を由来とする、20細胞からなる卵巣がんスフェロイド細胞パネルの作成に成功した。(図1)

図1

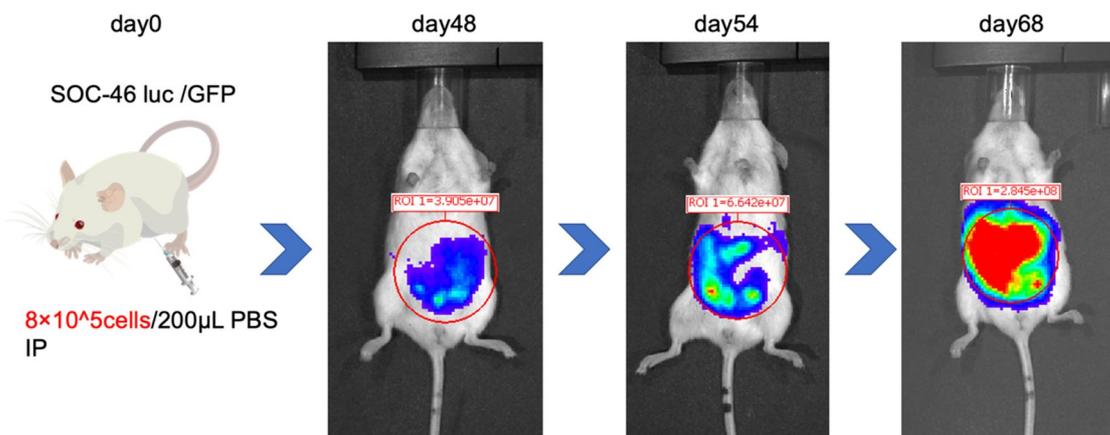
卵巣がんスフェロイドパネル

#	ID	Pathology	material	FIGO stage
1	COC-1	Clear	ascites	IIIc
2	COC-2	Clear	ascites	IIIc
3	COC-3	Clear	ascites	IC3
4	COC-4	Clear	ascites	IIIc
5	EOC-1	endometrioid	ascites	IIIc
6	MOC-1	Mucinous	ascites	IIIc
7	MOC-2	Mucinous	tumor	IIIc
8	SOC-20	High grade serous	ascites	IIIc
9	SOC-4	High grade serous	ascites	IIIc
10	SOC-44	High grade serous	ascites	I C3
11	SOC-45	High grade serous	ascites	IIIc
12	SOC-46	High grade serous	ascites	IIIc
13	SOC-47	High grade serous	ascites	IIIc
14	SOC-48	High grade serous	ascites	IVb
15	SOC-49	High grade serous	tumor	IIc
16	SOC-5	High grade serous	ascites	IIIc
17	SOC-50	High grade serous	ascites(CART)	unknown
18	SOC-51	Low grade serous	ascites	IIIc
19	SOC-52	High grade serous	ascites	IVA
20	SOC-53	High grade serous	ascites	IVB



(2) 樹立済みで、安定培養可能な卵巣がんスフェロイド細胞をマウス腹腔内に投与を行い、腹膜播種能の有無を確認したところ、複数の細胞で腹膜播種能を有することが確認された。腹膜播種能をもつ細胞にルシフェラーゼを安定発現させ、ルシフェリン投与後に in vivo イメージングシステムで発光強度を評価することにより腹腔内での腫瘍増殖を評価することが可能となった。(図2)

図2



(3) プラチナ製剤の漸増投与を続け、継代培養を長期間繰り返すことで、新規にプラチナ抵抗性スフェロイド細胞を樹立することに成功した(図3)。親細胞と抵抗性細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、Gene Set Enrichment Analyses (GSEA) および Gene Ontology (GO) 解析の結果、抵抗性細胞でペントースリン酸経路関連遺伝子群が発現上昇しており、特にペントースリン酸経路の律速酵素である glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) の発現増加が認められることを見出した。(図4)

図3

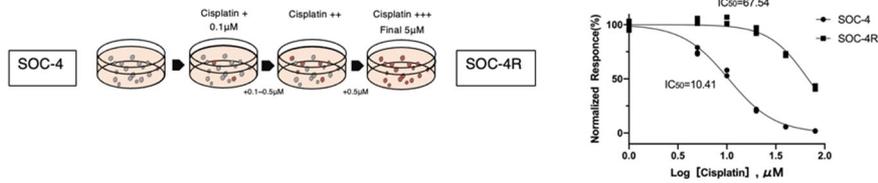
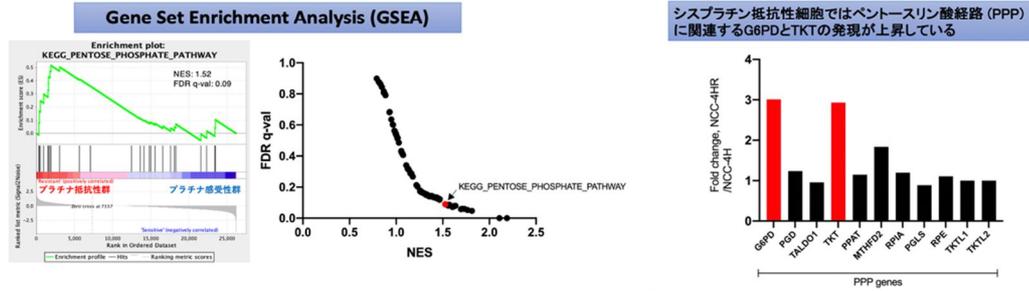


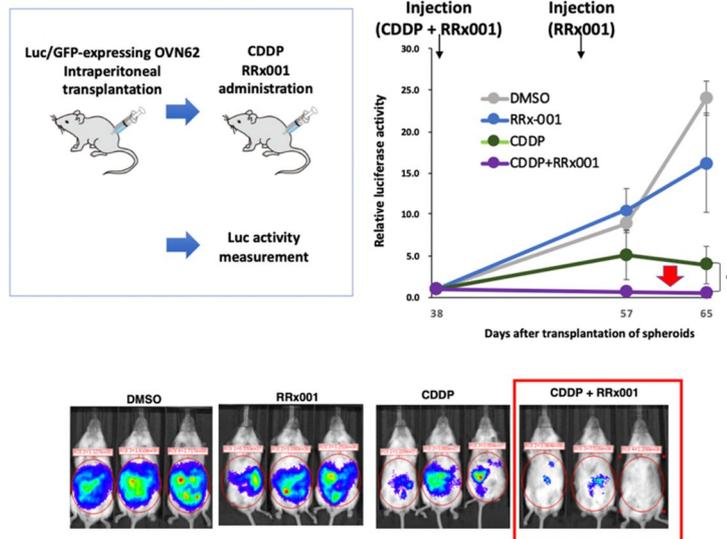
図4



(4) マウス腹腔内にルシフェラーゼ発現プラチナ抵抗性細胞を注入し、in vivo イメージングシステムを用いた発光強度評価で腹腔内で増殖することを確認し、その後の解剖で腹膜播種をきたしうること確認した。同細胞を用いた実験で、G6PD 阻害薬(RRx-001)とシスプラチンのマウス腹腔内投与による治療を行うと、スフェロイド細胞のシスプラチン抵抗性は抑制され、両者の協調的な阻害効果が認められた。(図5)

図5

G6PD阻害剤とシスプラチンの併用により腹膜転移が抑制される (マウス腹膜播種モデルでの検証)



今回、がん幹細胞性能をもつ卵巣がんスフェロイド細胞を用いた解析により、がん幹細胞のプラチナ製剤に対する治療抵抗性獲得と腹膜播種能に寄与する分子として、ペントースリン酸経路に関連する酵素を同定する事に成功した。患者由来がん幹細胞培養系を用いて、卵巣がん幹細胞のプラチナ抵抗性とペントースリン酸経路活性化との直接的な関連性を示した報告は未だないため、今後詳細な解析を行うことで、ペントースリン酸経路を基軸とした治療抵抗性メカニズムの解明を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahiko Murayama, Yasuto Takeuchi, Kaoru Yamawaki, Noriko Gotoh et al.	4. 巻 112
2. 論文標題 MCM10 compensates for Myc-induced DNA replication stress in breast cancer stem-like cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer science	6. 最初と最後の頁 1209-1224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14776	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuko Miyagawa, Kazunori Nagasaka, Kaoru Yamawaki, Yutaro Mori, Tatsuya Ishiguro, Kei Hashimoto, Ryoko Koike, Siho Fukui, Takeru Sugihara, Takayuki Ichinose, Haruko Hiraike, Koichiro Kido, Koji Okamoto, Takayuki Enomoto, Takuya Ayabe	4. 巻 166
2. 論文標題 Evaluating the Angiogenic Properties of Ovarian Cancer Stem-like Cells using the Three-dimensional Co-culture System, NICO-1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of visualized experiments : JoVE	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/61751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Haruka Ueda, Yutaro Mori, Kaoru Yamawaki, Tatsuya Ishiguro, Hirokazu Ohata, Ai Sato, Kentaro Sugino, Nozomi Yachida, Manako Yamaguchi, Kazuaki Suda, Ryo Tamura, Kosuke Yoshihara, Koji Okamoto, Takayuki Enomoto	4. 巻 2
2. 論文標題 Establishment of in vitro 3D spheroid cell cultivation from human gynecologic cancer tissues.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR protocols	6. 最初と最後の頁 100354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2021.10035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山脇 芳、森 裕太郎、石黒 竜也、大畑 広和、榎本 隆之、岡本 康司
2. 発表標題 卵巣がんはグルコース-6-リン酸脱水素酵素の誘導によりシスプラチン抵抗性を獲得する。
3. 学会等名 第7回 がん代謝研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山脇芳、大畑広和、岡本康司	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 294
3. 書名 患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------