

令和 6 年 5 月 19 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09834

研究課題名(和文) 単一細胞解析による婦人科がん幹細胞ニッチの解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy targeting cancer stem cell niches

研究代表者

長阪 一憲 (Nagasaka, Kazunori)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：30624233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：微小環境ニッチにおける癌幹細胞(CSCs)は、腫瘍形成と転移に寄与する。NICO-1モデルを用いて卵巣癌幹細胞(OCSCs)とその内皮細胞との相互作用を調べる方法を開発し、血管新生と転移に関する知見を得た。卵巣癌の患者由来スフェロイドを樹立し、プラチナ系化合物に対する感受性が多様であることを明らかにした。G6PDの発現は予後不良と関連しており、耐性におけるG6PD駆動型の酸化還元代謝の役割が強調された。電気活性マイクロウェルアレイ(EMA)マイクロ流体デバイスを用いて、p16/Ki-67二重染色を行う自動オンチップ免疫染色法を開発した。CSCに対する並行したシングルセル解析を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療における薬剤耐性を克服する標的療法を開発するための基盤となる。卵巣癌幹細胞の腫瘍形成能と内皮細胞との相互作用を調べることで、微小環境の役割に関する重要な知見が得られる。癌幹細胞のニッチを標的とした新たな治療アプローチが可能となり、転移や再発を予防できる可能性がある。またマイクロ流体デバイスを用いた自動オンチップ免疫染色法の開発により、正確でハイスループットな単一細胞解析が可能になった。研究成果は、がん生物学の理解を進め、革新的な診断・治療手段を提供することで、重要な科学的価値を有している。社会的には、患者ケアの改善、医療費の削減、公衆衛生教育の強化につながる。

研究成果の概要(英文)：Patient-derived cells and xenografts retain the biological characteristics of clinical cancers, aiding in understanding chemoresistance. We established patient-derived spheroids from ovarian cancer, revealing varied sensitivity to platinum-based compounds. Cancer stem cells (CSCs) in a supportive niche contribute to tumorigenesis and metastasis. We developed a methodology to investigate ovarian cancer stem cells (OCSCs) and their interaction with endothelial cells using the NICO-1 model, providing insights into angiogenesis and metastasis. We developed an automated on-chip immunostaining method using an electroactive microwell array (EMA) microfluidic device for p16/Ki-67 dual staining, enabling parallel single-cell analysis.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：癌幹細胞 微小環境 マイクロ流体デバイス 単一細胞解析 卵巣癌 子宮頸癌

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

婦人科では良・悪性診断、病期診断目的で細胞診が多く用いられるが、得られる情報は診断医が鏡検下で観察した上皮細胞の形態変化が主であり、病態を数値化することは難しい。そこで本研究では、精度の高い一細胞解析技術を開発し、子宮頸癌組織中、および卵巣癌の腹水中の細胞集団の中で、少数しか存在しない癌幹細胞や、幹細胞の維持や分化の調整を行うとされる血管内皮細胞といった不均一な細胞集団で構成される微小環境（幹細胞ニッチ）の制御機構の解明を「一細胞の解像度で情報を収集する」ことを目指す。抗癌剤や放射線に対する強い抵抗性や、癌の転移に対しても重要な役割を果たしていると考えられる幹細胞ニッチを同時に一細胞解析で解明することで、新規治療法の開発への応用ができる。さらには抗がん剤の治療効果を評価できる新規バイオマーカーの創出に向けた基盤となる研究を計画することとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず子宮頸癌組織、および卵巣癌の腹水細胞診の *in vitro*、*ex vivo* モデルを作成し、次に実際の臨床検体を用いた、不均一な細胞集団、特に幹細胞ニッチ、微小環境を構成する細胞に対する精度の高い一細胞解析を実現することを目的とする。子宮頸癌はヒトパピローマウイルス（以下、HPV）の感染が子宮頸癌の発癌過程に関与することが明らかとなっているが、申請者は、ハイリスク型 HPV である HPV16 型陽性で CIN1 由来の W12 細胞、および HPV16 型陽性の子宮頸癌細胞株 SiHa、CaSki 細胞、子宮頸部上皮異形成、子宮頸癌などの臨床検体の RNA を抽出し、それぞれの細胞に対して次世代シーケンサーを用いた CAGE 法で網羅的転写産物解析を行ったところ、各発癌過程の細胞集団で全く異なった転写産物の発現の動態を詳細に観察し、新規転写産物の同定をした (Taguchi A, Nagasaka K et al., 2015)。さらに、未発表であるが、ng レベルの RNA 量で HPV 由来の転写産物解析を行い、一細胞の解像度で発現を観察が可能となっている。そのため、精度の高い一細胞解析が開発できれば、一細胞の転写物解析ができる可能性がある。一方で、進行卵巣癌の進展様式は、周囲の組織への浸潤、播種、そして遠隔部位への転移であり、癌細胞の上皮間葉転換と呼ばれるメカニズムが重要な役割を示すという仮説が示されている。上皮間葉転換メカニズムの本質とは、Par3 などの細胞極性因子の異常発現 (Nakamura H, Nagasaka K et al., 2016)、上皮系マーカーの発現消失と間葉系マーカーの発現上昇、細胞骨格の再構築であり、分子細胞学的な解明が進んでいる。進行卵巣癌に伴う腹水中で構成される細胞には、上記の間質細胞や腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL) のような活性化された免疫細胞が存在する (Kojima S, Nagasaka K et al., 2013) が、これらの腫瘍細胞を取り巻く微小環境ニッチの機構については不明な点が多い。また、癌組織には少数の癌幹細胞 (Cancer stem cell: CSC) が存在していることが示されている (Sato M, Nagasaka K et al., 2016)。また CSC が周囲の癌細胞よりも抗癌剤や放射線に対する強い抵抗性を持つことが報告されており、既存の抗癌剤や放射線療法によって癌が退縮したにも関わらず、難治性の再発腫瘍が発生する原因とされている。また、申請者は 1996 年から 2012 年にかけて Interval debulking surgery (IDS) を施行した T3 期進行卵巣癌症例に対して後方視的解析したところ、IDS における腹腔内細胞診陽性が有意な予後因子であることが明らかにした (Nagasaka K et al., 2015)。この臨床からのデータを元に、さらに進行卵巣癌における腹水中の CSC、および TEC を中心とした幹細胞ニッチ、腫瘍周囲微小環境に対する詳細な機能解析を行うことで、既存の腹水細胞診より精度が高く、治療評価や予後予測が可能となる新規バイオマーカーを開発できる可能性がある。

## 3. 研究の方法

### 子宮頸癌、卵巣癌の *in vitro*、*ex vivo* 幹細胞ニッチモデルの作成

子宮頸癌、および卵巣癌の臨床検体（原発巣、転移巣、卵巣癌の場合は腹水中浮遊細胞）および申請者が所持している、CaSki, SiHa, HeLa, C33A（子宮頸癌細胞株）、HEC, Ishikawa（子宮体癌細胞株）、SKOV3, JHOS2, OVS4HO（漿液性腺癌細胞株）、JHOC5, JHOC8（明細胞腺癌細胞株）、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞（HUVEC）を用いて、以下の方法で細胞集団からの CSC 様細胞、TEC の分離を試み、幹細胞ニッチの *in vitro*、*ex vivo* モデルを作成する。

- 1) Spheroid 形成による分離法：各種細胞株を無血清、浮遊培養させ Spheroid 形成を誘導する。その中より CSC 様の細胞を濃縮、分離する。

- 2) 表面マーカーによる分離法： CD133 や ALDH など癌幹細胞表面に特異的に発現していると報告されている因子に対して、発現細胞のみを分離する。
- 3) NOD/SCID/gamma<sup>c</sup> mouse マウスに臨床検体組織を移植し、マウス皮下で継代をして CSC 様細胞を濃縮、分離、抽出をする。その後、血清を含まない幹細胞培地を用いた付着培養を継代して CSC 様細胞の単離を行う。

上記の手法で単離された CSC 様細胞と、腫瘍組織からコラゲナーゼ溶液などで分離した TEC、および培養細胞の HUVEC 細胞を共培養し、CSC の表面マーカーなどのプロファイリングの変化を検証する。また、それぞれの細胞培養上清を採取、あるいは TEC で馴化された培地で CSC を増殖させ、CSC 血管ニッチモデルの作成を試みる。また、CSC の網羅的解析からの細胞プロファイリングから、自己複製能、未分化性の維持にどのような影響が出るか検討を行う。

### 子宮頸癌細胞診、卵巣癌の腹水細胞診中の CSC、TEC、および微小環境の存在の検討、および EMA による最適化された細胞区画化の検討

上記の検討で同定した細胞プロファイリングに基づき、子宮頸癌の細胞診検体、卵巣癌の腹水中に浮遊する細胞から、CSC、TEC、また腫瘍内微小環境の中心的構成細胞である癌間質線維芽細胞 (CAF) をフローサイトメトリー、癌性腹水中のマクロファージ (TAM) は CD14MACS ビーズでそれぞれ単離分離し、それぞれの細胞集団に対する一細胞解析を行う。CSC の存在については、初回治療において切除された腫瘍組織から免疫組織染色法を行うことでも検討をする。EMA デバイスの各ウェルを改良し、腫瘍内微小環境の構成細胞を並列でトラップできるデバイスを作成し、一細胞解析で汎用される C1 システム、およびその他のシステムとのトラップ効率の比較検討を行う。改良された EMA デバイスを用いたこれまでの検討では、一細胞レベルでの 98% のトラップ効率、92% のホールド効率を得ているが (図 2) 不均一な細胞集団では、異なった形状の細胞を同時にトラップ、ホールドをするという技術開発が必要であるため、本年度のエフォートは子宮頸癌の細胞診検体、卵巣癌の腹水中に浮遊する細胞を精度高く解析できる EMA デバイスの開発を行うことに費やす。

### 一細胞解析を用いた幹細胞ニッチ、腫瘍内微小環境の機能解析

EMA を用いた一細胞解析にて、子宮頸癌細胞診検体、および卵巣癌の腹水細胞診検体を用いて、CSC と TEC のシグナル伝達経路を探索し、活性化された因子を同定する。また、摘出組織の免疫組織染色などの検討も行い、シグナル刺激下の時間、濃度依存的変化についても検討を行う。次に、DNA マイクロアレイ法にて、それぞれの細胞内遺伝子発現量を測定し、刺激に伴う変化について比較検討を行う。さらに、一細胞中の全エキソームシーケンシング、トランスクリプトーム解析を RNA-seq 法、CAGE 法といった解析が可能かどうか、基礎的な検証を行う。CAGE 法により、網羅的にノンコーディング RNA を含めたトランスクリプトームの発現量、転写開始点、プロモーター活性について調べることが可能である。もし、計画通りに進まない場合は、上記の方法で分離された CSC 様の細胞集団、および腫瘍組織から分離された血管内皮細胞そのものを一細胞解析し、集団中の細胞の均一性について、検討を行う。

## 4. 研究成果

患者由来の細胞や異種移植片は、臨床癌の生物学的特徴を保持しており、化学療法抵抗性の理解に役立つ。われわれは卵巣癌の患者由来スフェロイドを樹立し、プラチナ系化合物に対する感受性が様々であることを明らかにした。統合的解析により、シスプラチン耐性はグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) およびグルタチオン産生酸化還元酵素のレベル上昇と相関することが示された。G6PD 阻害剤とシスプラチンの投与は、マウスモデルにおいてスフェロイドの増殖を抑制し、転移を減少させた。G6PD の発現は予後不良と関連しており、耐性における G6PD 駆動型の酸化還元代謝の役割が強調された。腫瘍細胞微小環境ニッチにおける癌幹細胞 (CSCs) は、腫瘍形成と転移に寄与する。われわれは、NIC1-1 モデルを用いて卵巣癌幹細胞 (OCSCs) とその内皮細胞との相互作用を調べる方法を開発し、血管新生と転移に関する知見を得た。子宮頸がんについては、HPV ワクチンの普及に伴い、高度なスクリーニングシステムが必要とされている。我々は、電気活性マイクロウェルアレイ (EMA) マイクロ流体デバイスを用いて、p16/Ki-67 二重染色を行う自動化オンチップ免疫染色法を開発し、並行したシングルセル解析を可能にした。

1. Hashimoto K, Kumagai T, Nomura K, Miyagawa Y, Tago S, Takasaki K, Takahashi Y, Nishida H, Ichinose T, Hirano M, Hiraike H, Wada-Hiraike O, Sasajima Y, Kim SH, Nagasaka K. Kim SH, Nagasaka K. Validation of an on-chip p16ink4a/Ki-67 dual immunostaining cervical cytology system using microfluidic device technology. **Sci Rep.** 2023 Oct 10;13(1):17052.
2. Hashimoto K, Miyagawa Y, Watanabe S, Takasaki K, Nishizawa M, Yatsuki K, Takahashi Y, Kamata H, Kihira C, Hiraike H, Sasamori Y, Kido K, Ryo E, Nagasaka K. The TGF- $\beta$ /UCHL5/Smad2 Axis Contributes to the Pathogenesis of Placenta Accreta. **Int J Mol Sci.** 2023 Sep 5;24(18):13706.
3. Takahashi Y, Kikuchi Y, Mukaiyama J, Watabe S, Haga T, Miyagawa Y, Yamamoto A, Yamauchi Y, Hiraike H, Sone K, Sasajima Y, Yoshida A, Nagasaka K. High- High- grade endometrial stromal sarcoma with YWHAE-NUTM2B fusion gene abnormality identified after 10 years of recurrent pulmonary metastases: A case report. **Gynecol Oncol Rep.** 2023 Jul 19;48:101248. 4.
4. Takasaki K, Ichinose T, Miyagawa Y, Fukui S, Hashimoto K, Nishida H, Takahashi Y, Hiraike H, Saito K, Sasajima Y, Nagasaka K. Serum vascular endothelial J Ovarian Res. 2023 Jun 14;16(1):112. 5.
5. Takahashi Y, Nishida H, Ichinose T, Miyagawa Y, Kido K, Hiraike H, Ishikawa H, Nagasaka K. Effect of Different Educational Interventions on Knowledge **Int J Environ Res Public Health.** 2022 Apr 25;19(9):5191.
6. Yamawaki K, Mori Y, Sakai H, Kanda Y, Shiokawa D, Ueda H, Ishiguro T, Yoshihara K, Nagasaka K, Onda T, Kato T, Kondo T, Enomoto T, Okamoto K. Integrative Ueda H, Ishiguro T, Yoshihara K, Nagasaka K, Onda T, Kato T, Kondo T, Enomoto T, Okamoto K. Integrative analyses of gene expression and chemosensitivity of patient-derived ovarian cancer spheroids link G6PD-driven redox metabolism to cisplatin **Cancer Lett.** 2021 Aug 19;521:29-38
7. Takahashi Y, Sone K, Noda K, Yoshida K, Toyohara Y, Kato K, Inoue F, Kukita A, Taguchi A, Nishida H, Miyamoto Y, Tanikawa M, Tsuruga T, Iriyama T, Nagasaka K Matsumoto Y, Hirota Y, Hiraike-Wada O, Oda K, Maruyama M, Osuga Y, Fujii T. Automated system for diagnosing endometrial cancer by adopting deep-learning technology in hysteroscopy. **PLoS One.** 2021 Mar 31;16(3):e0248526
8. Taguchi A, Nagasaka K, Plessy C, Nakamura H, Kawata Y, Kato S, Hashimoto K, Nagamatsu T, Oda K, Kukimoto I, Kawana K, Carninci P, Osuga Y, Fujii T. Use of Cap Analysis Gene Expression to detect human papillomavirus promoter activity patterns at different disease stages. **Sci Rep.** 2020 Oct 22;10(1):17991.
9. Fukui S, Nagasaka K, Iimura N, Kanda R, Ichinose T, Sugihara T, Hiraike H, Nakagawa S, Sasajima Y, Ayabe T Detection of a single HPV RNA molecule in stratified mucin-producing intraepithelial lesion (SMILE) with concurrent cervical intraepithelial lesion: A case report **Virol J.** 2019 Jun 3;16(1): 76
10. Takeuchi M, Nagasaka K (Equal contribution first author), Yoshida M, Miyagawa Y, Kawata Y, Hiraike H, Wada-Hiraike O, Oda K, Osuga Y, Fujii T, Kim SH Fujii T On-chip immunofluorescence analysis of single-cervical cells using an electroactive microwell array with barrier for cervical screening **Biomicrofluidics** 2019 Jul 30;13(4):044107.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yamawaki K, Mori Y, Sakai H, Kanda Y, Shiokawa D, Ueda H, Ishiguro T, Yoshihara K, Nagasaka K, Onda T, Kato T, Kondo T, Enomoto T, Okamoto K.	4. 巻 521
2. 論文標題 Integrative analyses of gene expression and chemosensitivity of patient-derived ovarian cancer spheroids link G6PD-driven redox metabolism to cisplatin chemoresistance.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Lett.	6. 最初と最後の頁 29-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2021.08.018.	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 Miyagawa Yuko, Nagasaka Kazunori, Yamawaki Kaoru, Mori Yutaro, Ishiguro Tatsuya, Hashimoto Kei, Koike Ryoko, Fukui Siho, Sugihara Takeru, Ichinose Takayuki, Hiraike Haruko, Kido Koichiro, Okamoto Koji, Enomoto Takayuki, Ayabe Takuya	4. 巻 166
2. 論文標題 Evaluating the Angiogenetic 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	6. 最初と最後の頁 166
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Taguchi Ayumi, Nagasaka Kazunori, Plessy Charles, Nakamura Hiroe, Kawata Yoshiko, Kato Sachi, Hashimoto Kosuke, Nagamatsu Takeshi, Oda Katsutoshi, Kukimoto Iwao, Kawana Kei, Carninci Piero, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Use of Cap Analysis Gene Expression to detect human papillomavirus promoter activity patterns at different disease stages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-75133-2	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 Kawata Yoshiko, Nagasaka Kazunori, Oda Katsutoshi, Makii Chinami, Takeuchi Makoto, Oki Shinya, Honjo Harunori, Kojima Machiko, Miyagawa Yuko, Taguchi Ayumi, Tanikawa Michihiro, Sone Kenbun, Hiraike Haruko, Matsumoto Yoko, Wada Hiraike Osamu, Ayabe Takuya, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 111
2. 論文標題 Effect of murine double minute 2 inhibitors in preclinical models of advanced clear cell carcinomas originating from ovaries and kidneys	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3824 ~ 3834
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14583	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 Takeuchi M, Tanikawa M, Nagasaka K, Oda K, Kawata Y, Oki S, Agapiti C, Sone K, Miyagawa Y, Hiraike H, Wada-Hiraike O, Kuramoto H, Ayabe T, Osuga Y, Fujii T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Anti-Tumor Effect of Inhibition of DNA Damage Response Proteins, ATM and ATR, in Endometrial Cancer Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers (Basel).	6. 最初と最後の頁 1913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11121913.	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 該当する

1. 著者名 Fukui S, Nagasaka K, Miyagawa Y, Kikuchi-Koike R, Kawata Y, Kanda R, Ichinose T, Sugihara T, Hiraike H, Wada-Hiraike O, Sasajima Y, Ayabe T.	4. 巻 10
2. 論文標題 The proteasome deubiquitinase inhibitor bAP15 downregulates TGF- $\beta$ /Smad signaling and induces apoptosis <i>via</i> UCHL5 inhibition in ovarian cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 5932-5948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.27219.	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 該当する

1. 著者名 Fukui S, Nagasaka K, Imura N, Kanda R, Ichinose T, Sugihara T, Hiraike H, Nakagawa S, Sasajima Y, Ayabe T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Detection of HPV RNA molecules in stratified mucin-producing intraepithelial lesion (SMILE) with concurrent cervical intraepithelial lesion: a case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12985-019-1180-2.	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 1件)

1. 発表者名 Kazunori Nagasaka, Yuko Miyagawa, Kaoru Yamawaki, Shiho Fukui, Ryoko Koike, Yoshiko Kawata, Ranka Kanda, Takeru Sugihara, Haruko Hiraike, Koichiro Kido, Takuya Ayabe
2. 発表標題 Comparison of the angiogenic properties of ALDH1-positive and CD44-positive ovarian cancer stem-like cells using the three-dimensional co-culture system.
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担 者	Kim SooHyeon  (Kim SooHyeon)  (80709189)	東京大学・生産技術研究所・講師    (12601)	

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
---------	---------