

機関番号：17102

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390435

研究課題名 (和文) 子宮内膜細胞の老化逸脱へのゲノム多様性の関与と癌幹細胞における不死化能獲得機構

研究課題名 (英文) Genome diversity associated with immortalization and establishment of endometrial cancer stem cell isolation

## 研究代表者

和氣徳夫 (Norio Wake)

九州大学・医学研究院・生殖病態生理学

研究者番号：60091584

## 研究成果の概要 (和文)：

Ras/ ER $\alpha$ / MDM2/ p52/ p21 シグナロソームにはゲノム多様性が存在し対立遺伝子間発現量に差異があることを明らかにした。特にMDM2 p1 プロモータ活性にはAEDが関与し、その機能に影響を与えていることが判明した。子宮体癌幹細胞で発現を更新する遺伝子を同定した。そのうち細胞表面で発現するものを標的に抗体を作成し幹細胞を同定する MACS システムを構築した。

## 研究成果の概要 (英文)：

There is genome diversity in Ras/ ER $\alpha$ / MDM2/p53/ p21 signalosome. Genome diversity in these signalosome influences each gene function due to allelic expression difference. AED of MDM2 p1 promoter activity is defected frequently and influences MDM2 gene function in several genes are upregulated in endometrial cancer stem cells. Among these genes, antibodies are prepared against gene products expressed in all surface, establishing the efficient method to identify the cancer stem cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	24,000,000

研究分野：婦人科腫瘍学、細胞老化

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 産婦人科学

キーワード：SNP、AED、ゲノム多様性、遺伝子発現制御、癌化、子宮体癌、細胞老化シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は細胞老化誘導シグナロソームの機能的破綻にゲノム多様性がいかに関与するを明らかにする。さらに癌幹細胞における不死化能獲得の分子機構を解明し細胞老化の

逸脱という側面から癌化メカニズムを研究する。細胞老化に関与するシグナロソームの破綻には従来明らかとされてきた体細胞変異のみではなく、ゲノム多様性 (DNA 多型) も大きく関与する。最近では各遺伝子プロモ

一タ領域に存在する一塩基多型の独特の組み合わせ、さらには微小欠失により対立遺伝子間での発現量に顕著な相違がもたらされることも判明している。癌細胞で認められる体細胞変異の多くは AED を示す遺伝子群に集中することも示唆されている。これらの結果は正常細胞においてゲノム多様性により AED が導かれ、特定の細胞腫において細胞老化プログラム破綻の原因となることを意味する。細胞老化回避の後、ゲノム多様性に代わる体細胞変異が出現し、老化シグナルの完全な破綻により不死化細胞の選択的増殖を導くと考えられる。一方「癌は組織幹細胞に体細胞変異が集積することにより発生する」ため、元来癌細胞は不死化能を有しているとの考えも発表されている。組織幹細胞ではテロメレース発現が維持され、老化回避機構が作動しているためである。様々な癌腫において癌幹細胞が単離され、通常の組織幹細胞と増殖特性さらには分化能を共有することが判明している。これらのことから癌幹細胞が示す特性は体細胞変異による幹細胞への脱分化あるいは組織幹細胞由来であることに起因すると推測されている。

## 2. 研究の目的

本研究では従来から私たちにより細胞老化との関連が明らかにされてきた、Ras/ ER $\alpha$ /MDM2 関与を明らかにし、ゲノム多様性に基づく AED が癌化に伴い出現する体細胞変異を誘導し、癌細胞における不死化能獲得に至る過程を解明すること、組織及び癌幹細胞の容易な単離システムを開発し癌幹細胞における不死化能獲得に細胞老化関連 3 シグナルがいかに関与するかを明らかにすることを目指す。

## 3. 研究の方法

### 1) MDM2 SNP 309 G/T

末梢血より DNA を抽出し、ER $\alpha$ 、MDM2、p53、p21 など子宮体癌の発生に関与すると考えられる遺伝子について PCR-RFLP 法または Direct sequence 法を用いて遺伝子多型解析を行った。得られたデータについてはロジスティック回帰分析によりオッズ比 95%信頼区間を算出し、遺伝子多型と子宮体癌のリスクとの関連を調べた。

### 2) MDM2 AED

正常子宮内膜、子宮体癌組織からゲノム DNA と RNA を抽出した。抽出した RNA を逆転写により cDNA とした後、ゲノム DNA と cDNA を鋳型として SSCP を行った。SSCP に日本人集団でヘテロ接合が多いと判明している SNP をマ

ーカーとして用いることで対立遺伝子の区別を可能とする。通常の対立遺伝子に由来する RNA 量は 1:1 であるため、対立遺伝子別転写量が大きく偏移するサンプルがあるか否かを調べた。さらにプロモータ領域のシーケンス解析を行い、AED サンプルに特徴的な SNP ハプロタイプの解析を行った。正常子宮内膜 36 例、子宮体癌組織 38 例について解析した。

### 3) 子宮体癌幹細胞の生物学的特性

私たちは既に正常子宮内膜に Hoechst33342 により染色されない SP 細胞分画で大きく発現変化する遺伝子集団が存在することを明らかにしている。これらの遺伝子集団の中から膜型蛋白を発現する遺伝子に着目し、簡易な幹細胞単離システムを開発し、子宮体癌幹細胞における細胞老化逸脱機構の解明を行った。このため正常子宮内膜及び体癌組織を完全に細胞分散した後 Hoechst33342 2.5  $\mu$ g/ml 存在下で 90 分培養し、FACS VantageFluorescence-activated cell sorter で SP 細胞分画を抽出した。SP 細胞分画で大きく発現変化した遺伝子産物に対し作成した抗体を FITC あるいは PE ラベルし magnetic microbeads にコートし magnetic cell sorting 幹細胞単離システムを開発した。SP 細胞分画を用い再度 MCS による細胞抽出を行い SP 分画に集積した細胞数と、MCS により回収された細胞数を比較することにより MCS を用いた幹細胞単離システムの効率を解析した。

## 4. 研究成果

### 1) MDM2 SNP 309 G/T

症例群と対照群の年齢分布、閉経年齢、出産歴、BMI、症例群の進行期と組織型の分布に関しては、統計学的に有意ではないが MDM2 SNP309 G/G の T/T に対する子宮体癌オッズ比の高まりを認めた。P53 codon72, ER $\alpha$  PvuII・XbaI, p21 codon31 の遺伝子多型と子宮体癌との関連は認めなかった。MDM2 SNP309 と p53codon72 の combination 解析では MDM2 SNP309 T/G, G/G と p53 codon72 Arg / Arg の組み合わせで子宮体癌オッズ比の有意な上昇を認め (OR 2.53 95%IC 1.03 - 6.21)、MDM2 SNP309 と p53 codon72 の多型間には統計学的に有意な遺伝子間の相互作用を認めた (interaction p=0.04)。この遺伝子間の相互作用は症例と対照を閉経後 (OR 2.96 95%IC 1.04 - 8.44, interaction p=0.03) または、症例を Type1 に限定した解析でも認められた (OR 2.51 95%IC 0.97 - 6.53, interaction p=0.01)。

### 2) MDM2 AED

マーカーSNPとして Exon 1 上に存在する SNP(rs937283 A/G)を用いた。正常子宮内膜 36 検体及び子宮体癌組織 38 検体を解析した結果 A/A15 検体・A/G18 検体・G/G3 検体であった。A/G18 検体で SSCP を行ったところ、子宮正常内膜 4 検体、子宮体癌 3 検体に 20%以上の AED が認められ、すべて A-allele に比べ G-allele からの転写が弱い結果であった。この発現量相違に関連するプロモーター領域の SNP を確認したところ、18 検体全て -173bp に SNP(rs937282C/G)が存在し、さらに SNP の変化により転写因子の結合配列の変化がもたらされることも判明した (図 2)。また C/C・G/G のレポータープラスミドを作成しルシフェラーゼアッセイを行ったところ、G/G の転写活性が弱いことが判明した。

### 3) 子宮体癌幹細胞の採取と生物学的特性

マイクロアレイ法により同定されたがん幹細胞マーカーに対する抗体を用いて MACS しすてむを開発した。MACS により採取された細胞集団を Hoedut33342 で染色し、FACS を行い SP, non-SP 細胞の出現を解析した結果、両方の細胞集団に MACS 回収細胞は出現し、従来の SP 細胞を採取する方法より感受性の高いものではなかった。

子宮体癌細胞株 (Ishikawa, Hec など) から SP, non-SP を採取しそれぞれ細胞増殖特性及び活腫瘍性の変化を解析した。培養一週間を超えると、SP 細胞は non-SP 細胞に比べ、明らかな細胞増殖能の亢進を示した。ヌートマウス皮下にそれぞれの細胞を移植し造腫瘍性の変化を解析した。Non-SP 細胞は間質成分が腫瘍を明瞭に取り囲む分化型腺癌を形成した。SP 細胞により形成された腫瘍は境界不明瞭で間質への浸潤が顕著な低分化型腺癌を形成した。同時に腫瘍間質組織を Microdissection 法で単離し、K-Ras 遺伝子について塩基配列を決定した。また SP 細胞について種々の EMT 関連マーカーの発現が亢進しており、EM 表現を示していることが示唆された。

## 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 18 件)

Yasunaga M, Ohishi Y, Nishimura I, Tamiya S, Iwasa A, Takagi E, Inoue T, Yahata, H, Kobayashi H, Wake N, Tsuneyoshi M: Ovarian undifferentiated carcinoma resembling giant cell carcinoma of the lung:

Pathology International. 58(4): 244-248, 2008

Tanaka Y, Kato K, Mibu R, Uchida S, Asanoma Ohishi Y, Kaku T, Kobayashi H, Aishima S, Umekita Y, Wake N, Tsuneyoshi M: CD10 immunostaining distinguishes atypical polypoid adenomyofibroma (atypical polypoid adenomyoma) from endometrial carcinoma invading the myometrium: Human Pathology. 39(10): 1446-1453, 2008

Matsushita I, Uchida S, Yamaguchi A, Tanaka Y, Ogawa S, Kato K, Tsukimori K, Wake N: Interstitial pregnancy in a woman with congenital afibrinogenemia. The journal of obstetrics and gynaecology research. 34(59): 442-453, 2008

Yakaguchi S, Asanoma K, Tanaka T, Kato K, Wake N: Homeobox gene HOPX is epigenetically silenced in human uterine endometrial cancer and suppresses estrogen-stimulated proliferation of cancer cells by inhibiting serum response factor: International journal of cancer. 124(11): 2577-2588, 2008

Kurihara S, Oda Y, Ohishi Y, Iwasa A, Takahira T, Kaneki E, Kobayashi H, Wake N, Tsuneyoshi M: Endometrial stromal sarcomas and related high-grade sarcomas: immunohistochemical and molecular genetic study of 31 cases: The American Journal of Surgical Pathology. 32(8): 1228-1238, 2008

Takahashi A, Kato K, Kuboyama A, Inoue T, Tanaka Y, Kuhara A, Kinoshita K, Takeda S, Wake N: Induction of senescence by progesterone receptor-B activation in response to cAMP in ovarian cancer cells: Gynecologic oncology, 2009

Yasunaga M, Ohishi Y, Oda Y, Misumi M, Iwasa A, Kurihara S, Nishimura I, Okuma E, Kobayashi H, Wake N, Tsuneyoshi M: Immunohistochemical characterization of mullerian mucinous borderline tumors: possible histogenetic link with serous borderline tumors and low-grade endometrioid tumors: Human Pathology. 40(7): 965-974, 2009

Yamaguchi S, Asanoma K, Takao T, Kato K, Wake N: Homeobox gene HOPX is epigenetically silenced in human uterine

endometrial cancer cells by inhibiting serum response factor: International Journal of Cancer . 124: 2257-2588, 2009

Sonoda K, Miyamoto S, Kobayashi H, Ogawa S, Okugawa K, Taniguchi S, Wake N: The Level of RCAS1 Expression Is Inversely Correlated With the Number of Vitamin-Positive Stromal Cells in Epithelial Ovarian Cancer: International Journal of Gynecological Cancer. 19(5): 838-843, 2009

Fukushima K, Ogawa S, Tsukimori K, Kobayashi H, Wake N: Can we diagnose invasive cervical cancer during pregnancy as precise as in nonpregnant women?: maternal and perinatal outcome in pregnancies complicated with cervical cancers: Int J Gynecol Cancer. 19(8): 1439-45, 2009

Inoue T, Kato K, Kato H, Asanoma K, Kuboyama A, Ueoka Y, Yamaguchi S, Ohgami T, Wake N: Level of reactive oxygen species induced by p21Waf1/CIP1 is critical for the determination of cell fate: Cancer Science. 100(7): 1275-83, 2009

Ohishi Y, Oda Y, Kurihara S, Kaku T, Yasunaga M, Nishimura I, Okuma E, Kobayashi H, Wake N, Tsuneyoshi M: Hobnail-like cells in serous borderline tumor do not represent concomitant incipient clear cell neoplasms: Hum Pathol. 40(8): 1168-75, 2009

Ogawa S, Kobayashi H, Amada S, Yahata H, Sonoda K, Abe K, Baba S, Sasaki M, Kaku T, Wake N: Sentinel node detection with (99m)Tc phytate alone is satisfactory for cervical cancer patients undergoing radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy: Int J Clin Oncol. 15(1): 52-8, 2010

Kukita Y, Yahara K, Tahira T, Higasa K, Sonoda M, Yamamoto K, Kato K, Wake N, Hayashi K: A Definitive Haplotype Map as Determined by Genotyping Duplicated Haploid Genomes Finds a Predominant Haplotype Preference at Copy-Number Variation Events The American journal of human genetics . 86: 918-928, 2010

Kato K, Takao T, Kuboyama A, Tanaka Y,

Ohgami T, Yamaguchi S, Adachi S, Yoneda T, Ueoka Y, Kato Keiji, Hayashi S, Asanoma K, Wake N: Endometrial cancer side-population cells show prominent migration and have a potential to differentiate into the mesenchymal cell lineage: The American Journal of Pathology. 176(1): 381-92, 2010

Ohgami T, Kato K, Kobayashi H, Sonoda K, Inoue T, Yamaguchi S, Yoneda T, Wake N: Low-dose mithramycin exerts its anticancer effect via the p53 signaling pathway and synergizes with nutlin-3 in gynecologic cancers. : Cancer Sci. 101(6): 1387-95, 2010  
2010.06(Epub:02.25)

Morokuma S, Anami A, Tsukimori K, Fukushima K, Wake N. Abnormal fetal movements, micrognathia and pulmonary hypoplasia: a case report. Abnormal fetal movements : BMC Pregnancy & Childbirth 1-3, 2010

Aso K, Hojo S, Yumoto Y, Fukushima K, Miyazaki M, Kotoh K, Wake N. Three cases of acute fatty liver of pregnancy: Postpartum clinical course depends on interval between onset of symptoms and termination of pregnancy: J Matern Fetal Neonatal Med. 23(9), 1047-9, 2010

学会発表] (計 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

和氣 徳夫 (Norio Wake)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号：60091584

### (2) 研究分担者

小林 裕明 (Hiroaki Kobayashi)  
九州大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：70260700

福島 恒太郎 (Kotaro Fukushima)  
九州大学・病院・講師  
研究者番号：40304779

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：