

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 23 年 4 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659383

研究課題名（和文）婦人科癌幹細胞の特性と上皮間葉転換

研究課題名（英文）Characteristic of gynecologic cancer stem cell and Epithelial-Mesenchymal Transition

研究代表者

吉川 史隆 (Kikkawa Fumitaka)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40224985

研究成果の概要（和文）：卵巣卵黄囊腫瘍細胞において CD133 が癌幹細胞マーカーであることを証明した。我々は腹膜中皮細胞と卵黄囊腫瘍細胞株（NOY1）の相互作用を検討した。NOY1 から癌幹細胞を分離し、腹膜中皮細胞との共培養によってコロニー形成能、浸潤能の亢進を認めた。その作用は CXCR4 アンタゴニストによりブロックされた。以上の結果から腹膜中皮細胞は卵黄囊細胞の癌幹細胞に対してニッチとして作用することを証明した。癌幹細胞と腹膜中皮細胞の共培養の結果、それぞれの細胞の上皮間葉転換が認められた。

研究成果の概要（英文）： The present study was designed to evaluate the tumor-formation ability of CD133+ cells in ovarian Yolk sac tumor (YST) cell lines and to examine characteristics of CD133+ cells such as cell growth, and invasiveness. Furthermore, we investigated interactions between peritoneal mesothelial cells and stem cell of YST (SC-YST) based on the hypothesis that peritoneal mesothelial cells have the potential to provide one of the niches for SC-YST. Our data suggest that peritoneal mesothelial cells have the potential to provide one of the niches for NOY1 cells. Interaction of peritoneal mesothelial cell and NOY1-CD133+ cells induced Epithelial-Mesenchymal Transition in these cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	0	1,100,000
2010 年度	1,000,000	0	1,000,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	300,000	3,400,000

研究分野：婦人科腫瘍学

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：癌幹細胞、上皮間葉転換、腹膜中皮細胞、幹細胞ニッチ

1. 研究開始当初の背景

上皮間葉転換とは1980年代にElizabeth Hayらが提唱した上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象で、初期胚発生における原腸陥入、神経提細胞の運動や器官形成過程での重要性が明らかになっている。また癌においても、上皮間葉転換が転移・浸潤・腹膜播種・抗癌剤耐性と多岐に関与しているという研究成果を我々は多く報告してきた。即ち、上皮間葉転換とは上皮細胞系と間葉細胞系への分化能を持つ細胞の存在を意味している。一方癌幹細胞研究は、2001 Nature でReyaらが癌組織中に癌幹細胞が存在し、階層的な細胞社会を構成しているという新しい概念を提唱した。これら上皮間葉転換と癌幹細胞の両者の概念を組み合わせ、癌幹細胞の上皮間葉転換の解析と上皮間葉転換制御による癌進展抑制を試みる研究は他に類を見ず、革新的なものである。「多分化能」を持つ癌幹細胞に oncogenic stress (抗癌剤治療、放射線治療、低酸素状態等) を与える事により、上皮間葉転換を制御する転写因子 (Snail, Slug, SIP-1, TWIST etc) が働き、上皮系の特徴を持つ癌細胞と間葉系の特徴を持つ癌細胞への分化の比率が変化し、そして癌幹細胞から分化した間葉系の特徴をもつ癌細胞群において浸潤能・接着能・抗癌剤耐性の亢進が見られると考えている。またおそらく癌幹細胞は、SOX2, Nanog, Oct3/4 などの正常幹細胞と同様な自己複製機構に関与する分子を持ち、高い増殖ポテンシャルを持っているにもかかわらず多くの癌幹細胞は静止期にあると考えられる。現在主流を占めている化学療法や放射線治療等の癌治療は分裂速度の速い細胞をターゲットとしている為に、癌幹細胞の性質を考えると現行の治療では極めて不十分であると考えられる。

2. 研究の目的

「多分化能」を持つ癌幹細胞に oncogenic stress (抗癌剤治療、放射線治療、低酸素状態等) を与える事により、上皮間葉転換を制御する転写因子 (Snail, Slug, SIP-1, TWIST etc) が働き、上皮系の特徴を持つ癌細胞と間葉系の特徴を持つ癌細胞への分化の比率が変化し、そして癌幹細胞から分化した間葉系の特徴をもつ癌細胞群において浸潤能・接着能・抗癌剤耐性の亢進が見られると考えている。またおそらく癌幹細胞は、SOX2, Nanog, Oct3/4 などの正常幹細胞と同様な自己複製機構に関与する分子を持ち、高い増殖ポテンシャルを持っているにもかかわらず多くの癌幹細胞は静止期にあると考えられる。現在主流を占めている化学療法や放射線治療等の癌治療は分裂速度の速い細胞をターゲットとしている為に、癌幹細胞の性質を考えると現行の治療では極めて不十分である。我々は、今回の卵巣癌幹細胞の上皮間葉転換の解

析から、新しいアプローチによる癌治療の開発を目指している。

3. 研究の方法

さまざまな婦人科癌から分離同定した癌幹細胞において、細胞表面マーカー、上皮系マーカー (E-cadherin, beta-catenin)、間葉系マーカー (vimentin, smooth muscle actin (SMA)、fibronectin)、そして上皮間葉転換を制御している転写因子 (Snail, Slug, SIP-1, TWIST) の発現を western blot, RT-PCR, FACS を用いて解析する。我々は以前より、様々な細胞表面マーカー (CD cluster, CXCR4 etc) が婦人科癌の細胞形態、転移浸潤能、抗癌剤感受性、さらに腹膜播種に深く関与している事を数多く報告している。興味深い事に今回分離・同定した卵黄囊腫瘍細胞株の幹細胞において、これまで我々が研究してきた CXCR4 の強い発現が見られた。組織幹細胞において CD133 等の幹細胞分子発現の On off により、生体のホメオスタシスの維持や分化に関係しているのと同様に、癌幹細胞においても CD133 発現の On Off により、CD133 と CXCR4 等の細胞表面マーカーとのクロストークが存在し、お互いの発現を変化させていると我々は考えた。また、腹膜播種においては腹膜中皮細胞と癌細胞の相互作用は必須と考え、我々は腹膜中皮細胞が卵巣がん幹細胞のニッチであるとの仮説をたてそれを証明するよう計画した。具体的には CD133 により幹細胞を分離し、腹膜中皮細胞と共培養を行い、コロニー形成能、浸潤能を検討する。また CXCR4 アンタゴニストも用いて検討する。また癌細胞存在下で中皮細胞におこる遺伝子発現変化を cDNA マイクロアレイ法にて解析した。

4. 研究成果

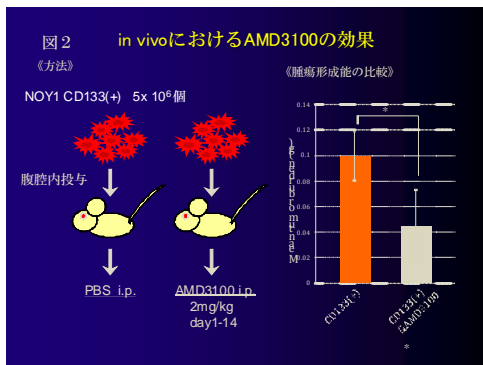
我々の教室で樹立した卵黄囊腫瘍細胞株 (NOY1, NOY2) において CD133 ががん幹細胞マーカーであり、セルソーターにて効率良く、がん幹細胞を分離できた。ヌードマウスを用いた検討においても CD133 陽性細胞は少数の細胞のみで移植可能であり、CD133 が癌幹細胞マーカーになりうる事が証明できた

図1
磁気細胞分離法(※)によるCD133陽性細胞群の分取
※MACS: Magnetic Cell Sorting

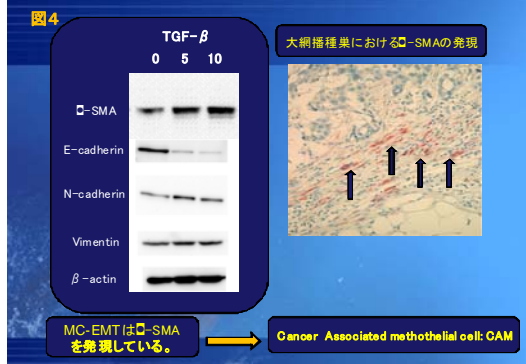
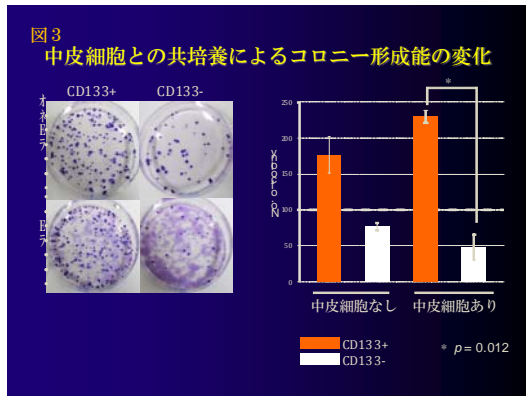


(図1)。我々は CD133 陽性および陰性細胞と腹膜中皮細胞との共培養の結果から、腹膜中皮細胞は CD133 発現維持に関与するとともに、CD133 陽性細胞においてのみ、コロニー形成能、腹膜浸潤能を亢進し、がん幹細胞ニッチとしての機能をもつことを証明した。さらに我々は CD133 陽性細胞において CXCR4 の発現が亢進していることを確認し、CXCR4 中和抗体投与したところ腹膜中皮細胞によって促進した、CD133 陽性細胞のコロニー形成能、腹膜浸潤能は抑制され、ヌードマウスを用いた腹膜播種モデルにおいても CD133 陽性細胞の腹膜播種を抑制した

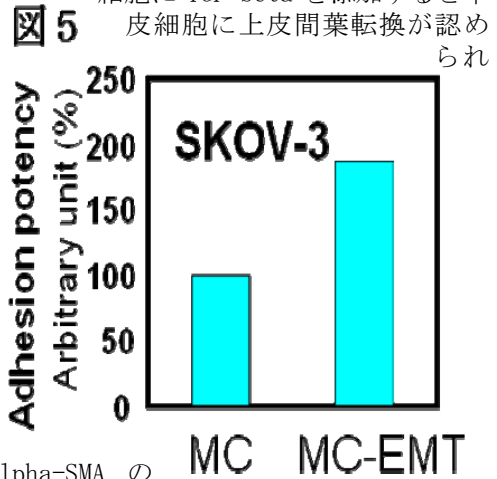
(図2)。次いで通常培養の腹膜中皮細胞と NOY1 の培養液上清を添加後 24 時間の腹膜中皮細胞との比較を行ったところがん細胞と共培養した中皮細胞は CD133 陽性細胞の維持、



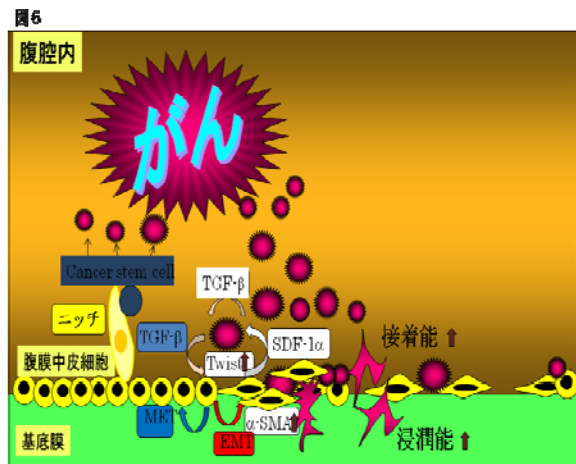
コロニー形成能、腹膜浸潤能ともに有意に亢進していた (図3)。遺伝子発現プロファイルの比較ではあ alpha-SMA の発現亢進を認めた。臨床検体の免疫染色の結果腹、膜播種



病巣における alpha-SMA の発現の亢進を認めた (図4)。alpha-SMA 陽性中皮細胞は CAM としてがん幹細胞の維持に関与することが示され、CAM 化した腹膜中皮細胞は卵巣がんの腹膜播種においてニッチとして作用している可能性が示唆された。また、腹膜中皮細胞に TGF-beta を添加すると中皮細胞に上皮間葉転換が認められ



alpha-SMA の発現は亢進していた。以上の結果から卵巣がん細胞と腹膜中皮細胞の共培養によって上皮間葉転換は癌細胞のみならず腹膜中皮細胞にも起こり癌細胞の浸潤、転移を促進する可能性が示唆された。その浸潤、転移能の促進メカニズムとして上皮間葉転換した腹膜中皮細胞では SDF-1 の分泌が亢進していることが重要な要因と考えられた (図5)。我々の研究成果によって卵巣がん腹膜播種の治療において卵巣がん細胞だけでなく播種先である腹膜中皮細胞も治療のターゲットになる可能性が示唆された。我々の研究成果のまとめを図6に示した。



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3件) すべて査読有
1) Mitsui H, Shibata K, Suzuki S, Umezumi T, Mizuno M, Kajiya H, Kikkawa F.

Functional interaction between peritoneal mesothelial cells and stem cells of ovarian yolk sac tumor in peritoneal dissemination. 124(2):303-10.2012.

2) Sekiya R, Kajiyama H, Sakai K, Umezu T, Mizuno M, Shibata K, Yamamoto E, Fujiwara S, Nagasaka T, Kikkawa F. Expression of CXCR4 indicates poor prognosis in patients with clear cell carcinoma of the ovary. Hum Pathol. 2011(in press)

3) Suzuki S, Terauchi M, Umezu T, Kajiyama H, Shibata K, Nawa A, Kikkawa F. Identification and characterization of cancer stem cells in ovarian yolk sac tumors. Cancer Sci, 101(10):2179-85, 2010.

〔学会発表〕（計 3 件）

1) 柴田清住、吉川史隆 婦人科癌に対する特異的癌免疫療法—明細胞腺癌を対象としたGPC3特異的ペプチドワクチン療法の第I, II相臨床試験 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月5日、名古屋国際会議場

2) 鈴木史朗、吉川聡明、廣澤友也、柴田清住、吉川史隆、中面哲也 卵巣明細胞腺がんに対するGPC3由来ペプチドワクチン療法の可能性 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月5日、名古屋国際会議場

3) 近藤紳司、岡村文子、牧寛之、Rong Zhang、植村靖史、藤田貢、山本英子、柴田清住、吉川史隆、葛島清隆 内因性HLAの発現を抑制し目的のHLA-A24を発現する人工抗原を用いた卵巣がんを傷害するCTLの誘導 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月4日、名古屋国際会議場

4) 松村寛子、柴田清住、梅津朋和、梶山広明、那波明宏、吉川史隆 卵巣がん幹細胞と腹膜中皮細胞の相互作用 第48回日本婦人科腫瘍学会、2010年7月8日、つくば国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 史隆 (Kikkawa Fumitaka)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40224985

(2) 研究分担者

柴田 清住 (Shibata Kiyosumi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90335026

那波 明宏 (Nawa Akihiro)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90242859

(3) 連携研究者 なし