

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791564

研究課題名 (和文) 子宮体癌幹細胞及び子宮内膜幹細胞の同定と新規分子標的治療の開発

研究課題名 (英文) Identification of endometrial cancer stem cells and endometrial stem cells for establishment of new molecular-targeting therapy

研究代表者

恒松 良祐 (TSUNEMATSU RYOSUKE)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：20380529

研究成果の概要 (和文)：

ヒト月経血 (月経1日目～2日目) より回収した子宮内膜細胞における SP (side population) 細胞の存在比率をフローサイトメトリーで検討したところ、およそ 2% 前後の SP 細胞が存在していることが明らかとなった。また SP 細胞と非 SP 細胞を用いてコロニーフォーメーションアッセイを行ったところ、SP 細胞では効率よくコロニーを形成した。以上の結果よりヒト月経血より回収した SP 細胞は自己複製能の高い細胞集団であることが明らかとなった。IL-1R (interleukin-1 receptor)、SDF-1 の発現を免疫染色により検討したところ、SP 細胞集団において IL-1R、CXCR4 を発現する細胞がわずかに認められた。

研究成果の概要 (英文)：

FACS analysis of human endometrial cells recovered from menstrual blood revealed that they included about 2% of SP (side population) cells. Colony formation assay using SP cells and non-SP cells showed that SP cells formed colonies more efficiently than non-SP cell. These results indicated that SP cells recovered from human menstrual blood have self-renewing ability. Immunocytochemical staining of hEM SP cells for IL-1R and CXCR4 revealed that a few SP cells expressed both proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：産婦人科学 生殖内分泌学 婦人科腫瘍学 分子生物学

科研費の分科・細目：ライフサイエンス (共通基礎研究)

キーワード：子宮体癌幹細胞、子宮内膜幹細胞、SP 細胞、Ras/ER 経路、細胞老化

1. 研究開始当初の背景

子宮体癌は乳癌とともに、最近増加してきている婦人科癌の1つである。臨床病理学的にはエストロゲン依存性の予後良好なI型 (高・中分化型類内膜腺癌) と、エストロゲン非依存性の予後不良のII型 (低分化型類内

膜腺癌、漿液性腺癌、明細胞癌) に分けられ、前者は K-ras, PTEN 後者は p53, HER2/neu などの癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活性化が関与していることが報告され、組織分化度により発癌機構に関与するシグナル経路に違いがあることが示唆されている。われわれはこれまで Ras/estrogen

receptor (ER) 経路が子宮体癌の癌化に重要であることや、子宮内膜に幹細胞様の細胞が存在することを明らかにしてきた。本研究では、1) 未分化な癌幹細胞を同定し、分化細胞と比較しながら特性を解析し、2) 細胞分化度とホルモン依存性・非依存性の関連、その形質に關与する分子機構の解析を行うとともに、3) 従来の化学療法とは異なる作用機序をもつ、分化刺激による細胞老化誘導に基づく新規分子標的治療法の開発を行うことを目的とする。以上より、子宮温存を希望する I 型子宮体癌患者や治療抵抗性未分化癌や再発癌患者の予後改善を目標とする。

2. 研究の目的

A. 子宮体癌幹細胞の同定：

本研究では、複数の子宮体癌細胞株を用いて、SP 細胞からの癌幹細胞の同定・解析をさらにすすめ、1) 幹細胞と分化細胞との間で造腫瘍能、マイクロアレイを用いた遺伝子発現の差、抗癌剤やシグナル阻害剤への反応の差、ER 活性などの違いを解析し比較することにより子宮体癌（特に未分化癌・再発癌）の発生機構への幹細胞の關与の解明 2) 未分化性を維持する分子機構の解析、epithelial-mesenchymal-transition(EMT)の關与の解明、分化誘導シグナルの同定を行う。

B. 正常子宮内膜幹細胞の発癌機構への關与：

不死化子宮内膜細胞株を用い、SP 細胞を正常内膜幹細胞の、non-SP 細胞を分化細胞のモデルとして、I 型にみられる K-ras 遺伝子変異、II 型にみられる HER2 過剰発現が SP 細胞と nonSP 細胞に起こった場合の造腫瘍能、細胞特性の違いを明らかにし、癌化への幹細胞・分化細胞および遺伝子変異の關与を明らかにする。

C. 細胞分化度に基づく新規治療法の開発：

本研究では、1) まず子宮体癌細胞の ER 機能に重要な上流因子は何か、上記のどの経路が最も ER 機能阻害による細胞老化に關与するのか、を明らかにした上で、2) 細胞分化と細胞老化の類似性・相違点の検討、3) 分化誘導剤の造腫瘍能への効果の検討、3) 上記薬剤のマウスでの効果・副作用を検討した後、臨床応用をめざした phase I study を行い、分化刺激による細胞老化誘導に基づいた新規分子標的療法を開発を行う。

3. 研究の方法

A. 子宮体癌幹細胞の同定と解析：

子宮体癌細胞株を用いて、SP 細胞が不均等

分裂・多分化能・自己増殖能・造腫瘍能の亢進等の癌幹細胞の特性をもつことを明らかにし、non-SP 細胞と比較することにより、未分化・分化マーカーを同定する。特に、未分化性を維持する機構や脱分化の分子機構に EMT が關与するかを検討する。得られた結果を臨床検体で確認する。

B. 正常子宮内膜幹細胞の発癌機構への關与：

ラットおよびヒト不死化子宮内膜細胞株より SP 細胞、non-SP 細胞を分離し、それぞれを幹細胞、分化細胞のモデルとして I 型にみられる K-Ras 遺伝子変異、II 型にみられる HER2 遺伝子を導入し生物学的特性を比較検討することにより、癌の発生、組織分化度、ホルモン依存性に關与するのは、発生母地となる細胞カ遺伝子 (K-ras, HER2) 変異か、あるいは腫瘍周囲の微小環境かを明らかにする。

C. 細胞分化度に基づく新規治療法の開発：

まず、ER 機能阻害により細胞老化を誘導する分子機構 (MDM2/p53/p21 経路、p16/Rb 経路、ATM を介する経路等) を明らかにするとともに、子宮体癌における ER 機能亢進に重要な上流因子 (エストロゲン、増殖因子、炎症性サイトカイン等) を同定する。また、上記 A,B で得られた分化誘導に重要な分子機構と比較することにより、細胞分化と老化の関連性を検討する。次に有効な分化誘導剤をスクリーニングし、従来の治療抵抗性の再発癌・未分化癌を対象に分化刺激による細胞老化誘導を利用した新規分子標的治療の開発を行う。

4. 研究成果

組織幹細胞の同定に使用される Hoechst33342 の取り込みの低い分画の細胞 (side population cells、以下 SP 細胞) をフローサイトメトリー法により分離する方法を用いて、正常子宮内膜細胞株 hEM での SP 細胞分画の分離を試みた。しかし SP 細胞の存在割合は概ね 1% 以下と非常に少ないことが明らかとなった。次に hEM より多くの SP 細胞を回収するための至適培養条件を見いだすために、基礎培地 DMEM に加える血清、各種増殖因子の条件検討を行った。血清濃度を 1% とし、それぞれ最終濃度 10ng/ml となるように bFGF、TGFβ、TGFα、EGF を添加した培地を調製し、hEM を 6 日間培養した後フローサイトメトリー法で SP 細胞の割合を検討した。bFGF、TGFβ、TGFα を添加した細胞では SP 細胞の存在比率は 0.01 ~ 0.05% であったが、EGF を添加した細胞では SP 細胞の存在比率は 4.3% であった。現在までのところ EGF を添加した際に SP 細胞の割合が増加する理由は不明であるが、少なくとも hEM の SP 細胞を効率よく回収するには、EGF を添加

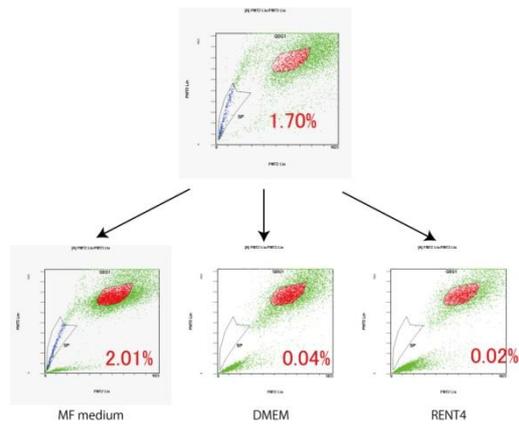


図1：月経血より回収したSP細胞を培養条件を変えて5日間培養した後フローサイトメトリーでSP細胞の存在比率を検討した

した培地を用いる方がよいことが明らかとなった。このようにして回収したSP細胞に、Ras/ER経路に関わる遺伝子群（活性型K-Ras、HER2など）を導入し、SP細胞の存在比率に影響を及ぼすかどうかの検討を試みたが、hEMそのものの遺伝子導入効率が非常に悪いため、その効果を確認することは出来なかった。

一方でヒト月経血（月経1日目～2日目）より回収した子宮内膜細胞を5日間培養した後、hEMと同様の方法を用いてSP細胞の存在比率を検討したところ、およそ2%前後のSP細胞が存在していることが明らかとなった（図1）。このようにして回収したSP細胞と非SP細胞を用いてコロニーフォーメーションアッセイを行ったところ、非SP細胞では20日間培養後もほとんどコロニー形成を認めなかったが、SP細胞では効率よくコロニーを形成した。以上の結果よりヒト月経血より回収したSP細胞は非SP細胞と比べて自己複製能の高い細胞集団であることが明らかとなった（図2）。

さらに高効率でSP細胞を回収可能な培養条件の検討を進めたが、現状では2%前後の回収率に止まっており以後の遺伝子導入実験を開始するには至っていない。今後本研究を推進するための課題として、SP細胞維持に関わる因子や至適なマーカー分子の同定が、きわめて重要であり、その探索を進めているところである。

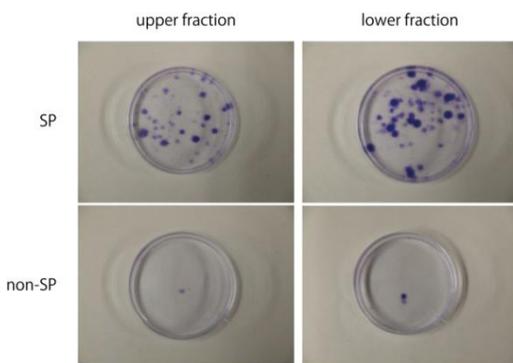


図2：月経血を30μmのフィルターで上皮細胞（上層）と間質細胞（下層）に分離した後、セルソーターでSP細胞、非SP細胞をそれぞれ回収し、コロニー形成実験を行った。

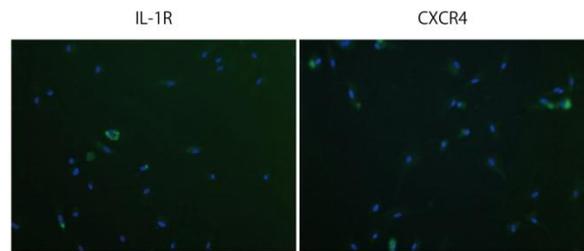


図3：hEMより回収したSP細胞におけるIL-1R、CXCR4の発現を調べるために免疫染色を行った。いずれの分子もSP細胞集団中にわずかに発現する細胞を認めた。non-SP細胞ではこれらを発現する細胞は認められなかった。

以前の研究でhEMのSP細胞/non-SP細胞を用いてマイクロアレイ解析を行い、両者の遺伝子発現プロファイルを検討したところ、SP細胞においてIL-1R（interleukin-1 receptor）、SDF-1の発現が高いことが明らかになった。われわれはSP細胞集団において発現が上昇しているこれらの分子がSP細胞内に存在する子宮内膜幹細胞の分子マーカーとなる可能性があると考えた。そこでhEMのSP細胞におけるIL-1R、SDF-1のレセプターであるCXCR4の発現を確認するために免疫染色を行い検討した。SP細胞においてIL-1R、CXCR4を発現する細胞はわずかに認められるが、non-SP細胞においては認められなかった（図3）。上記のSP細胞の回収率から考えてSP細胞内にIL-1R、CXCR4を発現する細胞がわずかにしか存在しないというのは妥当と思われるが、これらの分子を発現する細胞が本当に多分化能を有するのかということが今後の課題である。

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0件）

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

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

恒松 良祐 (TSUNEMATSU RYOSUKE)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：20380529