

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24年6月5日現在

機関番号：13201
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22659296
 研究課題名（和文）婦人科腫瘍の癌幹細胞の同定とそれを標的とした新規治療法の開発の試み
 研究課題名（英文）Identification of Cervical Cancer Stem Cells and development of the new method for treatment of that cells as the target.
 研究代表者：二階堂 敏雄（NIKAIDO TOSHIO）
 富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・教授
 研究者番号：50180568

研究成果の概要（和文）：CD44+CD24+細胞集団は、in vitro と in vivo において癌幹細胞の性質とその特異的なマーカーの発現を示し、それに対して抗癌剤をスクリーニングすることによって、この再発性疾患に対する有効性の高い治療法の確立へとつながる。

研究成果の概要（英文）：It is concluded that CD44+CD24+ sub-population cells have the in vitro and in vivo characteristics of cancer stem cells and their specific detection could be highly valuable for the therapy of this recurrent disease by screening of new anticancer drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：医歯薬学

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：婦人科腫瘍学・癌幹細胞・組織幹細胞・婦人科組織・幹細胞マーカー・組織アレイ

1. 研究開始当初の背景

婦人科組織内の腺上皮から発生する腺癌は消化器系組織に発生する腺癌に比べ、化学療法に対する反応はよいが、その後、再発および抗癌剤耐性を獲得し治療に難渋することが多い。薬剤耐性により治療を免れ遺残している癌幹細胞が再び増殖してくるものと考えられる。婦人科組織においては正常組織の幹細胞も同定されておらず、その性状を明らかにすることは、より有効な癌治療を開発する上で不可欠と思われる。

2. 研究の目的

本研究課題は婦人科正常組織および同組織から発生した癌における幹細胞を再生医学

的立場から同定するとともにそれらの幹細胞を単離し、それらの性状を解析することによって、婦人科腫瘍の早期発見や新たな癌治療法開発への手がかりを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 細胞表面抗原の発現様式による HeLa 細胞・患者からの細胞の解析：フローサイトメトリック法による CD24, CD29, CD44, CD49f, CD34, CD45 の発現パターン (Fig. 1)。

2) CD24, CD44 を用いた

Fluorescence-activated cell sorting (FACS) による HeLa 細胞・患者からの細胞の分取 (Fig. 2) および分取細胞の解析：

- ① Sphere formation assay (Fig. 3)
- ② Soft agar colony assay (Fig. 4)
- ③ Heterogeneity after culturing assay (Fig. 5)
- ④ Cell proliferation assay (Fig. 6)
- ⑤ Staining with stemness markers (Fig. 7)
- ⑥ RT-PCR for the stemness genes (Fig. 8)
- ⑦ Chemotherapy resistance assay (Fig. 9)
- ⑧ Radiotherapy resistance assay (Fig. 10)
- ⑨ Tumorigenicity into nude mice (Fig. 11-13, Table 1).

3) 婦人科各正常組織より上皮細胞をそれぞれ単離し、抗体によりラベリングした後セルソーターにかけ、マーカーを発現している細胞を分離し、これらの細胞に幹細胞としての性格が存在するか否かを確認している。

- ① 希釈密度における培養条件下でのコロニー形成能により増殖能を解析した。
- ② 未分化状態を維持する培養条件を確立し、分離細胞が少なくとも一つのスフェロイド(未分化細胞塊)を形成する細胞数をカウントし、96穴プレート上に培養した細胞から一次スフェロイドを得、これを回収し離散させ二次スフェロイドを作る細胞数をカウントし、自己複製能を解析した。
- 4) 得られた細胞を、Nudeマウスの皮下に移植し、癌再生能の有無を検討した。
- 5) 得られた正常幹細胞マーカーの発現陽性細胞数をカウントし、出現率を統計的に評価した。

4. 研究成果

1) CD44, CD24, CD29, CD49f は発現していたが、CD34, CD45 は発現していなかった (Fig. 1)。

2) CD44+CD24+の細胞集団は 28%、CD44+CD24-の細胞集団は 53%、CD44-CD24+の細胞集団は 4%、CD44-CD24-の細胞集団は 15%であった (Fig. 2)。

CD44+CD24+の細胞集団は、CD44+CD24-のものに比べて大きく、数が多い Sphere を形成した。一方、CD44-の細胞集団では Sphere が形成されなかった (Fig. 3, Fig. 4)。

分取した細胞集団の培養後の多様性を検討したところ、CD44+CD24+の細胞集団が元の細胞集団と同様の分布を示したが、他は示さなかった (Fig. 5)。

分取した細胞集団の培養後の増殖能を検討したところ、CD44+CD24+の細胞集団が最も増殖能が高かった (Fig. 5)。

分取した細胞集団の幹細胞マーカーの発現を Oct3/4 抗体、c-Myc 抗体、Sox-2 抗体で検討したところ、CD44+CD24+の細胞集団が他の細胞集団に比べて高い発現を示した (Fig. 7)。

分取した細胞集団に対する幹細胞マーカーの mRNA の発現を検討したところ、CD44+CD24+の細胞集団が他の細胞集団に比

べて oct3/4、c-myc、nanog、klf-4 の発現が高かった (Fig. 8)。

抗癌剤である Cisplatin に対する抵抗性を検討したところ、CD44+CD24+の細胞集団が他の細胞集団に比べて抵抗性を示した (Fig. 9)。

X 線に対する抵抗性を検討したところ、CD44+CD24+の細胞集団が他の細胞集団に比べて抵抗性を示した (Fig. 10)。

マウスにおける腫瘍形成能を検討したところ、CD44+CD24+の細胞集団が他の細胞集団に比べて腫瘍の形成が大きかった (Fig. 11) 形成された腫瘍の細胞において CD44、CD24 の発現に対する分布様式を検討したところ、CD44+CD24+の細胞集団を植え付けたマウスの腫瘍が、分取しない元の細胞集団と同様の多様性を示し、CD44+CD24-のものを植え付けたマウスからの腫瘍は、示さなかった (Fig. 12)。

- 3) 得られたスフェロイドに自己複製能があった。
- 4) 移植した腫瘍においても、オリジナルの癌組織で見られた幹細胞マーカーの発現があった。
- 5) 子宮頸部の扁平上皮癌、子宮内膜癌、卵巣癌の各組織間で、幹細胞マーカーの発現が見られたが、共通に発現する癌幹細胞マーカーや特定の細胞表面マーカーは見いだされなかった。

【考察】

- CD44+CD24+細胞集団は、他の細胞集団に比べて sphere とコロニーの形成力がある。
- CD44+CD24+細胞集団が、分取しない元の細胞集団と同様の多様性を培養後に示したのに対し、他の細胞集団はそれを示さなかった。
- CD44+CD24+細胞集団は、他の細胞集団に比べて高い増殖速度を示した。
- CD44+CD24+細胞集団は、他の細胞集団に比べて幹細胞マーカーの発現が高かった。
- CD44+CD24+細胞集団は、分取しない元の細胞集団と他の細胞集団に比べて高い腫瘍形成能を示した。
- CD44+CD24+細胞集団によって形成された腫瘍の細胞は、分取しない元の細胞集団と同様の多様性を示した。
- CD44+CD24+細胞集団は、化学療法と放射線療法に対して、他の細胞集団に比べて抵抗性を示した。
- 幹細胞に特異的な性格を維持するのに必要と思われる因子が ABC transpoter gene の一つである breast cancer resistance protein (BCRP)、ES 細胞に発現の見られる Oct4、Klf-4 であることが示唆できた。

【結論】

CD44+CD24+細胞集団は、in vitro と in vivo において癌幹細胞の性質とその特異的なマーカーの発現を示し、それに対して抗癌剤をスクリーニングすることによって、この再発性疾患に対する有効性の高い治療法の確立へとつながるであろう。

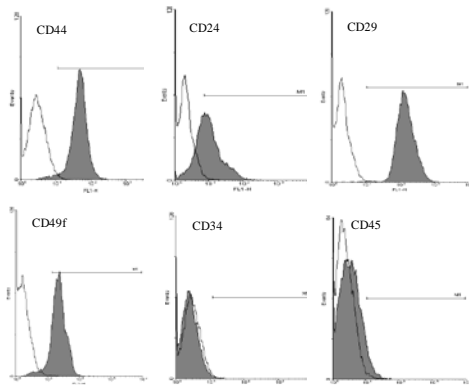


Fig.1 FCM analysis of HeLa cells. CD44, CD24, CD29 and CD49f were expressed but CD34 and CD45 were not expressed in HeLa cells.

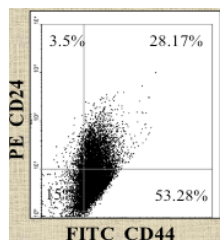


Fig.2 FACS for HeLa cells. HeLa cells were sorted according to CD44 and CD24 cell surface markers.

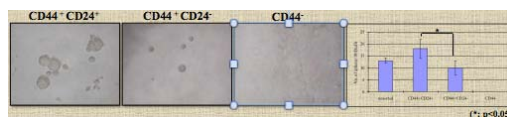


Fig.3 Sphere formation in 24-wells ultra-low attachment dish. The CD44+CD24+ sub-population formed more spheres with big size than CD44+CD24- sub-population, while CD44- sub-population did not form any spheres.

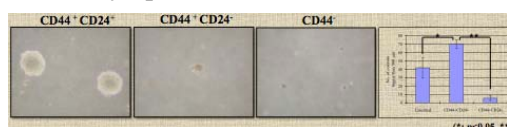


Fig.4 Soft agar colony assay. The CD44+CD24+ sub-population formed more colonies with big size than other sub-populations.

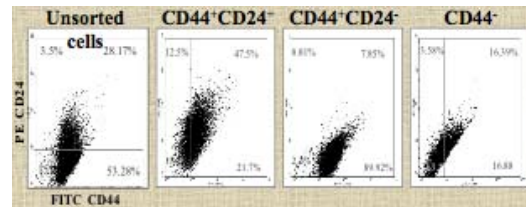


Fig.5 Heterogeneity after culturing assay. After sorting, the sub-populations were cultured till being confluent, then, analyzed by FCM for testing of heterogeneity. The CD44+CD24+ sub-population formed heterogenous cells as the original unsorted cells, but other sub-populations did not.

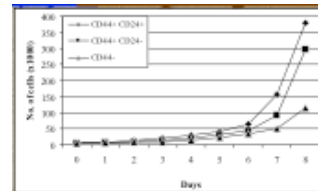


Fig.6 Cell proliferation assay. The growth rate of CD44+CD24+ subpopulation was greater than those of other sub-populations, but not significantly different.

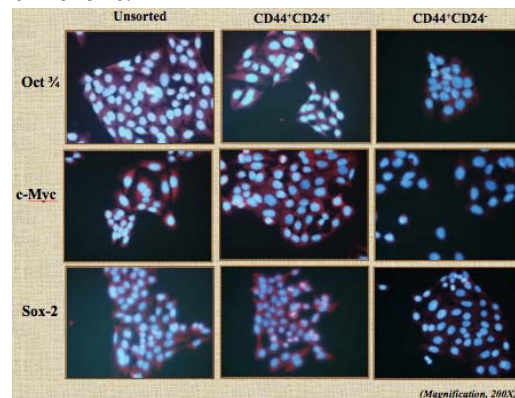


Fig.7 Staining for the sorted HeLa cells. Oct 3/4, c-Myc, and Sox-2 were highly expressed in the cytoplasm of CD44+CD24+ sub-population compared to CD44+CD24- sub-population.

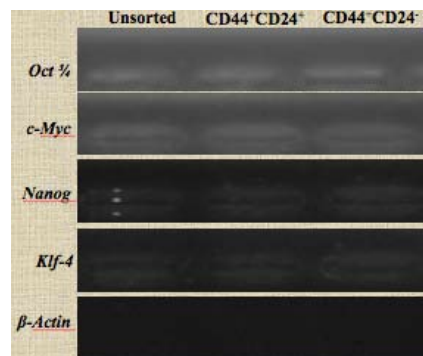


Fig.8 RT-PCR for the stemness genes. Oct 3/4, c-Myc, Nanog and Klf-4 were highly expressed in CD44+CD24+ sub-population compared to CD44+CD24- sub-population.

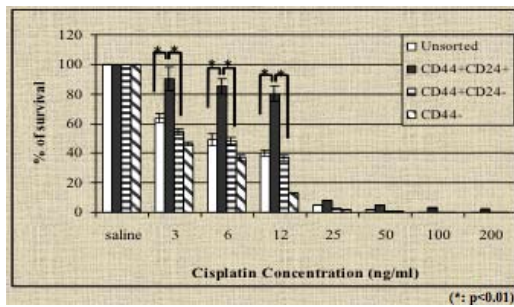


Fig.9 Cisplatin resistance assay. The CD44+ CD24+ sub-population cells are more resistant to cisplatin than others, suggesting that these cells possess the hypothesized cancer stem cell chemoresistant phenotype.

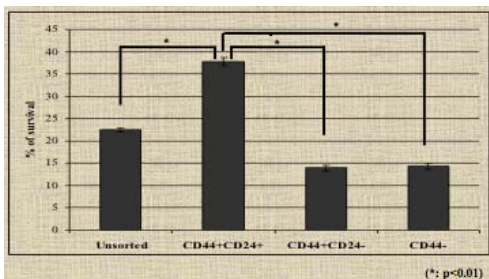


Fig.10 X-ray resistance assay. The CD44+ CD24+ sub-population cells are more resistant to X-ray than others, suggesting that these cells possess the hypothesized cancer stem cell radioresistant phenotype.

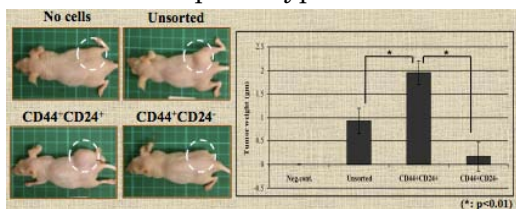


Fig.11 Tumorigenicity. Mice injected with CD44+CD24+ sub-population formed tumors bigger than those from Hela unsorted cells (two folds) four weeks after IM injection of 1x10⁴ cells. But, from CD44+CD24- sub-population only one mouse formed tumor with smaller weight compared to that from Hela unsorted cells, suggesting that CD44+CD24+ sub-population is the most tumorigenic sub-population in Hela cells.

Type of cells	Number of injected cells			
	100'000	10'000	1000	100
Hela unsorted	3/3	0/3	0/0	0/0
CD44+CD24+	3/3	3/3	3/3	0/3
CD44+CD24-	1/3	0/3	0/0	0/0

(Number of formed tumors / number of injections)

Table 1 Injection of different cell numbers into nude mice. From the table, we notice that 100'000 Hela unsorted cells formed tumor, but only 1000 cells of CD44+CD24+ sub-population formed tumor, suggesting that CD44+CD24+ sub-population is 100 times more tumorigenic than Hela unsorted cells.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 8 件)

- 1) Kitagawa K., Okabe M., Yanagisawa S., Zhang Xue-Yun., Nikaido T., and Hayashi A. : Use of a hyper-dried cross-linked amniotic membrane as initial therapy for corneal perforations. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 55: 16-21, 2011. :査読 : 有
- 2) Shojaku H., Takakura H., Okabe M., Fujisaka M., Watanabe Y., and Nikaido T. : Effect of hyperdry amniotic membrane patches attached over the bony surface of mastoid cavities in canal wall down tympanoplasty. *Laryngoscope*, 121(9): 1953-1957, 2011. :査読 : 有
- 3) Koike T., Yasuo M., Shimane T., Kobayashi H., Nikaido T., and Kurita H. : Cultured epithelial grafting using human amniotic membrane: the potential for using human amniotic epithelial cells as a cultured oral epithelium sheet. *Arch. Oral Biol.*, 56(10): 1170-1176, 2011. :査読 : 有
- 4) Kimura M., Shibahara N., Hikiami H., Yoshida T., Jo M., Kaneko M., Mogami T., Fujimoto M., Goto H., and Shimada Y. : Traditional Japanese formula kigikenchuto accelerates healing of pressure-loading skin ulcer in rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* Volume 2011, Article ID 592791, 9 pages, 2011. :査読 : 有
- 5) Torigoe K., Tanaka HF., Yonenaga K., Ohkochi H., Miyasaka M., Sato R., Kusumaki T., Yoshida K., and Yoshida T. : Mechanisms of collagen fibril alignment in tendon injury: From tendon regeneration to artificial tendon. *J. Orthop. Res.*, 29: 1944-1950, 2011. :査読 : 有
- 6) Torigoe k., Tanak HF., Ohkochi H., Miyasaka M., Yamanokuchi H., Yoshida K.,

and Yoshida T. : Hyaluronan tetrasaccharide promotes regeneration of peripheral nerve: in vivo analysis by film method. *Brain Res*, 18: 1385:87-92, 2011. : 査読 : 有

7) Arai N., Tsuno H., Okabe M., Yoshida T., Koike C., Noguchi M., and Nikaido T. : Clinical Application of a Hyperdry Amniotic Membrane on Surgical Defects of the Oral Mucosa. *J Oral Maxillofac Surg*, 2011 Dec 22. [Epub ahead of print] : 査読 : 有

8) Teng Z., Yoshida T., Okabe M., Toda A., Higuchi O., Nogami M., Yoneda N., Zhou K., Kyo S., Kiyono T., and Nikaido T. : Establishment of Immortalized Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant*, 2011. in press: 査読 : 有

9) Tomita T., Hayashi N., Okabe M., Yoshida T., Hamada H., Endo S., and Nikaido T. : New dried human amniotic membrane is useful as a substitute for dural repair after skull base surgery. *Skull Base*, 2011. in press. : 査読 : 有

10) Yoneda S., Shiozaki A., Shima T., Ito M., Yamanaka M., Hidaka T., Sumi S., Saito S. : Prediction of exact delivery time in patients with preterm labor and intact membranes at admission by amniotic fluid interleukin-8 level and preterm labor index. *J. Obstet. Gynecol. Res.*, 37:861-866, 2011. : 査読 : 有

11) Saito S., Nakashima A., Shima T. "Future directions of studies for recurrent miscarriage associated with immune etiologies" *J Reprod Immunol.* 90:91-95, 2011 : 査読 : 有

12) Hidaka T., Nakashima A., Hasegawa T., Nomoto K., Ishizawa S., Tsuneyama K., Takano Y. and Shigeru S. "Ovarian squamous cell carcinoma which metastasized 8 years after cervical conization for early microinvasive cervical cancer: a case report" *Jpn J Clin Oncol.* 41:807-810, 2011 : 査読 : 有

13) Shigeru S., Nakashima A., Ito M. and Shima T. "Clinical implication of recent advances in our understanding of IL-17 and reproductive immunology" *Expert Clin Immunol* 7:649-657, 2011: 査読 : 有

14) Molvarec A., Shiozaki A., Ito M., Toldi G., Stenczer B., Szarka A., Nakashima A., Vasarhelyi B., Rigo J., Shigeru S. "Increased prevalence of peripheral blood granulysin-producing cytotoxic T lymphocytes in preeclampsia" *J Reprod Immunol.* 91:56-63, 2011: 査読 : 有

15) Sameshima A., Hidaka T., Shima T., Nakashima A., Hasegawa T., Saito S.

"Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian immature teratoma." *J Obstet Gynaecol Res.* 37:1883-6, 2011: 査読 : 有

16) Hasegawa T., Ishii Y., Yonezawa R., Yoneda N., Shima T., Nakashima A., Hidaka T. and Saito S. "Stage I ovarian cancer cases during early, mid and late pregnancy periods: Three case reports and review of the literature" *J Obstet. Gynaecol. Res.* 2011 37:650-655: 査読 : 有

17) Ito M., Nakasima A., Hidaka T., Okabe M., Bac ND., Ina S., Yoneda S., Shiozaki A., Sumi S., Tuneyama K., Nikaido T., Saito S. : A role for IL-17 in induction of an inflammation at the fetomaternal interface in preterm labour. *J Reprod Immunol*, 84: 75-85, 2010. : 査読 : 有

18) Suzuki A., Horiuchi A., Ashida T., Miyamoto T., Kashima H., Nikaido T., Konishi I., Shiozawa T. : Cyclin A2 confers cisplatin resistance to endometrial carcinoma cells via up-regulation of an Akt-binding protein, periplakin. *J Cell Mol Med*, 14: 2305-2317, 2010. : 査読 : 有

19) Nakashima A., Ito M., Yoneda S., Shiozaki A., Hidaka T., Saito S. : Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy. *Am J Reprod Immunol.*, 63: 104-109, 2010. : 査読 : 有

20) Nakashima A., Ito M., Shima T., Bac N.D., Hidaka T., Saito S. : Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases. *Am J Reprod Immunol. Am J Reprod Immunol.*, 64: 4-11, 2010. : 査読 : 有

21) Hidaka T., Nakashima T., Shima T., Hasegawa T., Saito S. : Systemic lymphadenectomy cannot be recommended for low-risk corpus cancer. *Obstet Gynecol Int.*, 2010: 1-5, 2010. : 査読 : 有

22) Hasegawa T., Yonezawa R., Shima T., Tatematsu M., Nakashima A., Hidaka T., Saito S. : Bone metabolism after cessation of long-term hormone replacement therapy for postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis Jpn*, 18: 133(481)-137(485), 2010. : 査読 : 有

23) Nomoto K., Hori T., Kiya C., Fukuoka J., Nakashima A., Hidaka T., Saito S., Mikami Y., Tsuneyama K., Takano Y. : Endometrioid adenocarcinoma of the vagina with a microglandular pattern arising from endometriosis after hysterectomy. *Pathol Int.*, 60: 636-641, 2010. : 査読 : 有

24) Hasegawa T., Ishii Y., Yonezawa R., Yoneda N., Shima T., Nakashima A., Hidaka T., Saito S.: Stage I ovarian cancer cases during early, mid and late pregnancy periods: Three case reports and review of the literature. J Obstet Gynaecol Res., doi: 10.1111/j.1447-0756.2010.01412.x., 2010. :査読:有

25) Hasegawa T., Nakashima A., Ishimaru M., Shima T., Hidaka T., Saito S.: Carcinomatous meningitis associated with ovarian cancer complicated by SIADH. Jpn J Cancer Chemother, 37: 739-742, 2010. :査読:有

26) Shima T., Sasaki Y., Itoh M., Nakashima A., Ishii N., Sugamura K., Saito S.: Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance during early stage of pregnancy, but not necessary during late stage of pregnancy in allogeneic mice. J. Reprod Immunol, 85: 121-129, 2010. :査読:有

27) Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M.: Th1/Th2/Th17 and regulatory T cell paradigm in pregnancy. Am J Reprod Immunol, 63: 601-610, 2010. :査読:有

28) Saito S., Shima T., Nakashima A., Lin Y.: Immune surveillance during pregnancy. Ind. J. Physiol. Pharmacol., 54:60-63, 2010. :査読:有

〔学会発表〕(計11件)

1) 吉田淑子, 王芳, 岡部素典, 小池千加, 周凱旋, 齋藤滋, 二階堂敏雄: 子宮頸癌における癌幹細胞の細胞表面マーカーの同定(意義). 第10回日本再生医療学会総会, 2011, 3, 1-2, 東京.

2) 吉田淑子, 齋藤滋, 二階堂敏雄: 子宮頸癌における癌幹細胞の細胞表面マーカー. 第70回日本癌学会学術総会, 2011, 10, 3-5, 名古屋.

3) 日高隆雄: 婦人科がん支持療法としての漢方治療. 第63回日本産科婦人科学会学術講演会ランチョンセミナー, 2011, 8, 29-31, 大阪.

4) 日高隆雄: 婦人科がん支持療法としての漢方治療. 道東地区産婦人科医会学術講演会, 2011, 8, 19, 帯広.

5) 中島彰俊, 飯沼ゆり子, 稲田貢三子, 島友子, 長谷川徹, 野本一博, 日高隆雄, 齋藤滋: “子宮頸部中腎腺癌(Mesonephric adenocarcinoma)の二例” 第50回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 北海道札幌コンベンションセンター 平成23年7月22日-24日

6) 二階堂敏雄: 癌幹細胞の同定と解析. 第6回河北省癌学会, 2010, 7, 10, 邢台,

中国.(招待講演)

7) 能登善弘*, 吉田淑子, 小池千加, 岡部素典, 津野宏彰, 野口誠, 二階堂敏雄: 口腔癌細胞株における癌幹細胞の同定. 第9回日本再生医療学会総会, 2010, 3, 18-19, 広島.

8) Fathy M., Koike C., Yoshida T., Okabe M., Nikaido T.: Identification of cervical cancer stem cells. 第9回日本再生医療学会総会, 2010, 3, 18-19, 広島.

9) 中島彰俊, 飯沼ゆり子, 佐藤幹奈, 青木藍子, 稲田貢三子, 島友子, 長谷川徹, 日高隆雄, 齋藤滋: 子宮頸部中腎腺癌 mesonephric adenocarcinoma の2例. 第58回日本産科婦人科学会北日本連合地方部会総会・学術講演会(兼:第38回日本産科婦人科学会 北陸連合地方部会総会・学術講演会), 2010, 9, 18-19, 金沢.

10) Saito S., Nakashima A.: Autophagy is an indispensable mechanism for extravillous trophoblast invasion. 第69回日本癌学会学術総会 シンポジウム “Cancer and autophagy”, 2010, 9, 22-24, 大阪.

11) Nakashima A., Ito M., Shima T., Yoneda S., Saito S.: The role of IL-17 in the pathogenesis of preterm labor. International symposium for immunology of reproduction, symposium “Infectious immunity”, 2010, 8, 28-29, Osaka.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/saiseiigaku/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二階堂 敏雄 (NIKAIDO TOSHIO)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号: 50180568

(2) 研究分担者

吉田 淑子 (YOSHIDA TOSHIKO)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号: 00171421

岡部 素典 (OKABE MOTONORI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号: 60283066

小池 千加 (KOIKE CHIKA)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・

助教

研究者番号：10523889

日高 隆雄 (HIDAKA TAKAO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・

准教授

研究者番号：70283083

(H22.4～H23.9)

中島 彰俊 (NAKASHIMA AKITOSHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・

助教

研究者番号：00436792

(H23.10～H24.3)