

令和 6 年 4 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16853

研究課題名（和文）子宮頸癌の起源細胞の同定と、発癌・分化調整機構の解明

研究課題名（英文）Identifying the cell of origin and elucidating the mechanism of carcinogenesis and differentiation, in cervical cancer

研究代表者

河田 啓 (Kawata, Akira)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：90897290

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：HPV18型陽性子宮頸癌のうち混合癌症例についての解析では、混合癌中の複数の組織型は共通の細胞起源を有すること、またHPVインテグレーションは組織型の分化前の共通起源細胞において既に起こっていることを示した。SCJ領域を再現したヒト検体由来オルガノイド培養を用いた解析では、まずHPV18型初期プロモーター活性が評価可能なLentivirusベクターを樹立し、これをSCJオルガノイドに導入した。初期プロモーター活性化細胞で有意な発現上昇を認めた遺伝子群に対してNIKS細胞株を用いて検証をおこない、ヒストンシャペロン蛋白である NPM3 が未分化性の維持に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、子宮頸癌の起源細胞についての新たな知見を示し、またHPV18型感染の標的細胞とウイルス複製の特徴を解明した。本研究で実施した、子宮頸部 SCJ オルガノイドに対して遺伝子導入を行う手法はこれまでに報告がなく、さらに我々が樹立したHPV18型初期プロモーター活性を測定可能にするベクターシステムも革新的であり、いずれも今後のHPV感染症研究への幅広い応用が可能である。子宮頸癌において、特にHPV18型は早期診断が困難な病態や治療抵抗性を示す病態とも関連があり、本研究で得られた知見や手法は将来的な子宮頸癌治療や予防・診断について研究していく上での基礎となる重要なものである。

研究成果の概要（英文）：In genomic and transcriptomic analyses of HPV18-positive cervical cancers with mixed histological types, we revealed that the different histological types had a common cell of origin and that HPV integration could occur before differentiation into each histological type. In the analysis on human-derived SCJ organoids which reflect the environment of SCJ regions, we initially established a lentiviral vector which enables real-time monitoring of HPV18 early promoter activity, and then transduced it to SCJ organoids. In the promoter activated cells, significantly upregulated genes were identified. Among these genes, validation experiment using NIKS cell line suggested that NPM3, one of histone chaperone proteins may be involved in the maintenance of undifferentiated status.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮頸癌 起源細胞 扁平円柱上皮境界 オルガノイド培養 混合癌 幹細胞 HPV18型

## 1. 研究開始当初の背景

子宮頸部には扁平上皮と腺上皮の接合部である扁平円柱上皮境界(SCJ)が存在し、SCJ細胞は腺系上皮にも重層扁平上皮にも分化できる。子宮頸癌はSCJに存在するreserve細胞という幹細胞の性質をもつ細胞群にHuman papillomavirus (HPV)が感染し発生すると考えられているが、子宮頸癌の起源細胞については議論が分かれる。子宮頸癌はその前がん病変である子宮頸部異形成(CIN)を経て年月をかけて発癌することから、検診で予防できるという特徴がある。一方で、現行の子宮頸部細胞診によるスクリーニングでは、高リスクHPVであるHPV18型由来の前がん病変や腺系病変を見落とす可能性があり、さらなる精度向上が求められている。また、CINの罹患は、20~30代の生殖年齢の女性に多いことから、その進展や退縮リスクを正確に層別化して管理することが重要である。

子宮頸癌の約70%は扁平上皮癌で約30%は腺癌となるが、感染HPVタイプによりその発癌速度や組織型分化調整が異なる。中でもHPV16型と18型は発癌速度が速いこと、HPV18型は腺癌になりやすいことなどが特徴として挙げられる。これらの背景から、子宮頸癌の適切な予防法や治療法を確立するためには、子宮頸癌の起源細胞を同定するとともに、感染HPVタイプ毎に細胞内での分化・発癌機構を解明することが重要であることが分かる。

## 2. 研究の目的

本研究では、子宮頸癌の適切な予防法や治療法を確立するために、子宮頸癌の起源細胞を同定するとともに、HPV感染による分化・発癌機構を解明することを目的とした。

(1)未分化性を維持したまま長期に渡り培養・増殖が可能な初代培養の手法であるオルガノイド培養の手法を用いることで、子宮頸部SCJ領域に存在するreserve細胞を実験的に再現できることを我々は報告してきた。本研究では、このSCJオルガノイドにHPVゲノムを導入することで子宮頸部SCJ領域におけるHPV感染初期の分化制御や発癌機構を解明することを目的とした。

(2)子宮頸癌のうち扁平上皮癌は腔側に局在する扁平上皮領域より発生し、腺癌は子宮頸管内に位置する円柱上皮領域より発生すると考えられてきた。一方ヒト角化細胞を用いたin vitroの報告では、腺癌についても扁平上皮癌と条件を変えることで腺癌類似の腫瘍が誘導可能であったとされている。本研究は子宮頸癌で複数の組織型が混在する症例に関して、クローン解析やHPVインテグレーション部位の解析をおこなうことで、それぞれの組織型が共通の起源細胞に由来するのか、もしくは異なる起源細胞にそれぞれ同時に発癌が生じたのか、を検討し子宮頸癌の発癌過程を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### <SCJオルガノイドを用いた検討>

#### (1)SCJオルガノイドの作製と遺伝子発現の解析

閉経前女性で子宮全摘術の適応があり、子宮頸部に異常のない症例の摘出子宮検体のSCJの一部を採取し、オルガノイド培養を行った。また、摘出子宮検体を薄切した病理組織スライドより、子宮頸部の扁平上皮基底層(SEBL)、表皮円柱上皮(ECE)、内腺部円柱上皮(IGCE)、SCJの4か所に分けて、それぞれマイクロダイセクション法でRNAを抽出した。同様にSCJオルガノイドからもRNA抽出を行い、それらの遺伝子発現の解析を行った。

#### (2)HPV18初期プロモーター評価のためのレンチウイルスベクター作製

HPV18の初期プロモーターであるLong control region (LCR)の下流にEGFPを組み込んだレンチウイルスベクターを作製することで、HPV18型の初期プロモーター・LCRが活性化したことが、発光強度で検出できる仕組みを構築した。この導入ベクターにはピューロマイシン耐性遺伝子も合わせて挿入した。

#### (3)レンチウイルスベクター導入SCJオルガノイドのsingle-cell RNA sequencing解析

作製したレンチウイルスベクターをSCJオルガノイドに導入した。導入後、フローサイトメトリーにより、GFP発光細胞、非発光細胞に分けてシングルセルソーティングを行い、抽出細胞のsingle-cell RNA sequencingを行った。ピューロマイシン耐性遺伝子の発現があるベクター導入が確認された細胞のうち、LCR活性化細胞、非活性化細胞の二群比較で、遺伝子発現を解析した。

#### (4)HPV18プロモーター活性化細胞で発現上昇した遺伝子の機能解析

HPV18型を導入したNIKS細胞というヒト上皮由来の細胞にsiRNAを用いて、LCR活性化細胞群で有意に発現が上昇した遺伝子を対象としたノックダウン実験を行い、その遺伝子機能解析を行った。

### <HPV18型混合癌についての検討>

#### (5)ヒトゲノム解析に基づくクローン解析

同一症例内に複数の組織型が混在する混合癌症例に対して全エクソームsequencingをおこない、

このデータを元にクローン解析をおこなった。非同義変異を有するクローンの頻度を PyClone を用いて解析し、さらに各クローンに関して系統発生的な関係性を LiChEe を用いて解析した。(6)微量 RNA sequencing 解析によるヒトおよび HPV 遺伝子解析  
各症例に含まれる組織型について RNA sequencing をおこない、ヒト・ウイルス融合 mRNA の検出、HPV18 および HPV16 遺伝子の同定をおこない、さらに検出された HPV 遺伝子については HPV18 および HPV16 の参照配列にマッピングをおこなった。

#### 4. 研究成果

##### <SCJ オルガノイドを用いた検討>

##### (1) SCJ オルガノイドの作製と遺伝子発現の解析

SCJ オルガノイド培養を行い(図 1)、マイクロダイセクション法による RNA 抽出を行った。子宮頸部の扁平上皮基底層(SEBL)、表皮円柱上皮(ECE)、内腺部円柱上皮(IGCE)、SCJ と比較したところ、SCJ のバイオマーカーとされる *MMP7*, *AGR2*, *GDA*, *CD63*, *KRT* の発現量は SCJ と同様の結果を得て(図 2)、SCJ オルガノイドが SCJ のプロファイルを保つことを証明した。

##### (2) HPV18 初期プロモーター評価のためのレンチウイルスベクター作製

HPV18 の LCR、*EGFP* およびピューロマイシン耐性遺伝子を持つレンチウイルスベクターを作製した。

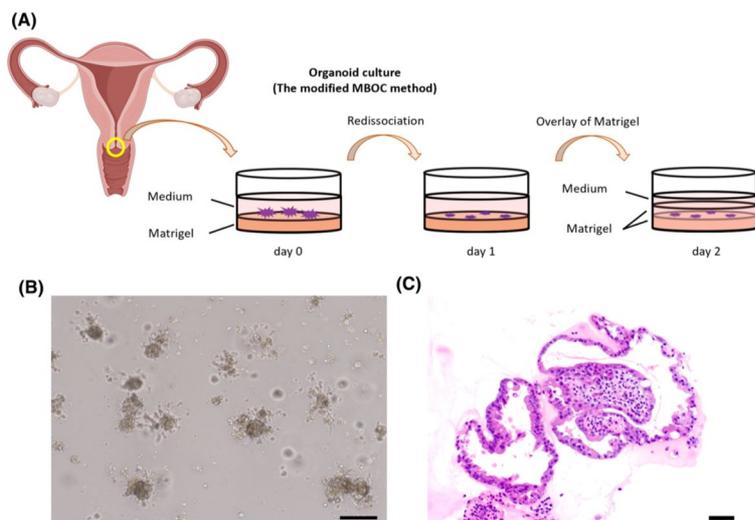


図 1 SCJ オルガノイドの培養

(A) SCJ オルガノイド作製の行程 (B) SCJ オルガノイド培養の鏡検像 (C)SCJ オルガノイドの HE 染色組織像

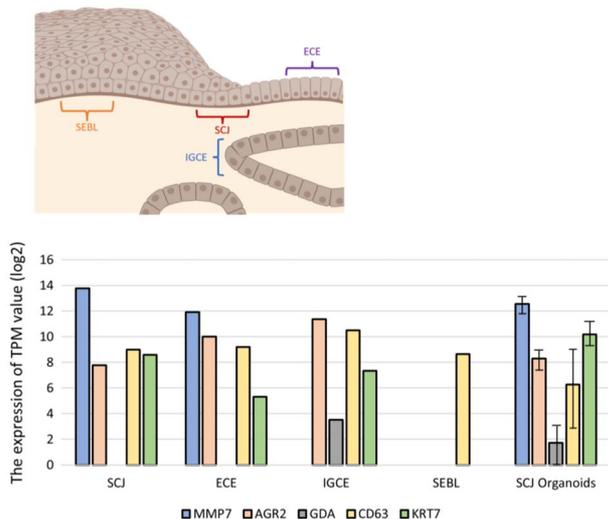


図 2 正常子宮頸部組織とのプロファイリング比較

##### (3) レンチウイルスベクター導入 SCJ オルガノイドの single-cell RNA sequencing 解析

上記のレンチウイルスベクターを SCJ オルガノイドへ導入した(図 3)。導入後にフローサイトメトリーによるシングルセルソーティングを行い(図 3)、GFP 発光細胞・非発光細胞を回収した。ピューロマイシン耐性遺伝子発現細胞のうち、21 個の GFP 発光細胞、7 個の GFP 非発光細胞について single-cell RNA sequencing を行い、GFP 発光細胞 (LCR 活性化細胞) では 169 遺伝子の有意な発現上昇を得られた(図 4)。

(4) HPV18 プロモーター活性化細胞で発現上昇した遺伝子の機能解析  
 上記で抽出した 169 遺伝子のうち、文献的にウイルス複製や細胞増殖などに関連する任意 39 遺伝子を絞りこみ、NIKS18 細胞株を用いた siRNA 実験を行った。そのうち、*NPM3* のノックダウンにより LCR の活性低下が認められ、さらに HPV18 のゲノム製剤も抑制することが確認された。

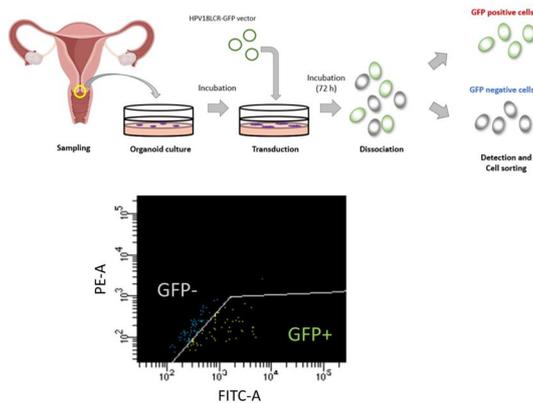


図 3 SCJ オルガノイドに対してのレンチウイルスベクター導入とシングルセルソーティング

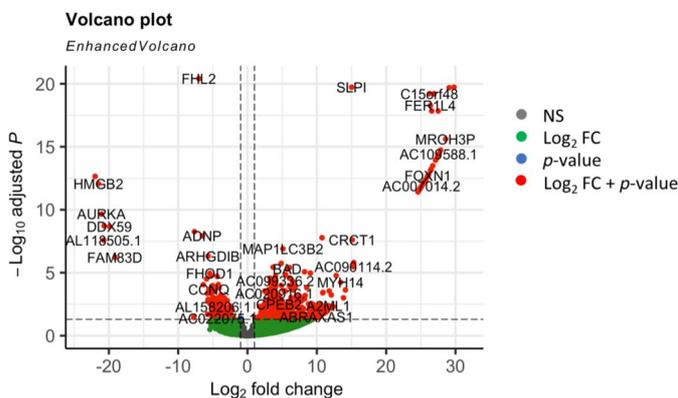


図 4 LCR 活性化細胞、非活性化細胞の変動遺伝子解析

< HPV18 型混合癌についての検討 >

(5) ヒトゲノム解析に基づくクローン解析

全エクソーム sequencing が可能であった 3 症例はいずれも HPV18 型陽性であった。症例 1 は扁平上皮癌と小細胞癌、症例 4 は小細胞癌と腺癌の、それぞれ混合癌であり、症例 2 については特に、組織学的には腺扁平上皮癌と低分化扁平上皮癌の衝突癌と診断されていた。これらについてクローン解析をおこなったところ 3 症例はいずれも、異なる組織型であっても共通の起源細胞を持つことがわかった(図 5)。この結果からは、複数の組織型への分化能をもった前駆細胞が子宮頸癌の癌化に関連していると推論された。

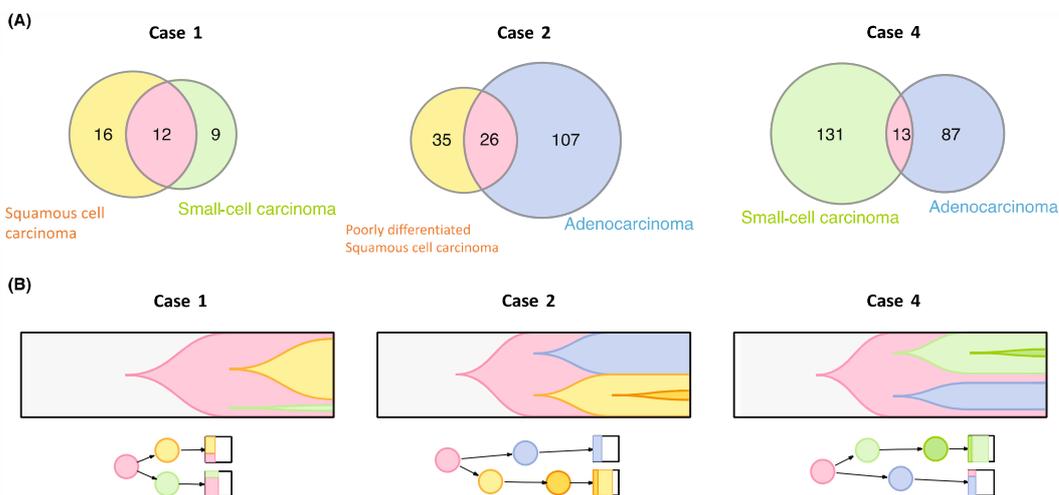


図 5 全エクソーム sequencing と系統発生的解析

(A) 各組織型の固有の、もしくは共通の非同義変異を示したベン図

(B) 各症例のコピー数変化および非同義変異に基づいてクローン毎に色分けした系統樹

## (6) 微量 RNA sequencing 解析によるヒトおよび HPV 遺伝子解析

HPV 由来のトランスクリプトームをマッピングしたところ、症例間では分布が異なっている一方で、同一症例内での異なる組織型の間では類似していた。症例 1 では HPV18 型のトランスクリプトームの途絶が共通の部位で途絶しており、症例 4 では 2 つの組織型に共通した接合部がみられた。HPV16 型陽性の症例 3 でも 2 つの組織型に共通したトランスクリプトームの途絶を認めた (図 6)。症例 1 と 4 では HPV インテグレーション部位の推定をおこなったが、これも同一症例内の異なる組織型で共通していた。この結果からは、発癌の過程の中で、各組織型に分化する前に HPV インテグレーションが生じていると考えられた。

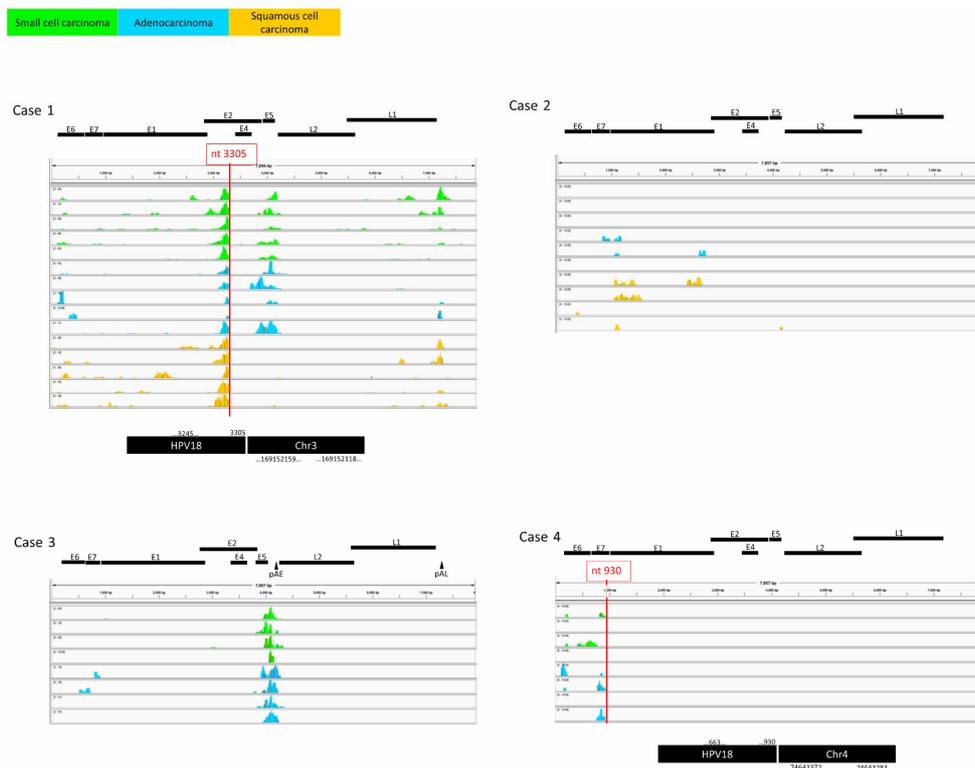


図 6 RNA sequencing の結果を HPV18 と HPV16 の参照配列にマッピングしたもの

### < 引用文献 >

- Doorbar J, Griffin H. Refining our understanding of cervical neoplasia and its cellular origins. *Papillomavirus Res.* 2019:176-179.
- Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer.* 2007:11-22.
- Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009:262-5.
- Maru Y, Kawata A, Taguchi A, Ishii Y, Baba S, Mori M, Nagamatsu T, Oda K, Kukimoto I, Osuga Y, Fujii T, Hippo Y. Establishment and Molecular Phenotyping of Organoids from the Squamocolumnar Junction Region of the Uterine Cervix. *Cancers (Basel).* 2020:694.
- Zhang M, Kiyono T, Aoki K, Goshima N, Kobayashi S, Hiranuma K, Shiraishi K, Saya H, Nakahara T. Development of an in vitro carcinogenesis model of human papillomavirus-induced cervical adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2022:904-915.
- Yoda T, Hosokawa M, Takahashi K, Sakanashi C, Takeyama H, Kambara H. Site-specific gene expression analysis using an automated tissue micro-dissection punching system. *Sci Rep.* 2017;7(1):4325.
- Roth A, Khattra J, Yap D, Wan A, Laks E, Biele J, Ha G, Aparicio S, Bouchard-Côté A, Shah SP. PyClone: statistical inference of clonal population structure in cancer. *Nat Methods.* 2014:396-8.
- Popic V, Salari R, Hajirasouliha I, Kashef-Haghighi D, West RB, Batzoglou S. Fast and scalable inference of multi-sample cancer lineages. *Genome Biol.* 2015:91.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kusakabe Misako, Taguchi Ayumi, Tanikawa Michihiro, Hoshi Daisuke, Tsuchimochi Saki, Qian Xi, Toyohara Yusuke, Kawata Akira, Wagatsuma Ryota, Yamaguchi Kohei, Yamamoto Yoko, Ikemura Masako, Sone Kenbun, Mori Uchino Mayuyo, Matsunaga Hiroko, Tsuruga Tetsushi, Nagamatsu Takeshi, Kukimoto Iwao, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Application of organoid culture from HPV18 positive small cell carcinoma of the uterine cervix for precision medicine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.5588	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 Kusakabe Misako, Taguchi Ayumi, Tanikawa Michihiro, Wagatsuma Ryota, Yamazaki Miki, Tsuchimochi Saki, Toyohara Yusuke, Kawata Akira, Baba Satoshi, Ueno Toshihide, Sone Kenbun, Mori Uchino Mayuyo, Ikemura Masako, Matsunaga Hiroko, Nagamatsu Takeshi, Wada Hiraike Osamu, Kawazu Masahito, Ushiku Tetsuo, et al.	4. 巻 114
2. 論文標題 Cells with stem like properties are associated with the development of HPV18 positive cervical cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 885 ~ 895
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15664	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 Toyohara Yusuke, Taguchi Ayumi, Ishii Yoshiyuki, Yoshimoto Daisuke, Yamazaki Miki, Matsunaga Hiroko, Nakatani Kazuma, Hoshi Daisuke, Tsuchimochi Saki, Kusakabe Misako, Baba Satoshi, Kawata Akira, Ikemura Masako, Tanikawa Michihiro, Sone Kenbun, Uchino Mori Mayuyo, Ushiku Tetsuo, Takeyama Haruko	4. 巻 115
2. 論文標題 Identification of target cells of human papillomavirus 18 using squamocolumnar junction organoids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 125 ~ 138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15988	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yusuke Toyohara, Ayumi Taguchi, Kenbun Sone, Saki Tsuchimochi, Saki Tanimoto, Misako Kusakabe, Michihiro Tanikawa, Mayuyo Mori-Uchino, Katsutoshi Oda, Kei Kawana, Yutaka Osuga
2. 発表標題 A novel approach using squamous-columnar junction organoids to elucidate the cells of origin of human papillomavirus 18-associated uterine cervical cancer,
3. 学会等名 第75回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 豊原佑典、田口歩、曾根献文、石井克幸、日下部美佐子、河田啓、馬場聡、川名敬、廣田泰、大須賀穰
2. 発表標題 SCJオルガノイドを用いたHPV18型関連子宮頸癌の起源細胞の解明
3. 学会等名 第40回日本産婦人科感染症学会学術集会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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