

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23659776

研究課題名(和文)正常と腫瘍性の子宮平滑筋幹細胞の単離と両者の比較解析：新規治療法の開発に向けて

研究課題名(英文)Comparative analysis of stem cells between normal and neoplastic myometric cells

研究代表者

佐野 健司(SANO, Kenji)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：50205994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：正常子宮平滑筋細胞(NM)と腫瘍性平滑筋細胞のうち、子宮平滑筋腫の細胞(LM)と子宮平滑筋肉腫(LMS)からのstem cell分画を多く含むと考えられるSP分画を分取して、以下の細胞種に対して比較遺伝子発現解析を行った。1.NMに対するLMの変化 2.NMに対するLMSの変化 3.LMに対するLMSの変化である。1ではER, PGR, SMA, calponinがわずかに低下した。2,3ではいずれもわずかに低下するものとしてER, PGR, SMA, calponin, MKI-67, Cyclin Eがわずかに上昇するものとしてGlut-1, HKIIが挙げられた。

研究成果の概要(英文)：Comparative expression analysis of stem cell-rich population was made between normal myometrium and myometrial tumors including uterus leiomyoma and leiomyosarcoma. Side population (SP) of leiomyosarcoma rich in stem cell demonstrated slightly high expression of Glut-1 and HKII, and low expression of ER, PGR, calponin, SMA, MKI-67, Cyclin E compared to the equivalent of normal myometrium and leiomyoma. SP of leiomyoma showed slightly low expression of ER, PGR, SMA, calponin compared to normal myometrium. And SP of leiomyosarcoma compared to non-SP showed high expression of ABCG and CD34. These results suggest SP cells of leiomyosarcoma include undifferentiated cell-rich population, and Glut-1 and HKII are possible markers for stem cells.

研究分野：分子病理学

キーワード：stem cell leiomyoma leiomyosarcoma Side Population(SP) non-SP

1. 研究開始当初の背景

子宮平滑筋腫は子宮に発生する腫瘍の中で最も頻度が高く、小さいものを含めると成人女性の20-40%近くに及ぶ。また、子宮平滑筋肉腫は頻度が低いながら一定の割合(0.13-0.39%)で発生しており、再発や転移、腫瘍死など個体の生命に重大な影響を及ぼしている。残念ながら、子宮平滑筋肉腫に対する治療法は完全には確立されていない。近年、様々な器官・組織に存在する固有の組織幹細胞が、それぞれの器官、組織の維持と再生を担っていることが明らかになってきた。(N.Eng.J. Med.,2003,349:570-582,PNAS,2007,104:18700-18705) さらに悪性腫瘍でも特異的な幹細胞マーカー(CD133, CD34, CD44)やABC transporter の色素選択性を利用したside-population が幹細胞の選択方法として広く活用されつつある。(Stem Cells, 2006, 24:3-12) 申請者らは、子宮平滑筋肉腫の発生が蛋白質分解酵素複合体(proteasome)の構成因子であるLMP2(low molecular protein 2)の欠損マウスで高率に発生することを報告した。(Cancer Res.,2002,62:24-27) また、人体例の子宮平滑筋肉腫でもLMP2 の著しい発現低下が生じており、この原因は、LMP2 の発現を調節しているinterferon-シグナル伝達経路の遺伝子異常であることを、複数の症例で証明している。(Oncogene,2006,25:4016-4026, Current Res.Immunol.,2009,In press, J.Medical Hypotheses and Research, 2008, 4:11-20, Gene Regulation and Systems Biol., 2008, 2:297-305, Current Res. Immunol., 2007, 7:23-46)この中で、LMP2 が平滑筋肉腫の発生に関与している可能性を示唆してきた。臓器によって幹細胞の発現形質は異なっており (Stem Cells,2006,24:3-12)、子宮平滑筋肉腫の幹細胞の特異抗原に関しても定説はない。正常子宮筋細胞のside population は、発現形質や組織再構築能など平滑筋幹細胞の性質を備えた細胞種に相当している。(PNAS, 2007,104:18700-18705) 良性腫瘍である子宮平滑筋腫はその起源において単一細胞由来であることが報告されており(Science,2005, 308: 1589-1592)、幹細胞に特徴的な低酸素環境で増殖することが示唆されている。(Nat. Rev.Cancer,2004,4:381-393, J.Clin. Endocrinol. Metab.,2002,87:1729-1736) 現在まで、

子宮平滑筋腫の幹細胞の単離とその解析は報告されていない。一方、悪性腫瘍:子宮平滑筋肉腫の幹細胞はその存在すら確定しておらず、無論、単離や解析も行われていない。

2. 研究の目的

正常子宮平滑筋細胞、良性腫瘍の子宮平滑筋腫、悪性腫瘍の子宮平滑筋肉腫の3種の幹細胞を単離して、網羅的なゲノム、mRNA レベルの遺伝子解析によりそれぞれの幹細胞特異的な発現分子を同定する。さらに、これら同定因子と子宮平滑筋腫瘍の発生に関連性のあるLMP2 の生物学的機能を幹細胞レベルで追求し、治療に向けた新規標的因子として検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)インフォームドコンセントを取って、倫理委員会の審査を受けた上、手術的に摘出された子宮組織から、正常平滑筋組織、平滑筋腫、平滑筋肉腫の組織を採取する。組織を細切し、酵素処理して細胞を分散させる。次にABCG2阻害剤であるVerapamilを入れて、Hoechst 33342 の染色が陽性化した分画がSP(side population) 分画に相当する。

(2) このSP 分画を採取して、培養して増殖させる。また、SP 以外の部分はnon-SP 分画として、同様に採取して培養し増殖させる。

(3) SP, non-SP 分画をさらに酵素ALDH の発現(注1)とLMP2 の発現有無を各種表面マーカー: CD133, CD34, CD44, ABCG2(BD Biosciences 社)と組み合わせることで、幹細胞様の性質をもった腫瘍幹細胞の単離をFACSにて分離検討する。表面マーカーの発現状況を指標に分離された各細胞群の性質について次のステップで検討する。各種分画より単離された腫瘍幹細胞をヒト間葉系幹細胞培養のための無血清培地により培養を行う。

(4)

estrogen receptor, progesterone receptor, 平滑筋細胞マーカー、カルボニン、スムーセリン、LMP2 などの発現を特異抗体や定量PCRによってSP, non-SP 分画で検討する。

低酸素環境での細胞増殖活性をSP と non-SP 分画で比較する。幹細胞は低酸素環境でより強い増殖能を示すことが知られている。

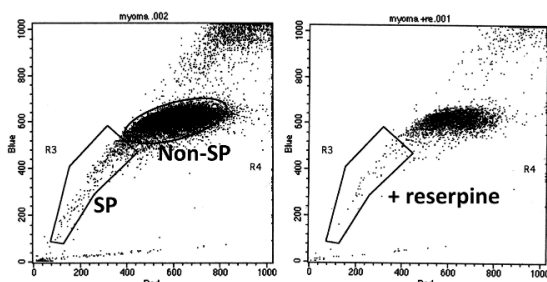
細胞周期の解析をヘキスト・ピロニンY 法

によって解析する。

4. 研究成果

(1) SP 分画と non-SP 分画の分取について
手術的に採取された子宮平滑筋腫組織 (leiomyoma=LM) と正常子宮平滑筋組織 (normal myometrium=NM)、及び子宮平滑筋肉腫組織 (leiomyosarcoma=LMS) からそれぞれおよそ1立方cmの組織片を以下の様な処理に回した。無菌的に、ハサミやメスを使用してできるだけ細かく裁断し、0.15 %collagenaseと1mg/mL、20ug/mL hyaluronidaseを入れたDMEM/F12消化溶液 20mL中、37 °C オーバーナイトで細胞外基質を消化した後、さらにトリプシン-EDTA液で単細胞化して、ヘキスト33342で37 °C、1.5時間染色した。細胞をフィルターに通して、BD FACS Aria IIIにて、SP(side population)分画とnon-SP分画を採取した。いずれも定型的なヘキスト33342非染色領域に少量認められ、一定の濃度のレゼルピンやベラパミルでその染色性が増して、SP分画が減少した。下図のようにreserpineでヘキスト33342に染色されない領域が減少した領域のSP分画と染色性は変化のないnon-SP分画をできる限り多く分取した。

(2) 低酸素環境下のSP分画とnon-SP分画の培



養

それぞれの分画の細胞をできる限り (10の5乗オーダー) 分取し、低酸素 (2%) と通常酸素環境 (20%) で培養し、増殖能を比較したところ、SP分画ではいずれも低酸素環境で有意な増殖能を示した。低酸素環境で増殖させたSP分画の細胞種を利用して以下の実験を行った。

(3) NM, LM, LMSの多分化能の検討

増殖させたそれぞれのSP分画の細胞を、20%酸素環境下で培養し、培地を脂肪分化誘導培地に変えたところ、3種類それぞれのSP分画細胞は、オイル・レッドO陽性細胞が認めら

れ、RT-PCRで、Lipoprotein lipase(LPL)や peroxisome-proliferating activated receptor γ (PPAR γ)の発現上昇が確認された。また、骨分化誘導内地に変えたところ骨芽細胞の指標となるアルカリ・フォスファターゼ活性が陽性となり、BSPやCOL-1などの遺伝子発現が上昇した。

(4) 細胞周期解析

組織幹細胞の特徴として、細胞周期の制止期G0にある細胞の割合が多いことが報告されている。ヘキスト・ピロニンYを用いた解析で、NM, LM, LMSいずれの細胞種でも、non-SPに比較してSPでは有意にG0成分の割合が多いことが明らかであった。平均で、NMでは85%と20%,LMでは90%と25%LMSでは95%と15%という差を示した。

(5) 3種類の子宮平滑筋に由来する組織のSP分画発現遺伝子比較解析

正常子宮平滑筋 (NM) に対する子宮平滑筋腫 (LM) の変化

低下 (軽度): ER, PGR, SMA, calponin

上昇: 明らかなものは同定されなかった。

正常子宮平滑筋(NM)に対する子宮平滑筋肉腫 (LMS) の変化

低下: ER, PGR, カルボニン, SMA,

HHF35, MKI-67, Cyclin E

上昇: Glut1(Glucose transporter 1),

HKII(Hexokinase II)

子宮平滑筋腫 (LM) に対する子宮平滑筋肉腫 (LMS)

低下: ER, PGR, カルボニン, SMA, HHF35,

MKI-67, Cyclin E

上昇: Glut1(Glucose transporter 1),

HKII(Hexokinase II)

子宮平滑筋肉腫 (LMS) の non-SP に対する SP の発現遺伝子比較解析

低下: ER, PGR, カルボニン, SMA, HHF35,

MKI-67

上昇: ABCG2, CD34

(6) 組織標本での蛋白発現解析

ER, PGR, Ki-67, Cyclin E, Calponin, SMA, HHF-35, Glut-1, HKIIについては、20例の正常子宮平滑筋、20例の子宮平滑筋腫、10例の子宮平滑筋肉腫の材料を免疫染色によって確認した。10例の子宮平滑筋肉腫では、ABCG2, CD34の免疫染色も行った。

結果として、概ね、遺伝子発現の結果に沿うものであった。正常平滑筋や子宮平滑筋腫は、

ERがよく保たれており、PGRは弱陽性、SMA、Calponin、HHF-35は強陽性となった。Ki-67はほぼ陰性。Cyclin EやGlut-1、HKIIも陰性であった。一方、子宮平滑筋肉腫は、逆にER、PGRは陰性で、SMA、Calponin、HHF-35も陰性から弱陽性のものが多かった。また、Ki-67は高ラベルされるものが多く、Cyclin Eも陽性細胞を多数認めた。さらにGlut-1、HKIIは全体に陽性となるものが多かった。ABCG2とCD34は、ABCG2では組織での陽性像は得られなかった。CD34は血管内皮細胞に陽性になったが、腫瘍細胞には明らかな陽性像は得られなかった。

(7)考察と今後の展望

正常子宮平滑筋細胞(NM)、子宮平滑筋筋腫細胞(LM)、子宮平滑筋肉腫細胞(LMS)には、ヘキスト33342の阻害法によるSP分画とnon-SP分画が区別され、いずれも量的には全体の1-2%と少ないが、幹細胞を示唆する細胞種が含まれている。

NM、LM、LMSいずれの組織のSP分画は、脂肪や骨への分化能が示唆され、多分化能を有しているものと考えられた。

また、NM、LM、LMSいずれの組織のSP分画は、G0細胞周期に入っているものが大部分と考えられた。

SP分画の細胞は低酸素環境で、non-SP分画よりも細胞増殖活性が強かった。

それぞれのSP分画の細胞の遺伝子比較発現解析では、NMとLM間では大きな差異がなかったが、わずかにLMでER、PGR、SMA、calponinの低下を示した。

NMとLMS、またはLMとLMSのSP分画の遺伝子比較発現解析では、LMSでER、PGRのホルモンレセプター発現やカルポニン、SMA、HHF35などの平滑筋分化マーカーの明らかな低下が認められ、より未分化な細胞群と考えられた。また、Ki-67やCyclinEの発現も低下してG0の分画割合が多いためと考えられた。Glut-1、HKIIの発現やや昂進しており、平滑筋腫瘍の未分化SP分画の特異的なマーカーの可能性があると考えられた。

LMSのSP特異的なマーカーの可能性のあるABCG2やCD34はSPとnon-SPの発現解析では有意な差がみられたが、組織上では同定することはできなかった。

<引用文献> Ono M, Maruyama T, Masuda H,

Kajitani T, Nagashima T, Arase T, Ito M, Ohta K, Uchida H, Asada H, Yoshimura Y, Okano H, Matsuzaki Y. Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Nov 20;104(47):18700-5.

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 25 件)

Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Ichimura T, Ishiko O, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Konishi I. Somatic mutations in Interferon- γ signal molecules in human uterine leiomyosarcoma. International Journal of Medical Science And Clinical Inventions. 2015. 2(4), 846-850. (査読有り)
Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Ichimura T, Hiraoka N, Sudo T, Nishimura R, Ishiko O, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Shiozawa T, Tonegawa S, Konishi I. Molecular approach of tumorigenesis of human uterine leiomyosarcoma: Structure modeling of JAK1 molecule with somatic mutation. Jokull Journal 2015, 65(3), 1-21. (査読有り)

Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Ichimura T, Ishiko O, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Konishi I. Detection of somatic mutations in Interferon- γ signal molecules in human uterine leiomyosarcoma. Int'l J of Biological and Pharmaceutical Research 2015. 6(1) Accepted November 07, 2014. (査読有り)
Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Ichimura T, Ishiko O, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Konishi I. The detection of somatic mutations in Interferon- γ signal molecules in human uterine leiomyosarcoma. Sarcoma Research - International 2014. 1(2) 1-4. (査読有り)
Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kasai M, Ichimura T, Nagase S, Ishiko O, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Shiozawa T, Tonegawa S, Konishi I. Molecular approach of leiomyosarcoma: critical function of LMP2 in our understanding of the pathobiology. Current Research in Cancer 2014, Accepted July 28. (査読有り)

Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Ichimura T, Ishiko O, Kanai Y, Yaegashi N, Shiozawa T, Aburatani H, Ikuo, Konishi I. The identification of somatic mutations in

Interferon- γ signaling molecules in human uterine leiomyosarcoma. *Jokull Journal* 2014; 64(10) 1-20. (査読有り)

Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Ichimura T, Ishiko O, Kanai Y, Yaegashi N, Shiozawa T, Aburatani H, Tonegawa S, and Konishi I. A diagnostic biomarker: differential expression of LMP2/bli in human uterine neoplasms. *Journal of Clinical & Experimental Oncology* 2014;3(3):1-3. <http://dx.doi.org/10.4172/2324-9110.1000128> (査読有り)

Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Ichimura T, Sudo T, Ishiko O, Yaegashi N, Aburatani H, Konishi I. Potential diagnostic biomarkers: LMP2/β1i and Cyclin B1 differential expression in human uterine mesenchymal tumors. *TUMORI* 2014; 100: 509-516. (査読有り)

Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Gur G, Aburatani H, Ishiko O, Yaegashi N, Shiozawa T, Kanai Y, Zharhary D, Tonegawa S, Konishi I. Proteasome Subunit LMP2/β1i As a Biomarker for Human Uterine Mesenchymal Tumors. *J Oncobiomarkers* 2013, 1(2), 1-6. (査読有り)

Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Ichimura T, Ishiko O, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Shiozawa T, Tonegawa S, Konishi I. Association of proteasome subunit LMP2/β1i with the development of human uterine mesenchymal tumors. *Current Res. Cancer.* 2013, 7, 39-50.. (査読有り)

[学会発表](計4件)

佐野健司、大島康裕、重藤翔平、末木 茜、松田和之、上原 剛、浅香志穂、大月 聡、神宮俊彦、的場久典 (Genetic analysis for Nodular fasciitis) 第104回日本病理学会、2015.4.30, 名古屋

佐野健司、高橋千明、立石文子、神宮俊彦、大月 聡、浅香志穂、上原 剛、吉澤明彦 (隆起性皮膚線維肉腫の遺伝子診断の有用性について) 第103回日本病理学会、2014.4.24, 広島

佐野 健司、的場 久典、岩谷 舞、吉澤明彦、末木 茜、松田 和之、小林 辰也、酒井 康弘、中村 智次 (解剖学的unusualな部位に発生したEwing sarcomaの2例) 第102回日本病理学会、2013.6.6, 札幌

佐野健司、岩谷 舞、下条久志、浅香志穂、的場久典、神宮邦彦、吉澤明彦、本田孝行 (Thrombotic microangiopathy and coagulopathyによる3剖検例の血管病変の比

較検討)第101回日本病理学会、2012.4.26, 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐野 健司 (SANO, Kenji)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号: 50205994

(2)研究分担者

林 琢磨 (HAYASHI, Takuma)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号: 60359726

(3)連携研究者

小西 郁生 (KONISHI, Ikuo)

京都大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号: 90192062

塩沢 丹里 (SHIOZAWA, Tanri)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号: 20235493

堀内 晶子 (HORIUCHI, Akiko)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号: 80334895

(平成24年度まで)