

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592502

研究課題名(和文)ポリコーム複合体による卵巣癌幹細胞のエピジェネティックな遺伝子制御機構の解明

研究課題名(英文)The role of epigenetic effector polycomb group gene in ovarian cancers

研究代表者

須藤 毅 (SUDO, Takeshi)

山形大学・医学部・医員

研究者番号：70466605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々はstem cell culture法で卵巣癌幹細胞(CSLC: cancer stem-like cell)を樹立し、ポリコーム複合体の発現をCSLCで検討したがparental A2780細胞とCSLCに発現の差は認めなかった。また抗がん薬に対する抵抗性も認めなかった。ハニカム膜は、様々な生体親和素材から合成可能できる均一な多孔性膜であり、幹細胞の性質を保持したまま細胞を増殖させることができる。PU (polyurethane)で作成したハニカム膜上で卵巣癌細胞株を培養したところ増殖抑制を認め、卵巣癌を休眠状態にし、幹細胞の性質を持ち得る可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We identified cancer stem-like cells (CSLC) in human ovarian cancer cell line A2780 by stem cell culture methods. The expression of polycomb group (PcG), which are epigenetic effector, showed no difference between parental A2780 and CSLC. Although cancer stem cells show the resistance to chemotherapeutic agent, A2780 CSLC did not have the ability of cisplatin resistance. Honeycomb films (3D porous scaffold) fabricated from various biodegradable polymers can amplify the cancer stem cells. Honeycomb-patterned polyurethane films inhibited cell proliferation compared with control tissue culture dish in ovarian cancer cells, suggesting that honeycomb films have the possibility of inducing cancer cell to cancer stem cell.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣癌 癌幹細胞 ポリコーム複合体 薬剤感受性 ハニカム膜

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 癌幹細胞は癌を形成する細胞の数%以下の比率であると言われ、様々な抗がん薬や放射線療法にも抵抗性を示し、癌再発の原因となる細胞であると報告されている(Nature 2006)。癌幹細胞の治療抵抗性は、癌幹細胞が抗がん薬排出能力、中和能力、DNA 修復能力を有していること、また特別な微小環境(ニッチ)内で休眠状態として存在するため、増殖する細胞を標的とする従来の癌治療には効果がないためと考えられる。近年、卵巣癌においても癌幹細胞の存在が報告され注目されている(PNAS 2006)。

ポリコム複合体(PcG)は、メチル化されたヒストンタンパク質に結合し、DNA のヒストンタンパク質への巻きつきを強固にすることで、数百にのぼる遺伝子の転写を抑制する。PcG により制御をうける遺伝子の多くが、細胞の分化に関するものである。そのため癌幹細胞では PcG により、細胞の分化が抑制されることで多分化能を獲得し、恒常性が維持されることで自己複製を行うと考えられている(Cell Death Dis 2011)。さらに PcG は薬剤感受性にも関連があるとの報告がある(PloS One 2011)。ヒストン修飾、DNA のメチル化、ヌクレオソームリモデリング、マイクロ RNA はエピジェネティックな遺伝子制御と言われ、がんの発生に深く関わっているが(Cell 2007)、卵巣癌幹細胞におけるエピジェネティックな制御機構は未だ十分に解明されていない。そこでこれを解明することは卵巣癌の発症を抑制し、卵巣癌幹細胞の抗がん薬抵抗性という問題を解決できる可能性がある。

(2) 研究当初は、ヒト卵巣癌幹細胞の樹立は卵巣癌細胞を stem cell culture medium (Cancer Res 2008)を用いて培養することで樹立する予定であった。現在我々はハニカム膜(honey-comb film)を用いて卵巣癌幹細胞の樹立が可能であるか検討している。ハニカム膜とは、均一な多孔性膜であり、様々な生体親和性素材から合成することが可能である(Hollister SJ, et al. Nat. Mater 2005)。ハニカム膜は、3D porous scaffold とも言われ、細胞が接着、増殖していく上での足場となり、さらに孔径を変えることで神経幹細胞が、神経細胞に分化すること、または幹細胞の性質を保持したまま増殖することが報告されている(Tanaka M, et al. J. Nanosci. Nanotech 2007)。このハニカム膜の機能を応用し、卵巣癌幹細胞の樹立が可能ではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

(1) stem cell culture 法によって樹立した卵巣癌幹細胞におけるポリコム複合体の発現を検討する。

(2) 上記で樹立した卵巣癌幹細胞における

薬剤感受性を検討する。

(3) ハニカム膜によって卵巣癌細胞株の増殖が抑制されるか、否か。またハニカム膜によって癌幹細胞の樹立が可能か検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 卵巣癌幹細胞の樹立：卵巣癌細胞株 A2780 を non-coated dish で stem cell culture medium を用いて培養し、sphere を形成させた。Sphere 形成細胞を monolayer stem cell culture condition で培養し、増殖させた。Sphere 形成細胞をマウスの皮下に接種し、腫瘍形成後、摘出腫瘍を再度 stem cell culture medium と monolayer stem cell culture condition で培養し cancer stem-like cell (CSLC)とした。A2780 細胞から樹立した CSLC を A2780 sc とした。また parental A2780 細胞をマウスの皮下に接種し、形成した腫瘍を摘出後、再度腫瘍の形成を認めた。再発腫瘍を摘出後、同様に stem cell culture と monolayer stem cell culture condition で培養を行い、CSLC を樹立し、A2780 sc rec とした。

(2) 幹細胞マーカーの発現：上記(1)の方法で樹立した CSLC における幹細胞マーカー(Nanog, SOX2, Oct4)の発現を western blotting 法で検討し、parental A2780 細胞との発現パターンの違いを比較した。

(3) CSLC における PcG の発現：上記(1)の方法で樹立した CSLC における PcG (Bmi-1, EZH2) の発現を western blotting 法で検討し、parental A2780 細胞との発現パターンの違いを比較した。

(4) CSLC における薬剤感受性：上記(1)の方法で樹立した 2 種類の CSLC 細胞と parental A2780 細胞に、シスプラチン(CDDP)を 0, 0.1, 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{M}$  で投与し、cell viability を MTS assay 法で検討し、 $\text{IC}_{50}$  を算出した。

(5) ヒト卵巣癌細胞株におけるハニカム膜の増殖抑制効果の検討：3 種類の卵巣癌細胞株(SKOV3, TOV21G, A2780)を用いる。12 well plate の組織培養プレート(TC; tissue culture)とプレート上にコントロール膜(平膜)またはさまざまな孔径のハニカム膜(ロットナンバーで管理)を貼付し、各細胞( $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>)をまく。FBS(+)の細胞培養液内で 48 時間培養後、DAPI 核染色を行い、蛍光顕微鏡 100 倍率でランダムに 5 視野をとり、細胞数をカウントする。組織培養プレート、コントロール膜上で培養した細胞数とハニカム膜上で培養した細胞数を比較し、増殖抑制効果を検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 卵巣癌幹細胞の樹立

Parental A2780 細胞と Stem cell culture 法で樹立した A2780 sc、A2780 sc rec の細胞形態を光学顕微鏡で観察した (図 1)。

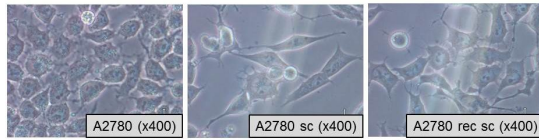


図 1. Cancer stem-like cell の形態

##### (2) 幹細胞マーカーの発現

上記 (1) で樹立した卵巣癌幹細胞における幹細胞マーカーの発現を western blotting 法で検討した (図 2)。A2780 sc、A2780 sc rec では A2780 細胞と比較して幹細胞マーカーである SOX2 の発現亢進を認めた。

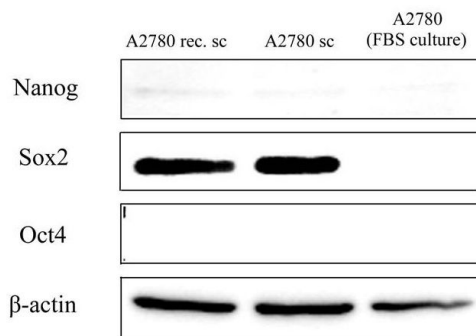


図 2. 幹細胞マーカーの発現

##### (3) 卵巣癌幹細胞におけるポリコーム複合体 (PcG) の発現

上記 (1) で樹立した卵巣癌幹細胞における PcG の発現を western blotting 法で検討した (図 3)。A2780 細胞と比較して A2780 sc、A2780 sc rec では Bmi-1、EZH2 の発現に差を認めなかった。

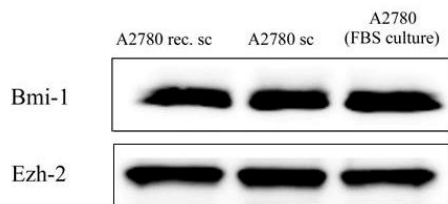


図 3. PcG の発現

##### (4) 卵巣癌幹細胞における薬剤感受性

上記 (1) で樹立した 2 種類の卵巣癌幹細胞と parental A2780 細胞に、シスプラチン (CDDP) を投与し、cell viability を MTS assay 法で検討した (図 4)。A2780 細胞と A2780 sc の CDDP に対する感受性は同等であり、A2780 sc rec では A2780 と比較して CDDP の感受性が增強していた。A2780、A2780 sc、A2780 sc rec の IC<sub>50</sub> は、それぞれ 25.6、26.1、15.8 μM であった。

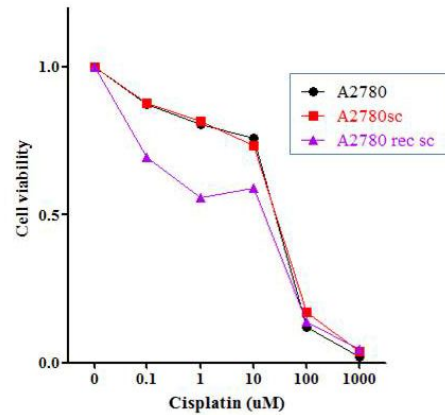
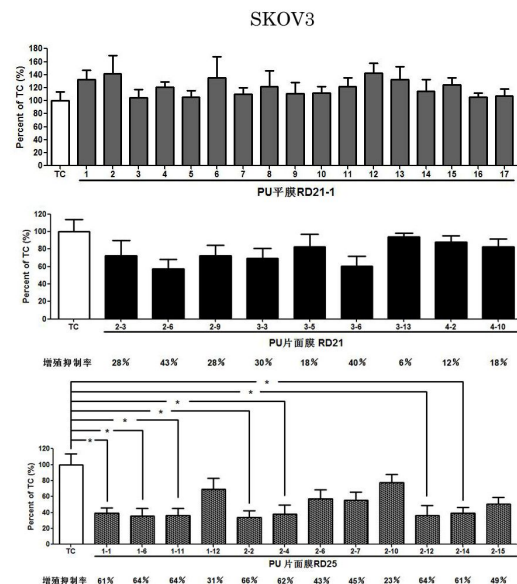


図 4. CDDP に対する感受性

##### (5) ヒト卵巣癌細胞株における八ニカム膜の増殖抑制効果

3 種類の卵巣癌細胞株 (SKOV3, TOV21G, A2780) における八ニカム膜による増殖抑制効果を検討した (図 5)。耐熱性・伸縮性に優れた PU (polyurethane) を用いて平膜 17 枚と様々な孔径の八ニカム膜を 21 枚作成し、実験を行った。SKOV3 は平膜では組織培養プレート (TC; tissue culture) に比較して増殖抑制を認めなかったが、21 枚中 8 枚の八ニカム膜で TC に比較して約 60% 増殖抑制率を示した。TOV21G では平膜 17 枚中 2 枚の膜で増殖抑制を認めた。八ニカム膜 21 枚中 20 枚で 46-86% の増殖抑制率を示した。A2780 では平膜 17 枚中 3 枚の膜で 71-82% の増殖抑制率を示し、八ニカム膜 21 枚中 12 枚の膜で 69-90% の増殖抑制率を示した。



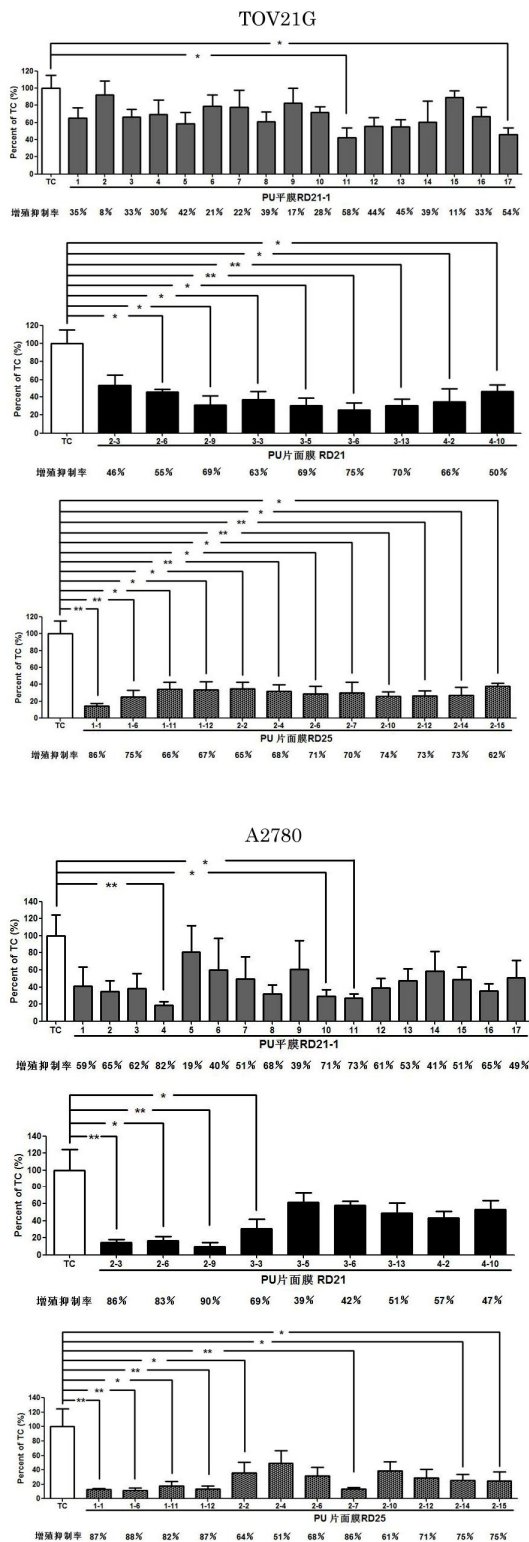


図5. ハニカム膜による卵巢癌細胞の増殖抑制効果

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 4 件)

Seino M, Okada M, Shibuya K, Seino S, Suzuki S, Takeda H, Ohta T, Kurachi H, Kitanaka C. Differential

contribution of ROS to resveratrol-induced cell death and loss of self-renewal capacity of ovarian cancer stem cells.

Anticancer Res. 2015 Jan;35(1):85-96. <http://ar.iiarjournals.org/content/35/1/85.long> (査読有)

Yamanouchi K, Ohta T, Liu Z, Oji Y, Sugiyama H, Shridhar V, Matsumura S, Takahashi T, Takahashi K, Kurachi H. The Wilms' Tumor Gene WT1 - 17AA/- KTS Splice Variant Increases Tumorigenic Activity Through Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor in an In Vivo Ovarian Cancer Model. Transl Oncol. 2014 Oct 24;7(5):580-9.

DOI:10.1016/j.tranon.2014.07.008 (査読有)

Seino M, Okada M, Shibuya K, Seino S, Suzuki S, Ohta T, Kurachi H, Kitanaka C. Requirement of JNK signaling for self-renewal and tumor-initiating capacity of ovarian cancer stem cells. Anticancer Res. 2014 Sep;34(9):4723-31.

<http://ar.iiarjournals.org/content/34/9/4723.long> (査読有)

Liu Z, Yamanouchi K, Ohta T, Matsumura S, Seino M, Shridhar V, Takahashi T, Takahashi K, Kurachi H. High levels of Wilms' tumor 1(WT1) expression were associated with aggressive clinical features in ovarian cancer. Anticancer Res 2014 May;34(5):2331-2340

<http://ar.iiarjournals.org/content/34/5/2331.long> (査読有)

[学会発表](計 2 件)

太田 剛, 長谷川歩美, 須藤 毅, 清野 学, 山内敬子, 松村創平, 倉智博久. 子宮頸部神経内分泌癌6例の検討. 第66回日本産科婦人科学会 東京国際フォーラム(東京) 2014.4.18-20

Takahashi T, Seino M, Ohta T, Sudo T, Ishida H, Kurachi H. Evaluation of preventive methods for the symptomatic pulmonary thromboembolism by postoperative anticoagulant therapy in VTE high risk patients with gynecologic malignancy. 第65回日本産科婦人科学会 ホテル札幌芸文館(札幌市) 2013.5.10-12 (IS Poster)

〔図書〕(計 1 件)

竹原 功, 太田 剛, 倉智 博久. [子宮体がん  
診療アップデート] 診断のトピックス 子宮  
体がん発症のリスク因子. 臨床婦人科産科  
医学書院, 2013;67(5):440-446

〔その他〕

ホームページ等

<http://yamagata-obgy.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

須藤 毅 (SUDO, Takeshi)

山形大学・医学部・医員

研究者番号: 70466605

### (2) 研究分担者

高橋 俊文 (TAKAHASHI, Toshifumi)

山形大学・医学部・講師

研究者番号: 20302292

倉智 博久 (KURACHI, Hirohisa)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号: 40153366

太田 剛 (OHTA, Tsuyoshi)

山形大学・医学部・助教

研究者番号: 50375341