

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830095

研究課題名(和文)子宮頸部腺癌のin vitro多段階発がんモデルの構築

研究課題名(英文)An in vitro multistep carcinogenesis model for Human uterine cervical adenocarcinoma

研究代表者

木川 聖美(Kikawa, Satomi)

独立行政法人国立がん研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：30547625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸癌の大部分を占める扁平上皮癌と腺癌、各々の発癌モデルを構築し、その母細胞や分子生物学的発症機構の相違を解明することを目標とした。まず、子宮頸癌の発症母地とされる扁平円柱上皮境界細胞の候補を、臨床検体から分離培養した。文献に基づいて分子マーカーを解析し、最も近い特徴を持っていた細胞株に4つのがん遺伝子を導入し、マウスに皮下移植して形成される腫瘍を解析した。腫瘍は導入した四遺伝子の発現に依存して形成、退縮した。腫瘍組織の免疫組織学的解析では、腫瘍は重層扁平上皮を模倣した構造をなし、細胞はほぼ全てが扁平上皮の特徴を呈した。またp63をノックダウンすると粘膜下層への浸潤能が増す傾向を認めた。

研究成果の概要(英文)：We sought to establish the Uterine Cervical carcinogenesis model, both SCC and adenocarcinoma to elucidate the difference of origin cell or biological molecular mechanism. We first isolated and cultured the candidate of Squamo-Columnar-Junction (SCJ) cells which are thought to be the origin of cervical cancer from Human cervical Keratinocytes (HCK) of independent donors, then transduced certain oncogenes into the cell line that expressed molecular marker of SCJ cell reported by Herfs most similarly. Progression and regression of Subcutaneous Xenograft tumors in an immune-deficient mouse depended on the expression of transduced oncogenes. Those tumors composed stratified squamous epithelial and almost all of the cells were squamous epithelial cells immuno-histologically. Knockdown of p63KD resulted in the increase of invasive capacity into the submucosal layer by 3D-culture.

研究分野：婦人科腫瘍

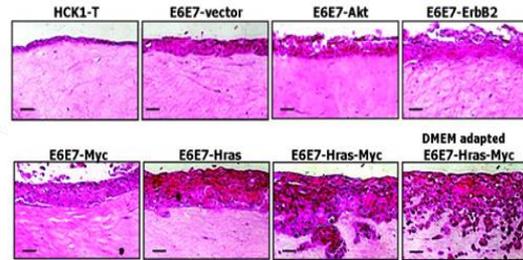
キーワード：子宮頸がん SCJ 発がんモデル 子宮頸部腺がん

1. 研究開始当初の背景

90%以上の子宮頸癌は、16型と18型を始めとするハイリスク型 HPV(hrHPV)の感染により引き起こされる。そのうち子宮頸部腺癌は、この数十年の間に急増して頸癌の20~25%を占めるに至った。前癌病変段階では発見されづらいこと、早期から浸潤・転移しやすいことに加え、治療抵抗性であり再発率が高いなどの特徴から、扁平上皮癌に比して予後は不良である。腺癌では扁平上皮癌に比して18型との関連が強い。その発がん過程や高い悪性度をもたらす分子生物学的背景には未解明な部分が多い。子宮頸部は発生学的に膣上部1/3および子宮体部と共に中胚葉由来のミュラー管より形成され、外胚葉由来の膣下部2/3とつながる。解剖学的には膣部重層扁平上皮と子宮内膜単層円柱上皮の間に位置し両組織の境界部は squamocolumnar junction (SCJ) と呼ばれる。SCJにはその解剖学的特徴より扁平上皮細胞と円柱上皮細胞の双方向に分化しうる予備細胞の存在が1960年代より推定されていた。近年、免疫組織学的解析や遺伝子発現プロファイルによりSCJに存在する細胞の性状が解明されつつある¹⁻³⁾。その結果、予備細胞にも2つの細胞集団が存在すること、SCJには胎生期の子宮頸部上皮と性質を同じくする細胞集団があることが明らかになってきた。hrHPVが感染する頸がんの母細胞はSCJのS側にある重層扁平上皮化生を起こした Transformation zone (TZ)の基底細胞であると一般に信じられてきたが、Herfsらの報告³⁾はSCJ特異的な単層円柱上皮であることを示唆している。またHPV陽性癌の多い肛門癌や中咽頭癌も発生学的、解剖学的に子宮頸部と共通性があり興味深い。

申請者の所属する研究室では、ヒト正常子宮頸部角化細胞 (Human cervical keratinocyte, HCK)に16型HPV由来E6E7

遺伝子を導入すると子宮頸部異形成病変が再現され、さらに活性化HRAS遺伝子、MYC遺伝子を導入すると、強い造腫瘍能が付加されることを3次元培養法により示した⁴⁾ (図1)



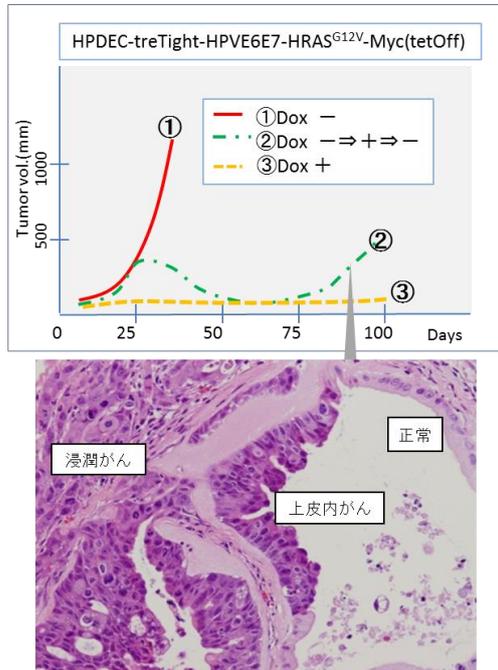
(図1) HPV16E6E7、及び各種がん遺伝子を導入したHCK1Tを用いた3次元培養による

一方、当研究室では、ROCK阻害剤を用いた培養条件下で⁵⁾、臨床検体から正常腭管上皮細胞の単離と不死化遺伝子導入により世界で初めてとなる正常2倍体ヒト腭管上皮細胞株 (HPDEC)の樹立に成功している。また、E6, E7, 活性型RAS, c-MYCの4因子 (EMR)を、TetOffシステムにより発現制御の可能なレンチウイルスベクターを用いて、ヒト正常腭管上皮細胞 (HPDEC)に導入した細胞をマウス皮下に移植すると1ヶ月以内に腺癌腫瘍病変を形成すること、Doxycycline (Dox)の投与により導入遺伝子の発現を止めると腫瘍病変は退縮して正常腭管様組織を呈し、再発現させると上皮内癌を経て浸潤癌へ進行する過程を示す像を得た。こうして、腺上皮細胞を用いた多段階発がん過程の一部を *in vivo*で再現することに成功している⁶⁾ (図2)。

細胞の分化誘導に関しては、当研究室よりΔNp63がNOTCH1の発現抑制を介して扁平上皮がんの分化を抑制してがん遺伝子として機能していることを報告した⁷⁾。一方、肺がんにおいてはΔNp63陽性の細気管支基底細胞から導入遺伝子の違いによって扁平上皮癌と腺癌が形成されることが報告されている⁸⁾。ΔNp63は重層扁平上皮組織形成に必須の因子であり扁平上皮がんのマーカー

として広く使われている。

(図2) HPV16E6E7、及び各種がん遺伝子を導入したHPDECを用いた多段階発がん過程



2. 研究の目的

子宮頸がんは扁平上皮癌と腺癌に大別されるが、近年腺癌が急増し約1/4を占めるようになった。子宮頸部腺癌の母細胞や発症機構については不明な点が多く、発癌マウスモデルも未だない。本研究では、子宮頸部腺癌に焦点を絞り、その *in vitro* 多段階発がんモデルの構築を試みる。さらに扁平上皮癌と母細胞や分子生物学的発症機構の相違を解明することを目標とした。

(1) 子宮頸がんの発生母地と考えられている細胞の分離・培養法の確立

(2) SCJにおける発がん機構の解明

(3) 腺癌の前がん病変から浸潤がん にいたる *in vitro* 多段階発がんモデルの作製

3. 研究の方法

(1) 子宮頸がんの発生母地と考えられている SCJ より母細胞候補の分離・培養法の確立 ①SCJ に少量存在する単層円柱上皮細胞 (CD63, CK7, GDA, MMP7, AGR2 陽性)³⁾、SCJ から endocervix にかけてより広い範囲に存在する予備細胞 (Δ Np63, CK5, CK7 強陽

性, BCL2 陽性, CK17 弱陽性~強陽性)⁴⁾ を、その解剖学的位置を指標に分離し、Feeder 細胞上で ROCK 阻害剤を添加した培養条件⁵⁾ を用いて培養する。②単コロニー法や FACS を用いて単離し、必要に応じて、不死化遺伝子 (CDK4, CCND1, TERT) や、CK7 プロモーター、CK5 プロモーターなどの制御下に不死化遺伝子を発現させて目的細胞の選択的延命・不死化を図る。③得られたそれぞれの細胞株を用いて、3次元培養法により、正常に近い扁平上皮や腺上皮が形成されるかどうかを確認する。

(2) SCJにおける発がん機構の解明

① (1) で得られた各細胞集団に、EMR を tetOff システムにより導入し Δ Np63 を始め上記マーカーの発現を確認すると共に、免疫不全マウス皮下移植により形成される腫瘍の組織型 (腺癌または扁平上皮癌) について解析する。

② 腫瘍形成後に EMR4 因子の発現を制御することにより腫瘍が退縮、再形成されるのか、4 因子の発現による腫瘍原生を確認し、その組織型を解析する。

(3) 腺癌の前がん病変から浸潤がん にいたる *in vitro* 多段階発がんモデルの作製 (2) で腺癌を形成した細胞集団を中心に HPV18 の E6, E7 や異なる組み合わせのがん遺伝子導入によって癌腫の組織型が変化するかどうか、腺がんが形成されるのかを確認する。3次元培養法及び免疫不全マウスの皮下移植により上皮内病変 (AIS) から浸潤腺癌への過程の再現を試みる。

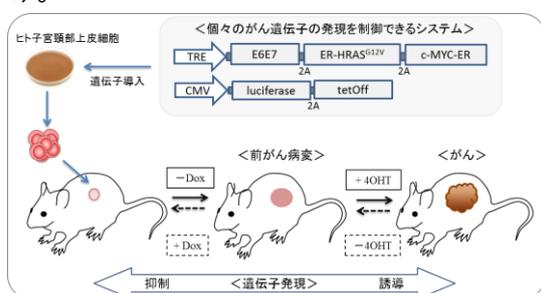
(4) HPV16 型 E6E7、HPV18 型 E6E7 から形成される細胞組織の相違の解析

16 型と 18 型は共通して子宮頸癌の発がんに関与するが、統計的に扁平上皮癌は 16 型と、腺癌は 18 型とそれぞれ関連が強いとされている。これに基づき、予備細胞の候補細胞に、HPV16-EMR または HPV18-EMR を導入した細胞の Δ Np63 発現

の相違や、各細胞を用いた3次元培養あるいはXenograftで形成される癌腫の組織型の相違について検証する。

(5) がん遺伝子の組み合わせと異時性発現による多段階発がん過程の解析

tetOffシステムによる発現誘導や、エストロゲン受容体リガンド結合ドメインとの融合タンパクによるタンパク活性化システムを組み合わせ、Doxやタモキシフェン(4OHT)により導入するがん遺伝子の発現を個々に制御できるシステムを構築する(図3)。



(図3) 発現制御可能な遺伝子導入ヒト子宮頸部上皮細胞を用いたXenograftによる免疫不全マウスにおける多段階発がんモデル

① 3次元培養において正常組織像を形成させた後、EGE7の発現を誘導し、前がん病変(CINまたはAIS)の組織像の再現を、さらにER-RAS^{G12V}とc-MYC-ERを活性化させることで前がん病変から浸潤癌に至る過程の再現を試みる。② ①の多段階発がんの過程をヌードマウスの皮下移植において再現することを試みる。さらに、各遺伝子の発現を制御し、正常から前がん病変、浸潤がんに至る過程を双方向に再現することを試みる。(図3)

(6) ΔNp63による腺上皮の重層扁平上皮への分化に関する検証

マウス肺胞上皮細胞でのΔNp63の異所性発現は単層上皮の重層扁平上皮化を誘導することが報告されている。腺癌の母細胞あるいは作製した腺癌細胞にΔNp63を強制発現させることで重層扁平上皮化(角化)や扁平上皮癌への転換・分化が見られるかを

調べる。

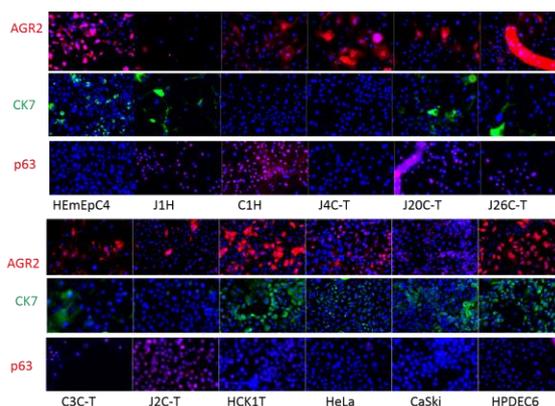
4. 研究成果

(1) 子宮頸がんの発生源地と考えられているSCJより母細胞候補の分離・培養法の確立

① 臨床検体を用いてSCJ領域から予備細胞の候補として扁平上皮(S)側、円柱上皮(C)側、SCJ領域それぞれから分離培養を試みた。S領域からは角化傾向が強く長期培養できる株は樹立できなかったが、SCJ領域、C領域からは長期培養可能な細胞株とクローンが多数得られた。Herfsらの報告³⁾をもとにSCJ細胞の特異的マーカーとされるCD63、AGR2、CK7、および扁平上皮細胞のマーカーであるp63、CA14などの発現を免疫染色やWestern blottingによって解析したところ、CK7+/AGR2+/p63-のクローンは得られなかったことがわかった。

② 併せて、以前に複数の臨床検体から分離培養し、TERT遺伝子の導入などにより不死化した子宮頸部上皮細胞株(Human Cervical Keratinocyte with TERT; HCKT)それぞれについて、同様にSCJ細胞特異的マーカーを解析したところ、HCK1TがAGR+/CK7+/p63^{low}であり、最も”SCJ細胞”に近い結果を示した。(図4)

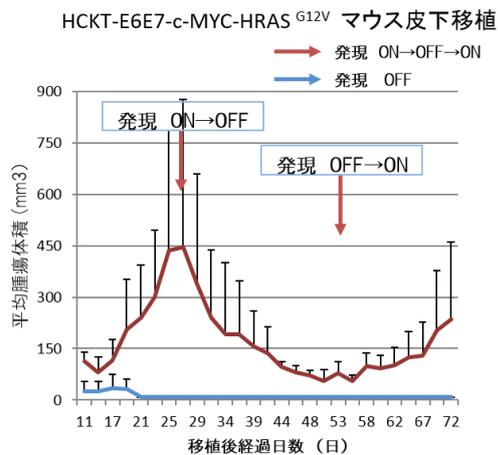
(図4) 免疫染色では、HCK1Tが最もSCJ細胞に近い結果を示した。(細胞名のJ、CはそれぞれSCJ領域、円柱上皮領域を、Tはh-TERT示す。)



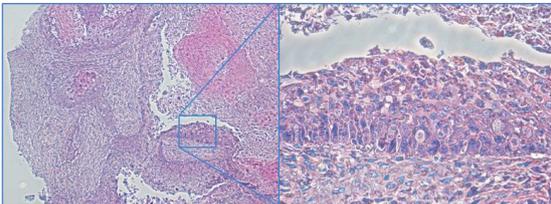
(2) SCJにおける発がん機構の解明

①HCK1TにEMRをtetOffシステムにより導入し、免疫不全マウス皮下移植にて形成される腫瘍の組織型を解析した。形成された腫瘍はDox投与により退縮し、腫瘍EMRの発現の有無によって腫瘍原性が誘導されていることを確認した。(図5)

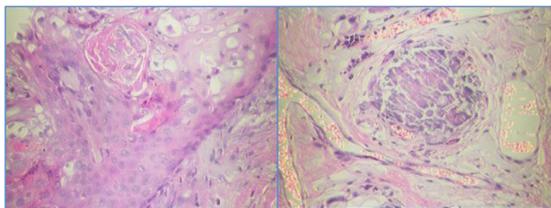
(図5) HCK1Tに4因子を導入しTetoffシステムにより発現調節をして形成された腫瘍径の変化(上)と組織像(下、H-E染色)



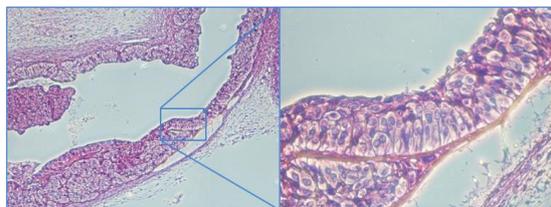
1. がん遺伝子発現により形成された腫瘍組織



2. 腫瘍形成後、がん遺伝子の発現中止により退縮した腫瘍組織

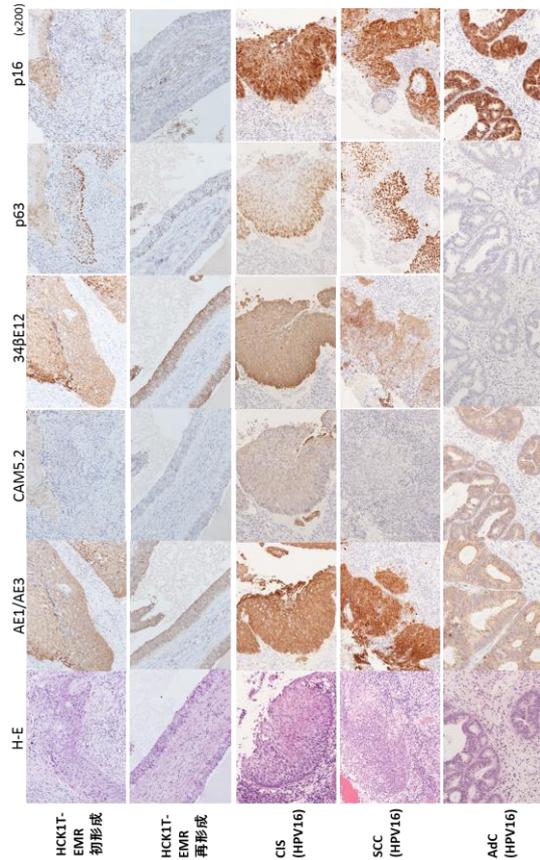


3. 腫瘍退縮後、がん遺伝子の再発現により形成された腫瘍組織



②免疫染色による解析では、腫瘍を構成する異型細胞はほぼ全て扁平上皮(がん)細胞であり、腺(がん)細胞は認められなかった。(CK AE1/AE3+, 34βE12+, CAM5.2-, p63+) (図6)

(図6) 図5に示す形成された腫瘍と子宮頸部上皮内癌(CIS)、扁平上皮癌(SCC)、



③ HCK1T/EMR細胞をp63shRNAによりp63をKDしたHCK1T/EMR/p63(-)細胞では、SCJ特異的マーカーはよりSCJに近い発現を示した。三次元培養では、HCK1T/EMR/p63KD細胞はHCK1T/EMR細胞に比して浸潤能が亢進し、粘膜下層への細胞浸潤が増える傾向を認めるという予備結果を得た。

現段階では扁平上皮がんを模倣する発癌モデルの作成段階である。解析、応用して、世界初の子宮頸部腺癌の多段階発がんモデルを作製できる可能性は極めて高い。このモデルを解析することで腺癌と扁平上皮癌の母細胞に違いがあるか、HPV型やドライバー変異との関連があるかなど、古くからの疑問の多くを明らかにすることができるものとする。子宮頸部腺癌の多段階過程をより忠実に再現する発がんモデルは、扁平上皮癌に比べて悪性度が高い腺癌の、浸

潤・転移、再発に関与する分子生物学的機構の研究や、治療法の研究開発など、幅広く応用されることが期待できる。

<引用文献>

- 1) Martens et al. Distribution pattern and marker profile show two subpopulations of reserve cells in the endocervical canal. *Int J Gynecol Pathol* 28:381-8, 2009;
- 2) Smedts et al. The two faces of cervical adenocarcinoma in situ. *Int J Gyne Pathol* 29:378-85, 2010;
- 3) Herfs et al. Cervical squamocolumnar junction-specific markers define distinct, clinically relevant subsets of low-grade squamous intraepithelial lesions *PNAS* 109:10516-21, 2012
- 4) Narisawa-Saito et al. An in vitro multistep carcinogenesis model for human cervical cancer. *Cancer Res.* 68: 699-705, 2008
- 5) Liu X. ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells. *Am J Pathol.* 180:599-607, 2012
- 6) Inagawa Y. et al. A human cancer xenograft model utilizing normal pancreatic duct epithelial cells conditionally transformed with defined oncogenes. *Carcinogenesis* 35(8):1840-6, 2014
- 7) Yugawa T. et al. DeltaNp63alpha repression of the Notch1 gene supports the proliferative capacity of normal human keratinocytes and cervical cancer cells. *Cancer Res.* 70:4034-44, 2010
- 8) Sasai K et al. Oncogene-mediated human lung epithelial cell transformation produces adenocarcinoma phenotypes in vivo. *Cancer Res* 71:2541-9, 2011.

5. 主な発表論文等；
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木川聖美 (Kikawa Satomi)

独立行政法人国立がん研究センター・

研究所・リサーチレジデント

研究者番号：30547625