

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 30 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670718

研究課題名(和文)子宮内膜症幹細胞の探索と分子標的治療に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Identification of endometriosis-stem cells for the development of novel molecular-target therapy

研究代表者

京 哲 (SATORU, KYO)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：50272969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症の元となる幹細胞を同定するために、卵巣子宮内膜症の手術検体から上皮細胞、間質細胞を純化し、培養を行った。これらの細胞にTERT, cyclinD1, CDK4の発現ベクターを導入して不死化細胞株を樹立し、これらに対して組織幹細胞マーカー、癌幹細胞マーカーとして知られる各種分子抗原を指標としたフローサイトメトリー解析を行い、各々のマーカーを発現する細胞を単離し、細胞のcharacterizationを行った。その結果、CD44陽性細胞は有意に浸潤能が亢進し、高率にsphere形成能を認めた。これらのことからCD44陽性細胞が幹細胞性格を有する細胞集団を含んでいる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To identify the stem cell of endometriosis, we first isolated epithelial and stromal cells from ovarian endometriomas resected by operation. The hTERT, cyclinD1 and CDK4 cDNAs were transfected to these cells by lentiviral transfection, and immortalized cells were successfully isolated. Using these cells, FACS analysis was performed, in which the cells with various cell surface markers were analyzed for invasion and sphere formation capacities. We found that CD44-positive cells have increased invasive ability and obtain efficient sphere formation activity, and therefore contain stem-cell population.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮内膜症 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症の病因、病態の研究には長い歴史があり、内膜の移植説、化生説が主流となっているものの未だに結論は出ていない。この疾患の特徴は癌に匹敵するほどの浸潤、転移能の高さであり、異所性内膜には必ず上皮、間質成分が混在して存在する。移植説をベースに考えた場合、内膜上皮細胞、内膜間質細胞が混在していることを説明するには両者が同じ場所に生着する偶然性を発生ベースとするが、一方で上皮、間質細胞の双方を産み出し得る幹細胞のような存在を想定する事も出来る。また化生説を考えた場合にも幹細胞性格を持つ細胞が起点となる可能性が十分に考えられる。我々はこれまでに正所性子宮内膜の幹細胞に関する研究を行ってきた。子宮内膜組織を細切し、顕微鏡レベルで内膜腺を1個1個採取し、X染色体上にあるアンドロゲン遺伝子のメチル化による不活化パターンを解析する方法で検討したところ、内膜腺1個がモノクローナルな集団から構成されていることを見出した(Tanaka et al. Am.J.Pathol. 163: 295-301,2003)。同時に隣接する内膜腺同士が同じクローナリティを有することも見出した。一方、男性ドナーから骨髄移植を受けた女性の子宮内膜をY染色体のFISH法で検討したところ、内膜腺、及び間質の双方に一定の頻度でY染色体陽性細胞が存在し、骨髄由来の幹細胞様細胞が何らかの機序により内膜に入り込んでいることを報告した(Ikoma et al. Am.J.Obstet.Gynecol. 201: 608.e1-8,2008)(図1)。さらに我々は子宮内膜癌が癌幹細胞を起点として発育、進展することも明らかにしてきた(Nakamura et al. Hum.Pathol. 41:1516-1529, 2011)。以上の研究経過より、我々は子宮内膜症も正所性内膜

と同様に幹細胞を機転としたモノクローナルな増殖を示す可能性があると考え、その同定と解析を試みることを本研究の目的とした。

2. 研究の目的

子宮内膜症の成因として内膜の移植説、化生説等が提唱されているが、結論は出ていない。また成因が不明なため、有効な治療薬としてはホルモン製剤が主体となっている。我々はこれまでに正所性子宮内膜や子宮内膜癌において幹細胞の存在を実証し、幹細胞を起点としたクローナルな増殖が内膜のサイクリックな増殖や癌の進展において重要な役割を演じていることを提唱してきた。本研究では子宮内膜症の幹細胞の存在の有無を様々な分子生物学的手法を用いて探索し、幹細胞を起点とした内膜症の発生、進展の分子機構を解明するとともに、幹細胞を標的とした新たな治療コンセプトまでを提案することを目的とした。

3. 研究の方法

子宮内膜症上皮、間質の安定培養系の確立

本研究の遂行には子宮内膜症上皮および間質細胞の in vitro での安定培養が前提となる。我々は以前より正所性子宮内膜の上皮細胞および間質細胞に Rb 経路の遮断とテロメラーズ遺伝子の活性化による不死化を試み、各々の性格を保持したまま永続的に培養、継代可能な不死化細胞の樹立に成功してきた(Kyo S et al. Am.J.Pthol. 163: 859-867, 2003)。また直近では同様の方法を用いて卵巣チョコレート嚢胞の上皮細胞の不死化にも成功している(Bono Y et al. Br.J.Cancer 103: 1205-1213,2012)。この細胞は腺管類似構造を保ちながら増殖し、性ステロイドホルモン反

応性も有している。すなわち、構造的にも機能的にもオリジナルの内臓腺細胞の特徴を保持したまま不死化した細胞である。本研究では同不死化細胞あるいは、患者からの文書による同意の下、手術にて摘出された内臓腺組織から分離、純化した上皮腺細胞及び間質細胞を、同様の方法により不死化した細胞を樹立し研究に供する。

幹細胞マーカーの探索

上記の方法にて不死化し、培養可能となった細胞に対して、組織幹細胞マーカーや癌幹細胞マーカーとして知られている CD44, CD133 などの分子の発現を指標として FACS にて分離、純化し、各々の細胞の characterization を行う。また分離した細胞を幹細胞アッセイ系に供する。

幹細胞性格を評価する方法として各種方法が知られているが、幹細胞を起点に浸潤、転移が起こることが知られている癌幹細胞と類似の性格を推定し、まずは浸潤能の評価を invasion assay にて行う。間質不死化細胞含め、他のマーカー発現細胞に対しても同様に浸潤能の評価を行う。幹細胞性格の検定に最もよく用いられるのは sphere assay である。浮遊した培養条件で球体の立体構造を持ちながら増殖する性格は幹細胞を起点とした増殖様式を反映すると考えられており、本研究でも試みる。

4 . 研究成果

CD44 陽性細胞が陰性細胞に比し、著明な浸潤能を呈した。また同細胞群は sphere assay にて sphere 形成能の亢進を認めた。これらの性格は上皮不死化細胞で有意であり、間質不死

化細胞では認められなかった。間質不死化細胞で幹細胞性格を供する表面マーカーは同定することができなかった。以上のことから CD44 陽性上皮細胞群が幹細胞性角を有する細胞集団を含んでいると考えられた。またこれらの細胞に卵巣チョコレート嚢胞から発生した卵巣がんを高頻度に認められる遺伝子異常を mimic する遺伝子操作を加え、癌化するかどうかの実験を現在行っている。

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 3 件)

[学会発表] (計 1 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者 京 哲 (Kyo, Satoru)
島根大学・医学部・教授

研究者番号 : 50272969

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()