

子宮内膜・子宮体がんにおける幹細胞研究

加藤, 聖子
九州大学大学院医学研究院生殖病態生理学分野

<https://doi.org/10.15017/26218>

出版情報：福岡醫學雜誌. 104 (2), pp.34-39, 2013-02-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

子宮内膜・子宮体がんにおける幹細胞研究

九州大学大学院医学研究院生殖病態生理学分野

加 藤 聖 子

はじめに

生殖年齢の女性の子宮内膜は、月経周期毎に、増殖・分化・脱落といった現象を繰り返している。我々はこの再生能力の豊富な子宮内膜を起源とする疾患（子宮内膜症・子宮内膜増殖症・子宮体がん）の発症に「幹細胞」が関与しているのではないかと考え、子宮内膜や子宮体がん組織の細胞を用いて研究を行っている。この総説では、これまでの研究成果を文献的考察を加えながら紹介する。

1. 幹細胞とは

イモリの手足は切断されても、またすぐ再生する。人間の身体の中なかでも再生は起こっている。生理的再生組織の血液や小腸上皮などの他に、肝臓、骨なども損傷が起こると再生されることが知られている。また、最近では、今まで非再生組織と考えられていた神経や筋肉も再生能力をもつことが明らかとなった。この再生能力をつかさどるものの正体が幹細胞である。

幹細胞は自分と同じ細胞をつくる能力（自己複製能）といろいろな細胞に分化する能力（多分化能）を持つ細胞と定義されている（図1）。幹細胞はその由来から胚性幹細胞、生殖幹細胞、組織幹細胞に、また、性質から全能性幹細胞、多能性幹細胞、単能性幹細胞に分類される。このうち、胚性幹細胞（embryonic stem cell: ES細胞）はよく知られている。受精卵は卵割し、桑実胚を経て、胚盤胞となるが、この胚盤胞の内部細胞塊から得られた細胞を未分化な状態を維持する条件で培養したものが胚性幹細胞であり、1981年にマウスから、1998年にヒトから樹立された¹⁾²⁾。ヒトの身体のあらゆる部分に分化する能力をもつが、

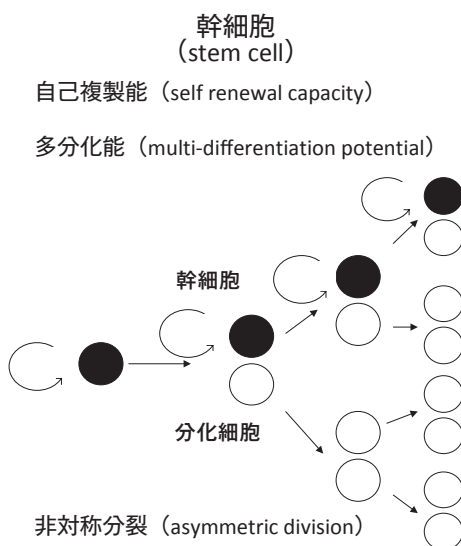


図1 幹細胞の概念

胎盤になることはできないため、全能性ではない。再生医療への応用が期待されているが、受精卵を破壊する行為が必要なため、倫理的な制約がある。高橋、山中らは2006年にマウスの、2007年にヒトの線維芽細胞に4つの遺伝子 (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) を導入することにより、胚性幹細胞と同様な多能性を持つ細胞を作る事に成功し、この業績により山中は2012年ノーベル医学生理学賞を受賞した³⁾⁴⁾。この細胞は人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS細胞) と名付けられ、現在、再生医療への応用のための研究に世界がしのぎを削っている。

2. 子宮内膜幹細胞

近年、胎児組織と同様に、皮膚・筋肉・血液・神経など様々な成体組織にも幹細胞の存在が報告され、組織幹細胞と呼ばれている。子宮内膜は月経周期毎に増殖と剥離を繰り返す再生能力の高い組織であり、組織幹細胞の存在が示唆されていたが実体は不明であった。

マーカーが不明な組織幹細胞を分離する手段として、幹細胞が ATP-binding cassette proteins (ABC-transporters: ABCG2/Bcrp1) を高発現していることを利用し、細胞を DNA 結合色素 Hoechst33342 で染色し、UV で励起させた際、450/600nm の波長を暗く発現している細胞集団 side-population (SP) 細胞を分離する方法が用いられている⁵⁾。

我々は様々な組織で幹細胞として機能していると報告されている Side population 細胞 (SP細胞) を用いて子宮内膜幹細胞の研究を行った。子宮内膜は腺上皮細胞と間質細胞から構成されるが、両者ともに SP細胞は存在し、その比率は月経期の内膜間質細胞が最も高かった。これらの SP細胞は長期増殖能を有し、子宮内膜腺上皮様あるいは間質様細胞への分化を示し、子宮内膜の stem-like cell あるいは progenitor である可能性が高いことが示された⁶⁾。その後の他のグループの研究により、子宮内膜 SP細胞は内皮細胞、脂肪細胞、骨細胞への分化能を持つことが報告され、再生医療への応用の期待が高まっている⁷⁾⁸⁾。

3. 子宮体がん幹細胞の生物学的特性

がん組織の中にも、がん幹細胞の存在が報告されている⁹⁾¹⁰⁾。このがん幹細胞を含むがん細胞の細胞集団は、治療抵抗性や転移能に関与する性質を持つと考えられている。子宮体がんにおいても、幹細胞マーカーである CD133, Musashi-1 や ALDH1 を高発現する細胞を用いて、がん幹細胞の研究が行われている^{11)~14)}。

我々は前述した子宮内膜と同様に、子宮体がん組織からの初代培養細胞や子宮体がん細胞株に SP細胞が存在すること (図2A)、これらの SP細胞は1) 分化マーカーの発現は低下し、未分化であること、2) 長期増殖能を示すこと、3) SP細胞はコラーゲンプレート上にコロニーを形成し、継代によって繰り返されること (自己複製能)、4) 細胞をヌードマウス皮下に移植すると、SP細胞は non-SP細胞に比べ有意に大きな腫瘍を形成し、造腫瘍能の亢進を示すことを明らかにした (図2B)。また、マウス皮下に形成された SP細胞由来の腫瘍は non-SP細胞由来の腫瘍に比べ、豊富な間質を有し、この間質を laser microdissection や FISH 法で詳細に検討するとヒト DNA が含まれており、マウスに移植された SP細胞が間質に分化したことが明らかとなった。また、in vitro の解析でも SP細胞が間質マーカーである α -SMA を発現する細胞に分化することを示した (図3A)。以上より子宮体がん SP細胞は、未分化、自己複製能、少なくとも腫瘍細胞と間質細胞への2方向性分化能、造腫瘍能亢進を示し、がん幹細胞の特性を持つことを明らかにした。更に、この子宮体がん SP細胞の形態を観察すると足突起を持ち、time-lapse videoscope の解析で著明な運動能を持つこと示した (図3B)¹⁵⁾。

4. がん幹細胞を標的にした治療法の開発

以上より、子宮体がん幹細胞には、自己複製能と間質への分化・運動能の亢進という2つの特性があり、前者は再発に、後者は転移に関与すると考えられる。

SP細胞と NSP細胞の培養液中に子宮体がんの治療に使われる抗がん剤 (cisplatin, paclitaxel, doxorubi-

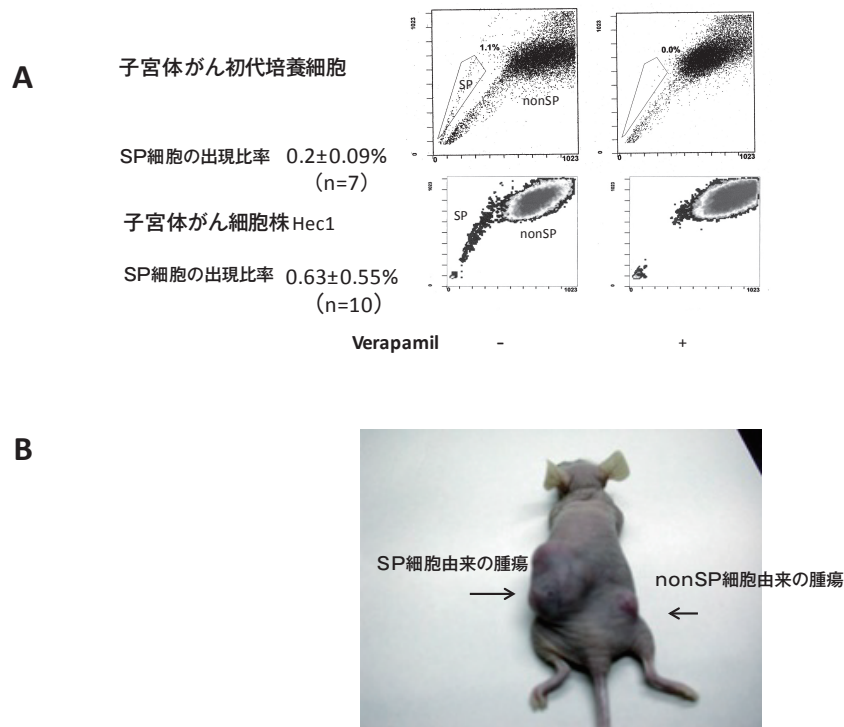
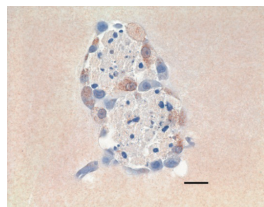


図2 A 子宮体がん組織からの初代培養細胞と子宮体がん細胞株 Hec1 細胞を Hoechst33342 で染色後, フローサイトメトリー (EPICS ALTRA HyPer-Sort) を用いて解析し SP 細胞が存在することを確認した. この SP 細胞の分画は verapamil の投与により消失した.
B 1×10^4 cells の SP 細胞, NSP 細胞をそれぞれヌードマウスの皮下に注入しそれぞれの細胞の腫瘍形成能を比較した. SP 細胞は non-SP 細胞に比べ有意に大きな腫瘍を形成し, 造腫瘍能の亢進を示した.

子宮体がん細胞 (Hec1)-SP

**α -SMA 発現
(3次元培養)**



**足突起の形成
(time-lapse videoscope)**

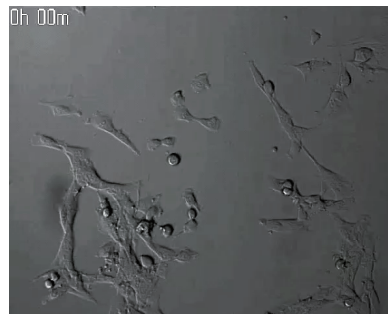


図3 A 分化条件下の3次元培養にて Hec1-SP 細胞が間質マーカーである α -SMA を発現する細胞に分化することが示された.
B タイムラプスビデオスコープ下での観察では SP 細胞は足突起を形成し, 運動能の亢進を示した.

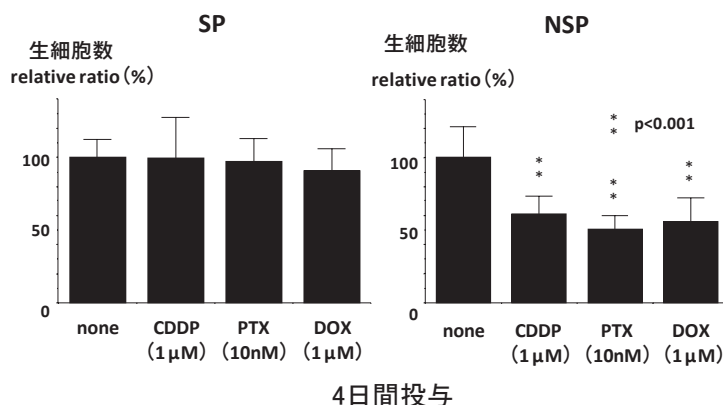


図4 RK12V-SP細胞とRK12V-NSP細胞の培養液中に1μM cisplatin, 10nM paclitaxel, 1μM doxorubicinを添加したところ、RK12V-NSP細胞の増殖能は抑制したのに対し、RK12V-SP細胞の増殖能に変化をみとめなかった。

cin)を添加したところ、NSP細胞の増殖能は有意に抑制されたのに対し、SP細胞の増殖能は変化をみとめず、がん幹細胞は既存の抗がん剤に対して抵抗性を持つことが示され、新規薬剤の開発が必要であることが示唆される(図4)。標的分子を探索するため、マイクロアレイで解析したところ、SP細胞においてNSP細胞に比べて増殖因子やサイトカインを含む多くの遺伝子の発現が亢進しており、子宮体がん幹細胞の増殖や維持には複数の因子やシグナルが関与していることが示唆された。よって、がん幹細胞を標的にした治療のためには、複数のシグナルを阻害する必要があると考えられる。

1) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDAC 阻害剤)

そこで、我々は、多様な作用を持つヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤に着目した。ヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) やヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) により制御されるヒストンのアセチル化の状態はがん細胞の分化や増殖に重要な役割を果たしており、治療の標的として注目されている。いくつかのHDAC阻害剤は抗がん剤として臨床応用が始まっているが、がん幹細胞の増殖に対する影響は不明である¹⁶⁾。我々はHDAC阻害剤としてsodium butyrate (NaB)を用いてSP細胞への効果を検討した。

NaBはNSP細胞だけではなくSP細胞の細胞増殖を濃度依存的に抑制した。また、SP細胞のSP再出現率を濃度依存的に抑制した。NaB添加によってSP細胞ではS期の割合が濃度依存的に減少し、コラーゲンコートディッシュ上の一次コロニー形成や軟寒天培地上のコロニー形成を完全に抑制した。また、NaBは、SP細胞とNSP細胞の両方の細胞においてreactive oxygen species (ROS)の産生を亢進させ、DNA damageの指標であるγ H2AX fociの数を増加させDNA損傷反応シグナルの下流のH2AXとp38MAPKのリン酸化を亢進させた。よってNaBはSP細胞のDNAダメージシグナルを活性化することで自己複製能を抑制することが示めされた¹⁷⁾。

2) Epithelial Mesenchymal Transition 阻害剤

Maniらは、乳がん細胞を用いて、Twist, SnailなどのEpithelial Mesenchymal Transition (EMT)を誘導する遺伝子を導入すると、CD44^{high}/CD24^{low}の乳がん幹細胞の分画が増加することを見出した。また、CD44^{high}/CD24^{low}の乳がん幹細胞分画の細胞はFibronectinやVimentinなどの間葉系マーカーの発現が増加し上皮マーカーE-cadherinの発現が低下していることを示した。がん幹細胞とEMTの関与を報告した¹⁸⁾。EMTの性質を示す乳がん幹細胞の増殖を特異的に抑制する薬剤としてSalinomycinが同定された¹⁹⁾。その後SalinomycinはABC transporterの阻害作用を持つことや白血病、胃がん、肺がん、大腸がんのCSCの増殖を抑制することが次々に報告されている。

がん幹細胞を標的にした新規治療法

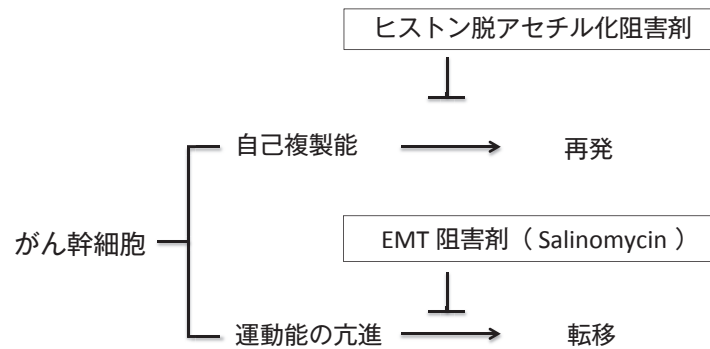


図5 がん幹細胞を標的とした治療戦略

前述したマイクロアレイのパスウェイ解析にて EMT に関与するシグナル伝達経路を構成する遺伝子群の発現が亢進しており、乳がんと同様子宮体がん幹細胞の性質にも EMT が重要であることが示された。そこで、我々は Salinomycin の SP 細胞に対する効果を解析した。Salinomycin は SP 細胞においてアポトーシスを誘導し、Wnt シグナルを抑制することにより、細胞増殖を抑制した。また、運動能、浸潤能やマウス皮下への腫瘍形成も抑制した（楠木総司ら、印刷中）。

おわりに

1997 年に白血病で、2003 年に固形がんの乳がんで幹細胞の報告がされて以来、がん幹細胞の研究が世界中で精力的になされてきた。その結果、がん幹細胞が様々ながん腫に存在し、発がんに重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。今回、我々は子宮体がんの幹細胞に対して HDAC 阻害剤が自己複製能を抑制すること、EMT 阻害剤が運動能・浸潤能・増殖能・腫瘍形成能に対して有効な薬剤となる可能性を報告した（図5）。がん幹細胞はこの他にも未分化性、多分化能、造腫瘍能の亢進、治療抵抗性の獲得、運動能の亢進など多様な性質を持ち、がん幹細胞の生存や維持には、複数のシグナル分子が関与していると思われる。がん幹細胞を標的とした治療法の開発にはそれぞれの特性を抑制する薬剤を組み合わせるか、多様な作用機序を持つ新規薬剤を開発するなどの戦略が重要であろう。そのためにはこのがん幹細胞を効率よく同定するためのマーカーの探索が必要である。がん幹細胞を根絶できれば、再発や転移の防止につながり、がんの撲滅も夢ではない。

参 考 文 献

- 1) Evans MJ and Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156, 1981.
- 2) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS and Jones JM: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147, 1998.
- 3) Takahashi K and Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676, 2006.
- 4) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K and Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872, 2007.
- 5) Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS and Mulligan RC: Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo: *J. Exp. Med.* 183: 1797-1806, 1996.
- 6) Kato K, Yoshimoto M, Kato K, Adachi S, Yamayoshi A, Arima T, Asanoma K, Kyo S, Nakahata T and Wake N: Characterization of side-population cells in human normal endometrium. *Human Reproduction* 22: 1214-1223, 2007.
- 7) Masuda H, Matsuzaki Y, Hiratsu E, Ono M, Nagashima T, Kajitani T, Arase T, Oda H, Uchida H, Asada H, Ito M, Yoshimura Y, Maruyama T and Okano H: Stem cell-like properties of the endometrial side population:

- implication in endometrial regeneration. PLoS One 5 : e10387, 2010.
- 8) Cervello I, Gil-Sanchis C, Mas A, Delgado-Rosas F, Martinez-Conejero JA, Galan A, Martinez-Romero A, Martinez S, Navarro I, Ferro J, Horcajadas JA, Esteban FJ, O'Connor JE, Pellicer A and Simon C : Human endometrial side population cells exhibit genotypic, phenotypic and functional features of somatic stem cells. PLoS One 5 : e10964, 2010.
 - 9) Visvader JE and Lindeman GJ : Cancer stem cells in solid tumours : accumulating evidence and unresolved questions. Nat Rev Cancer 8 : 755-768, 2008.
 - 10) Rosen JM and Jordan CT : The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. Science 324 : 1670-1673, 2009.
 - 11) Rutella S, Bonanno G, Procoli A, Mariotti A, Corallo M, Prisco MG, Eramo A, Napoletano C, Gallo D, Perillo A, Nuti M, Pierelli L, Testa U, Scambia G and Ferrandina G : Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors. Clin. Cancer Res. 15 : 4299-4311, 2009.
 - 12) Nakamura M, Kyo S, Zhang B, Zhang X, Mizumoto Y, Takakura M, Maida Y, Mori N, Hashimoto M, Ohno S and Inoue M : Prognostic impact of CD133 expression as a tumor-initiating cell marker in endometrial cancer. Hum. Pathol. 41 : 1516-1529, 2010.
 - 13) Friel AM, Zhang L, Curley MD, Therrien VA, Sergeant PA, Belden SE, Borger DR, Mohapatra G, Zukerberg LR, Foster R and Rueda BR : Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133 positive and negative endometrial cancer cells. Reprod. Biol Endocrinol. 8 : 147, 2010.
 - 14) Rahadiani N, Ikeda J, Mamat S, Matsuzaki S, Ueda Y, Umehara R, Tian T, Wang Y, Enomoto T, Kimura T, Aozasa K and Morii E : Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) in endometrioid adenocarcinoma and its clinical implications. Cancer Sci. 102 : 903-908, 2011.
 - 15) Kato K, Takao T, Kuboyama A, Tanaka Y, Ohgami T, Yamaguchi S, Adachi S, Yoneda T, Ueoka Y, Hayashi S, Asanoma K and Wake N : Endometrial cancer side-population cells show prominent migration and have a potential to differentiate into the mesenchymal cell lineage. Am. J. Pathol. 176 : 381-392, 2010.
 - 16) Marks PA and Xu WS : Histone deacetylase inhibitors : Potential in cancer therapy. J Cell Biochem 107 : 600-608, 2009.
 - 17) Kato K, Kuhara A, Yoneda T, Inoue T, Takao T, Ohgami T, Dan L, Kuboyama A, Kusunoki S, Takeda S and Wake N : Sodium butyrate inhibits the self-renewal capacity of endometrial tumor side-population cells by inducing a DNA damage response. Mol. Cancer Ther. 10 : 1430-1439, 2011.
 - 18) Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J and Weinberg RA : The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell 133 : 704-715, 2008.
 - 19) Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA and Lander ES : Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. Cell 138 : 645-659, 2009.

(参考文献のうち、数字がゴシック体で表示されているものについては、著者により重要なものと指定された分です。)

プロフィール

加藤 聖子 (かとう きよこ)

九州大学教授 (大学院 医学研究院 生殖病態生理学分野)

◆**略歴** : 1960年宮崎県延岡市に生る。1986年九州大学医学部卒業。同年、婦人科学産科学教室に入局。松山赤十字病院、九州大学医学部附属病院、国立病院九州がんセンターで研修後、1989年から1992年まで米国 La Jolla Cancer Research Center 留学。1992年九州大学生体防御医学研究所助手、1998年同 講師。2007年順天堂大学大学院医学研究科産婦人科講座准教授。2012年8月より現職。

◆**研究テーマと抱負** : 産婦人科疾患の病態の解明を遺伝子・蛋白レベルで研究している。子宮内膜や絨毛幹細胞を使った再生医療や婦人科癌幹細胞を標的にした治療法の開発を目指している。臨床と研究の両立を目標に若い先生達に夢を与えられる研究をしたい。

◆**趣味** : 読書, 映画鑑賞, 水泳

◆**好きな言葉** : 継続は力なり, 運・鈍・根