

博士論文

癌幹細胞様細胞集団(スフェロイド)を活用した
婦人科癌における再発・転移の特性解析とそれを応用した
治療戦略に関する研究

佐藤 雅和

目次

略語一覧	4
要旨	6
第1章 序文	7
<1> 背景	
1) 婦人科悪性腫瘍における再発癌の問題点	
2) 癌幹細胞(Cancer Stem Cell, CSC)について	
3) CSC マーカーに関して	
<2> 本研究の目的	
第2章 対象と方法	12
1) 癌細胞株培養	
2) iPS 細胞培養	
3) RNA 抽出及び RT - quantitative PCR (RT - qPCR)	
4) RNA シーケンス(RNA-seq)	
5) ウェスタンブロットティング法	
6) フローサイトメトリー	
7) ELISA 法	
8) サイトカインアレイ	
9) 細胞内活性酸素種 (ROS) 測定	
10) メタボローム解析	

11) FDG-PET/CT

12) 免疫蛍光染色及び免疫組織染色

13) 試薬

14) 統計解析

第3章 結果.....24

1. 婦人科癌における CSC 様細胞集団の存在の確認
2. CSC 様細胞集団と細胞外基質 (ECM) との関係
3. CSC 様細胞集団の特性解析 -代謝の観点から-
4. 生体内におけるグルタミン代謝の意義
5. グルタミン代謝を標的とした、新規治療標的の探索
6. 新たな CSC モデルの樹立の試み

第4章 考察.....53

第5章 結論.....62

引用文献.....63

謝辞.....78

略語一覧

CSC: Cancer Stem Cell

QOL: Quality Of Life

iPS 細胞: Induced Pluripotent Stem Cells

IM: Intermediate Mesoderm

ALI: Air-Liquid Interface

PAI1: Plasminogen Activator Inhibitor-1

uPA: Urokinase-type Plasminogen Activator

FDG-PET: Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography

SUV: Standardized Uptake Value

iRC: Induced Reserve Cell-like Cells

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

BMP: Bone Morphogenetic Proteins

ECM: Extracellular Matrix

ROS: Reactive Oxygen Species

PCA: Principal Component Analysis

TCA サイクル: Tricarboxylic Acid Cycle

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

AMPK: AMP-activated Protein Kinase

FAK: Focal Adhesion Kinase

mTOR: Mammalian Target Of Rapamycin

S-C-junction: Squamocolumnar Junction

CK: Cytokeratin

AGR: Anterior gradient 2

CD63: Cluster differentiation 63

MMP: matrix metalloproteinase

GDA: Guanine deaminase

MIF: Macrophage Migration Inhibitory Factor

要旨

本研究では、婦人科癌における癌幹細胞 (CSC) 様細胞集団 (スフェロイド) の特性解析を行い、再発・転移に関する治療戦略の構築の検討を行った。メタボローム解析を用いた網羅的解析を用いて、スフェロイドでは TCA サイクルを活性化させ ATP を効率良く得ている可能性を示した。また、RNA シーケンスを用いて、スフェロイドでは FAK 経路が活性化していることを示した。これらの結果から、グルタミン代謝と FAK 経路を阻害することで、スフェロイドにおける mTOR 活性を相乗的に阻害できる可能性を示した。さらに、iPS 細胞から子宮頸部リザーブ細胞様集団 (iRC) を誘導することで、新規 CSC モデルを提唱した。総じて、CSC 様細胞集団の特性解析を行うことが、婦人科悪性腫瘍における転移・再発に関する治療戦略の構築をするための知見を得るために有用である可能性が示唆された。

第1章 序文

<1> 背景

1) 婦人科悪性腫瘍における再発癌の問題点

婦人科悪性腫瘍には子宮頸癌や子宮体癌、卵巣癌、乳癌などが挙げられるが、生活様式の変化に伴い日本では近年増加傾向にあると言われている。例えば、子宮頸癌は世界の女性の死因の上位を占めるとされるが、日本においては婦人科悪性腫瘍の中で最も多いとされる[1]。特に子宮頸癌では疫学的に若年者に多いことから、初回治療において子宮の温存(妊孕性温存)を求められる機会が多くなっている。しかし、それによって治療の根治性が損なわれることはあってはならず、再発をさせない治療が至上命題である。それは、手術や化学療法などの初回治療後における再発や転移は、患者の予後不良に直結するからである。子宮頸癌の治療の例では、前治療として放射線療法が施行されている再発癌は極めて予後不良であると言われている[2]。照射野内の局所再発の場合、化学療法の奏効率は数十%程度と極めて低い[2]。骨盤内除臓術といった手術療法が行われることもあるが、手術の侵襲や合併症の頻度は高く、患者のQOLが損なわれる可能性が否定できない[5-8]。そのため、再発の判明した時点で緩和医療が原則とされている。卵巣癌に関しても同様のことが言える。卵巣癌は世界の女性の癌死亡の原因の第5位に位置するとされ、極めて予後不良であると言われている[3]。予後不良の原因の一つとしては、患者の多くが無症候性であるがゆえに、ほとんどの症例が進行癌、すなわち腹腔内への播種・転移をきたした状態として発見されるためと言われている。TC療法(パクリタキセル、カルボプラチン併

用療法)の出現以来、卵巣癌患者の予後は劇的に改善されたとされるものの、卵巣癌患者の40-50%を占めるとされる進行症例(III期、IV期)では依然予後不良である[4]。進行癌患者の予後が不良である原因としては、再発のしやすさが挙げられる。卵巣癌は初回治療が奏功するとされる一方で、約半数の症例が再発するとも言われている[4]。再発後の生存期間の中央値は約2年と言われており、再発後は根治が困難であることから、再発後の治療は主として生存期間の延長や症状の緩和が目的とされる[5]。このように、再発や転移をさせない治療法、また、再発・転移後も寛解を望める治療法の探索が急務である。

2) 癌幹細胞(Cancer Stem Cell, CSC)について

他方、癌の再発・転移に関しては、癌幹細胞(Cancer Stem Cell, CSC)の関与が近年指摘されている[6]。すなわち、癌組織の中にも不均一性(heterogeneity)が存在し、その一部の癌細胞がCSCとして再発や治療抵抗性に関わっているというものである。非癌幹細胞(non-CSC)を治療したとしても、CSCが生存している限りは再発し得るというもので、逆に、CSCさえ根絶できればnon-CSCが残存していたとしてもその癌組織はやがて自己免疫等で排除されていくであろう、というものである。

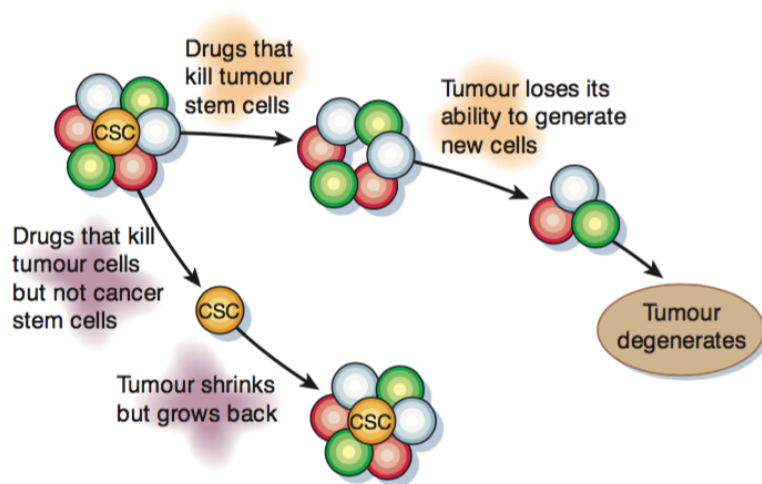


図 1 CSC 仮説

従来の治療では、一時的に腫瘍の増勢を抑制することはできても、CSC 自体が残存する限り再発をしてしまう。他方、CSC を標的とした治療ができれば、効率良く腫瘍の増勢を抑制することができる。引用文献 6 より引用。

CSC の定義は必ずしも一致した見解は得られていないものの、①未分化(自己複製能及び多分化能を有する)、②高い増殖能力、の 2 点に関しては同意が得られている [7-11]。これらを実験的に示す方法として、①であれば未分化マーカーの発現や表面抗原の異なる細胞への分化、が検索されている。②であれば、*in vitro* ではスフェロイド形成能、*in vivo* では少数の細胞での腫瘍形成能がしばしば検討される [12-21]。

3) CSC マーカーに関して

現時点において数々の提唱はされているものの、CSC のマーカーに関して確固たるものは存在していない [22]。それらの報告のほとんどは、基本的には前述の①や②を満たす細胞集団を同定するという検討である。例えば、肺癌、乳

癌、前立腺癌など多くの癌種において、正常未分化幹細胞で発現している Nanog や OCT3/4、SOX2 といった遺伝子を一部の癌細胞も同様に発現しており、それらの癌細胞が分化・増殖に関わっているという報告がある[12-21]。また、卵巣癌においては、CD44 や CD133 といった表面抗原を発現している癌細胞が、それ以外の細胞に比べて腫瘍形成能が高いという報告がある[23-24]。子宮体癌においては、色素染色性の異なるサイドポピュレーション細胞(SP cell)が CSC の特徴を有しているという報告がある[25-26]。子宮頸癌に関しては、ALDH1 陽性細胞が CSC のマーカーであるとする報告が存在する[27-29]。このように、文献的に CSC マーカーを探索した研究は数多く存在するが、CSC として必要十分であるという条件・マーカーの共通の見解は存在しない。

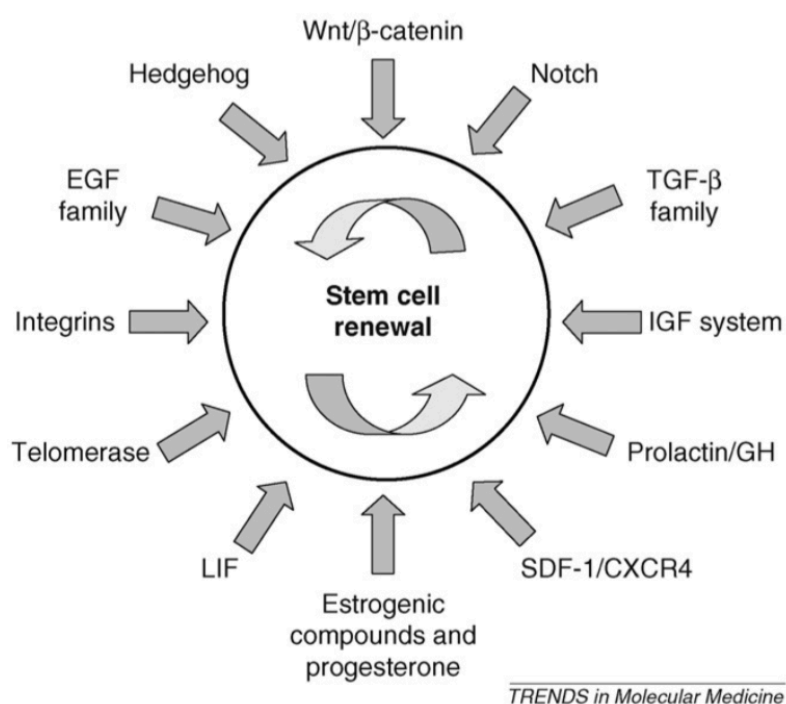


図 2 CSC に関わるとされる因子や経路

CSC の特性に関しては様々な検討がなされているが、必要十分とされるマーカー、特性などは明らかとなっていない。引用文献 22 より引用。

〈2〉 本研究の目的

婦人科悪性腫瘍における CSC 様細胞集団の存在を確認し、その上で CSC 様細胞集団の特性解析とそれを応用した治療戦略を構築することを研究の目的とした。すなわち、以下のことを明らかとすることを目的とした。

- (1) 婦人科癌においても、他癌種で示されているように CSC の特徴を示す細胞集団が存在することを確認する。
- (2) それらの CSC 様細胞集団が再発・転移をきたしやすいメカニズムを、特に細胞外基質 (ECM) の観点から検討する。
- (3) CSC 様細胞集団の本質として重要と考えられる特性を解析する。すなわち、表現系に最も近いとされる代謝の観点から、CSC 様細胞集団の特性を解析する。
- (4) (3) で得られた知見が、臨床的にどのような意義を有するかを検討する。
- (5) (3)、(4) で得られた知見を標的とすることで、婦人科癌における新たな治療戦略が構築できるかを検討する。
- (6) CSC 様細胞集団を標的とした治療戦略を構築するにあたり、上記(1)-(5)の手法を用いるのによりよいモデルとなる細胞株を樹立する。

第2章 対象と方法

1) 癌細胞株培養

癌細胞株は、子宮頸癌細胞株としてCaSki、SiHa、卵巣癌細胞株としてOVTOKO、OVISE、JHOC5の計5株を用いた。CaSki、SiHaはAmerican Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) より購入した。OVTOKO、OVISEはJCRB Cell Bank (Osaka, Japan) より購入した。JHOC5はRIKEN Cell Bank (Ibaraki, Japan) より購入した。10%仔ウシ血清 (FBS; Invitrogen) 添加RPMIまたはDMEM培地 (Wako) にて培養した。継代では、0.25% trypsin/EDTA (Wako) を用いて剥離した。細胞株は全て37° C、5%CO₂ 下で培養した。3D培養 (スフェロイド形成培養) に関しては、他に記載のない限り、剥離した細胞を1-2 x10⁵ cells/mlの細胞数でultra-low attachmentプレート (Corning Inc.) に播種し、48 時間培養した。スフェロイドは、培地を100 x Gで2分間遠心処理することで回収した。検討1におけるスフェロイド形成能の評価においては、スフェロイド培地を用いた。スフェロイド培地とは、20 ng/ml human recombinant epidermal growth factor (EGF; Wako) 及び10 ng/ml basic fibroblastic growth factor (bFGF; ReproCELL, Inc.)、0.3% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich) (sphere medium) を含むDMEM/F12 (Invitrogen) 培地である。

2) iPS細胞培養

ヒトiPS細胞株としては、201B7 株を使用した[30]。この株はRIKEN BRC(Ibaraki, Japan) を通じて National Bio-Resource Project of the MEXT (Kyoto, Japan) から供与された。iPS細胞はmitomycin C 処理を施されたフィーダー細胞(mouse embryonic fibroblasts, MEF) 上で培養した。MEFはReproCoat コーティング後のディッシュに、推奨の方法で播種した。培地として5 ng/ml recombinant basic fibroblastic growth factor (bFGF) を含むES培地を用いた。4日毎に1:4の濃度で播種し直し、継代を行った。培地は毎日交換した。ここで用いた試薬は全てReproCELLから購入した。

中間中胚葉(IM)の誘導に関しては既報を参照したため、簡単に記述する[31-32]。ReproCoatによりMEFを除去後、iPS細胞をSynthemax (Corning)でコーティングされたディッシュに播種した。この際培地は、Glutamax(Invitrogen) 及びB27 supplement (Invitrogen)、500 U/ml penicillin/ streptomycin (Wako) を含む DMEM/F12(Gibco) を用いた。播種直後には、10 μ M Y27632 (Wako) を添加した。播種後2日間の培地には3 μ M CHIR99021 (Wako) 及び1 μ M TNPB (Wako) を添加した。その後の3日間には、1 μ M TNPBのみ添加した。

ヒトiPS由来リザーブ細胞様細胞(iRC)の誘導は下記である。培地としては付属のサプリメントを含んだKeratinocyte-SFM(Invitrogen) を用いた。Collagen IVコーティングプレートはCorningより購入した。Insert(pore size 0.4 μ m) は Corningより購入し、human placental collagen IV (10 μ g/cm², Sigma-Aldrich)を用いてコーティングした。iRCの3D培養には2種類の方法を用

いた。一つ目は Air-Liquid Interface (ALI) 培養であり、IM細胞をcollagen IV 後の35-mm inserts に播種した[33-34]。コンフルエンス後、inserts内の Keratinocyte-SFM培地を除去し、細胞が空気に触れた状態で1-3週間培養した。もう一つは3D-embedded培養である[35-37]。誘導後10日目の細胞を、10 μ M Y27632添加CnT-Prime 3D Barrier培地(CELLnTEC) を用いて ultra-low attachment 24-well plates (Corning) に播種し、1日間培養した。このプロセスによりスフェロイドが形成された。これらのスフェロイドを後述の Matrigel-coated platesで培養した。Matrigel-coated plates とは、6-well platesの一つのwellに250 μ lのMatrigelを添加し、37 ° Cで2 時間インキュベートしたものである。これによりMatrigelは半固体となった。培地は250 μ lの Matrigelと250 μ lのCnT-Prime 3D Barrier培地を混合したものとし、2-3日間 培養した。この過程で スフェロイドの内部の細胞は分化またはapoptosis を来 したし、腺管様の構造が形成された。

3) RNA抽出及び RT - quantitative PCR (RT - qPCR)

Tissue Total RNA Kit (Favorgen Biotech Corp.)を用いてtotal RNAを抽出 した。 First-strand cDNAは500 ng の total RNA からReverTra Ace (Toyobo) を用いて生成した。qPCRは SYBR Green PCR master mix (Roche)を用いて行っ た。 Denaturation は 95 ° C で2分間行い、続けて98 ° C で10 分間65 ° C で 10 秒間、68 ° C で8 秒間 35 サイクル行った。 . β -actin をinternal control

として用い、発現変化は β -actin 発現との比較($2^{-\Delta \Delta C_t}$)で解析した。qPCRは triplicateで検討した。本研究で用いたプライマー配列を表1に示す。

遺伝子名	プライマー配列
Nanog	GCTGAGATGCCTCACACGGAG TCTGTTTCTTGACCGGGACCTTGTC
Oct3/4	TGGAGAAGGAGAAGCTGGAGCAAAA GGCAGATGGTCGTTTGGCTGAATA
Sox2	GGAAATGGGAGGGGTGCAAAGAGG TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG
PAI1	GCACCACAGACGCGATCTT ACCTCTGAAAAGTCCACTTGC
hOSR1	GCTGTCCACAAGACGCTACA CCAGAGTCAGGCTTCTGGTC
hPAX2	GCTTTGGATCGGGTCTTTGA CTCGTTCCCCTGTTCTGATTTG
hLIM1	TCATGCAGGTGAAGCAGTTC TCCAGGGAAGGCAAACCTCTA
CK7	TCCGCGAGGTCACCATTAAC GCTCTGTCAACTCCGTCTCAT
AGR2	GTCAGCATTCTTGCTCCTTGT GGGTCGAGAGTCCTTTGTGTC
CD63	ATGCAGGCAGATTTTAAGTGCT

	GTTCTTCGACATGGAAGGGATTT
MMP7	GAGTGAGCTACAGTGGGAACA CTATGACGCGGGAGTTTAACAT
GDA	GCTGGAAGTAGCATAGACCTGC TCTTCTGCAAAGTCGATGTTCTG
ER α	CCCACTCAACAGCGTGTCTC CGTCGATTATCTGAATTTGGCCT
ER β	CCGACAAGGAGTTGGTACA CAGGAGCATCAGGAGGTTA
CA125	GCCTCTACCTTAACGGTTACAATGAA GGTACCCCATGGCTGTTGTG
β -actin	CATGTACGTTGCTATCCAGGC CTCCTTAATGTCACGCACGAT
GAPDH	GAAAGGTGAAGGTCGGAGTC GAAGATGGTGATGGGATTTTC

表 1 本研究で用いたプライマー配列

4) RNA シーケンス (RNA-seq)

RNA-seqにおけるRNAの抽出からデータ解析に至るまで、APRO life Science Institue, Inco. に委託した (<http://aproscience.com/item/370/>)。2D及び3D培養細胞は洗浄、回収後速やかにRNAlater (Thermo Fisher Scientific)を用いて処理した。シーケンサーにはIllumina HiSeq2000 (Illumina, Inc.)を用いた。生データからCufflinks software を用いてFPKMを算出し、FPKMが一つでも0とな

る遺伝子は除外した。log₁₀ transformationを行い、有意な発現変化を|fold change| ≥2とした。パスウェイ解析はThe Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database を用いて行った(<http://www.genome.jp/kegg/>)。

5) ウェスタンブロッティング法

培養細胞から各条件で同量のタンパクを抽出し、SDS-polyacrylamide gel (Bio-Rad Laboratories, Inc.)を用いて SDS-PAGE 法にて泳動を行った。polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane (Millipore)に転写を行った後、membrane を TBS-Tween-20 に溶解した 5% (w/v) skim milk を用いて室温で1時間ブロッキングした。その後、一次抗体は 1:500 の希釈濃度で 4°C 一晩、horseradish peroxidase 結合二次抗体(GE Healthcare)で室温 1 時間インキュベートした。二次抗体は Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate(Millipore) を用いて検出した。検討5における定量化には、既報に基づいて Image J を用いて解析した[67]。ウェスタンブロッティング法に関してはいずれも3回以上検討を行い、再現性を確認した後、代表的な画像を記した。

6) フローサイトメトリー

ALDH1陽性細胞の検出にはALDEFLUOR kit (StemCell Technologies)を用いてプロトコルに従って行った。1x10⁶ cellsの細胞をALDH substrate を含む ALDEFLUOR assay bufferに懸濁し、FACSCalibur flow cytometer (BD

Biosciences)を用いてALDH1陽性細胞数を検出した。ネガティブコントロールとして、ALDH inhibitor N,N-diethylaminobenzaldehyde (DEAB) 処理を行ったサンプルを用いた。ALDH1陽性細胞のソーティングには、MoFlo XDP (Beckman Coulter, Inc.)を使用した。

7) ELISA法

培養細胞の上清及び細胞内のactive PAI-1及びactive uPAを、ELISA kit (Innovation Research Inc., カタログ番号 IHPAIkT及びIHUPAKT) を用いてプロトコルに従い検出した。上清は300 x Gで10分間遠心後回収し、すぐに-80°Cで保存した。細胞内のactive PAI-1測定には、0.5% Triton X-100で20分間処理をした。ELISA readerはEPOCH (BioTek)を利用した。

8) サイトカインアレイ

Cytokine array kitはR&D system (カタログ番号ARY005) より購入し、プロトコルに従い行った。

9) 細胞内活性酸素種 (ROS) 測定

培養細胞を剥離後2', 7' -Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; Sigma-Aldrich) を用いて37° C で40分間処理した。洗浄後100 mM H₂O₂ (Wako) で20分間処理した。Fluorescence intensity を FACS Calibur flow cytometerを用いて検出した。

10) メタボローム解析

メタボローム解析における代謝物の検出から解析まで、Human Metabolome Technologies, Inc. (HMT, Inc.)に委託した。同社のC-SCOPEサービスを利用した(<https://humanmetabolome.com/services/c-scope>)。各群 n=3で検討を行い、116 の代謝物が検出された。以下、要約である。CE-MS のカチオンモード、アニオンモードによる測定を実施した。測定対象として、解糖系、ペントースリン酸経路、クエン酸回路、尿素回路、ポリアミン・クレアチン代謝経路、プリン代謝経路、グルタチオン代謝経路、ニコチンアミド代謝経路、コリン代謝経路及び各種アミノ酸代謝経路にて主要な役割を占める116 (カチオン 52, アニオン 64) 種の代謝物質を選出し、解析を行った。これらの代謝物質の絶対定量値を算出し、それぞれの物質を代謝経路に描画した。定量換算には内部標準物質により補正したピーク面積値を用い、各代謝物質について三点からなる検量線を作成して濃度を算出した。

11) FDG-PET/CT

東京大学医学部附属病院において、2010年から2012年の間に卵巣腫瘍の診断で手術を行った患者で、手術の一ヶ月以内にFDG-PET/CTを施行し、かつ術後病理診断が上皮性腫瘍であった患者を最初の対象とし、後方視的にデータベースを解析した。術後診断の内訳は、良性腫瘍13例、境界悪性腫瘍11例、悪性腫瘍26例であった。非悪性腫瘍24例の SUV_{max} 値と、悪性腫瘍26例の SUV_{max} 値を比較した。カットオフ値はROC曲線を用いて検討した。次に、ここで求めたカットオフ値から、悪性腫瘍としては SUV_{max} 値が低値と考えられる症例を抽出した。すなわち、東京大学医学部附属病院において、2012年から2015年の間に卵巣腫瘍の診断で手術を行った患者から SUV_{max} 値が低値と考えられる症例をデータベースから抽出した。PET/CT検査に関しては、画像検査センターなど多施設由来のデータが含まれているため、統一されたプロトコルは存在しないが、代表的なPET/CTのプロトコルを示す。4時間の絶飲食の後、185-370 MBqのFDGを静注し、50分ほど安静の後評価を行った。血清グルコース濃度が200 mg/dl以下であることを事前に確認している。Discovery ST Elite Performance PET/CT (GE Healthcare Corp.)を用いて、頭部から骨盤部まで3.75-mmの幅で通常のプロトコルで解析、再構築した。 SUV_{max} は後述の計算式から求めた。つまり $SUV = C_{dc}/(d_i/w)$ であり、 C_{dc} は病巣部のPET値(becquerel/gram)、 d_i は投与FDG放射能(becquerel)、そして w は患者の体重(gram)である。

12) 免疫蛍光染色及び免疫組織染色

免疫蛍光染色は既報に基づき行われた[33]。誘導後11日から14日のiRCを4% paraformaldehyde を用いて20分間処理、固定した。洗浄後、0.1% Triton X-100 で10分間処理し浸透化を行った。Nonspecific binding sitesは3% BSA を用いて1時間処理しブロッキングを行った。一次抗体反応は1% BSA及び0.3% Triton X-100に溶解した一次抗体を用いて4 ° Cで一晩インキュベートした。一次抗体の検出には適したAlexa Fluor 488- or 594-結合二次抗体を用いて室温で1時間インキュベートした。最後に、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いて核を染色した。画像解析には BZ-X700 fluorescence microscope (Keyence) を用いた。細胞数の解析は、hybrid cell counting BZ-H3C software (Keyence) を用いてDAPIで染まった核の数を計測することで解析した。接着細胞の範囲からランダムに検出箇所を選択し、最低でも3回繰り返し染色された細胞数を測定した。一つの範囲に含まれる細胞数の平均は302 細胞であった。同様の実験、計測を最低3回行った。3D培養におけるparaffin blockの作成やHE染色は Genostaffに委託した (<https://genostaff.com/services/he/>)。paraffin block の作成にはiPGe11 (Genostaff)をプロトコルに従い使用した。

13) 試薬

本検討で用いた抗体、試薬を下記に示す。

抗体	製造会社及びカタログ番号
CD44v6	abcam, ab78960
ASCT2	abcam, ab84903
LAT1	Cell Signaling Technology, Inc., 5347
GLUT1	abcam, ab40084
p-AMPK	Cell Signaling Technology, Inc., 2535
AMPK	Cell Signaling Technology, Inc., 2532
p-FAK (Tyr397)	Life Technologies, 44-624G
FAK	BD Biosciences, 610088
p-S6(Ser 235/236)	Cell Signaling Technology, Inc., 4858
S6	Cell Signaling Technology, Inc., 2217
α -tubulin	Millipore, CP06
p63	abcam, ab735
CK8	Santa Cruz Biotechnology, sc-8020
CK5	abcam, ab24647
CA125	abcam, ab134093
Alexa Fluor 488 anti-mouse	Molecular Probes, A-11059
Alexa Fluor 488 anti-rabbit	abcam, ab150077
Alexa Fluor 594 anti-mouse	Molecular Probes, A-11005
Alexa Fluor 594 anti-rabbit	Molecular Probes, A-11012

表2 本検討において使用した一次抗体及び二次抗体

添加試薬に関しては、recombinant Gremlin 1(終濃度1000ng/ml)はR&D Systems Inc. から、PF 573228 ($1\ \mu\text{M}$)及びAOA(2mM) は Sigma-Aldrichから購入した。

14) 統計解析

平均の比較にはt-testを用いた。P values が 0.05より小さい場合に、統計学的に有意であると判断した。統計解析には主にJMP(SAS Institute)を用いた。メタボローム解析における統計解析には SampleStat 3.14を用いた。RNA-seqの一連の解析には、R 3.2.2 (www.r-project.org)を用いた。

第3章 結果

1. 婦人科癌における CSC 様細胞集団の存在の確認

TGF- β ファミリーの 1 種である BMP は、発生や分化の過程で重要な役割を果たしている [38-39]。Gremlin1 は BMP のアンタゴニストであり、BMP の分化作用を阻害することで、同様に分化に関わっているとされている [40-43]。近年、グリオブラストーマにおいて、CSC が Gremlin1 を分泌することによって周囲の微小環境由来の BMP による分化作用を阻害し、未分化状態を維持しているという研究が報告された [44-45]。

そこで、Gremlin1 が婦人科腫瘍における CSC 様細胞集団の維持に関わっているかを検討した [46]。本検討では子宮頸癌由来細胞株 CaSki 細胞を用いた。CSC 様細胞集団の指標として、未分化マーカー遺伝子の発現、ALDH1 陽性細胞の割合およびスフェロイド形成能を検討した。図 3 に示す様に、Gremlin1 に暴露された細胞集団では、Nanog、Oct3/4、SOX2 といった未分化マーカー遺伝子の発現が上昇していた。同様に、CSC マーカーの一つとされる ALDH1 についても、その陽性細胞数が有意に増加した。

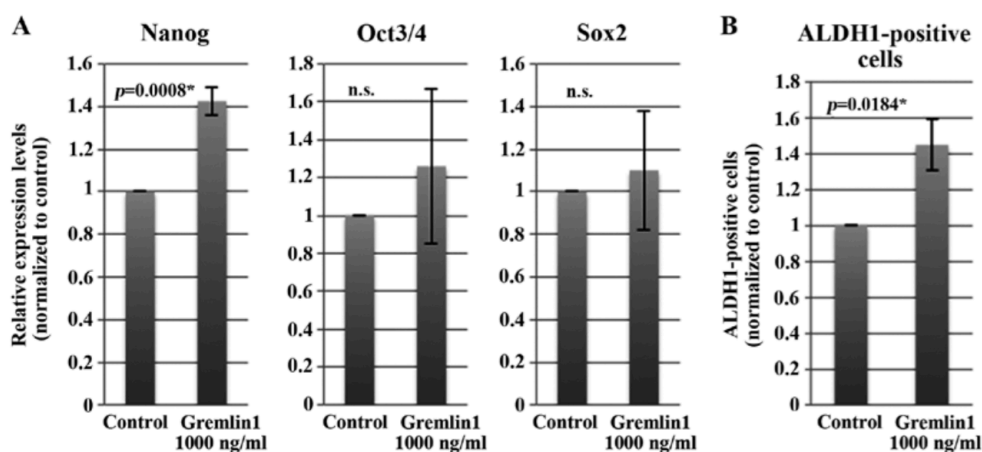


図3 CSC様細胞集団に対するGremlin1の影響

- A. Gremlin1処理による未分化マーカー発現への影響(RT-qPCR)。Gremlin1処理により、有意にNanogの発現が上昇した。Oct3/4、Sox2に関しては、上昇傾向を認めたものの有意ではなかった。平均 ± 標準偏差。n = 3。
- B. Gremlin1処理によるALDH1陽性細胞数への影響。Gremlin1処理により、有意にALDH1陽性細胞の割合が増加した。平均 ± 標準偏差。n = 3。

n. s. : 有意差なし。

同様の処理により、3D 培養系におけるスフェロイドの形成能も増加した(図4)。

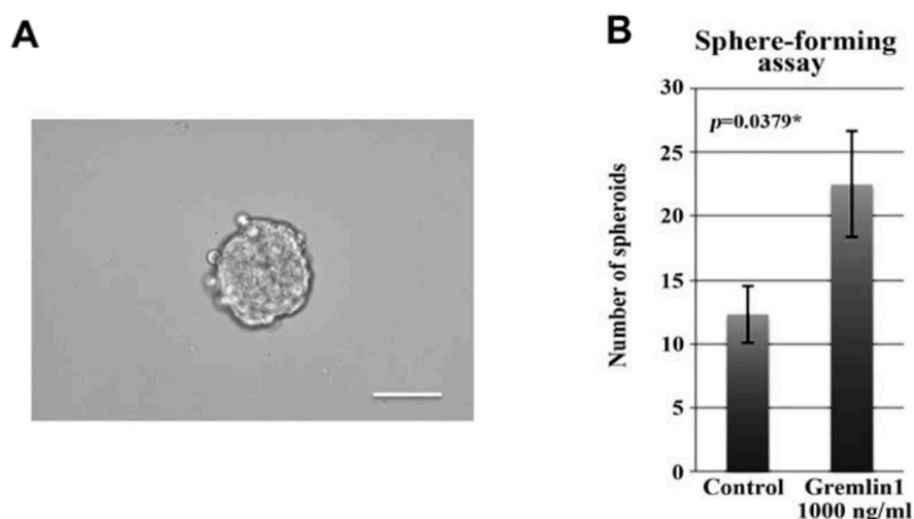


図4 スフェロイド形成能に対するGremlin1の影響

- A. 代表的なスフェロイド像。Gremlin1処理後24時間経過した細胞を低接着性ディッシュに播種し、7日間培養を行った。白線 = 100 μ m。
- B. Gremlin1処理によるスフェロイド形成数の変化。Gremlin1処理により得られるスフェロイドの数が有意に増加した。平均 ± 標準偏差。n = 3。

これらの事実から、婦人科癌においても、CSC 様細胞集団が存在することが示され、また、その維持に Gremlin1 が他の癌種と同様関わっていることが示唆された。

2. CSC 様細胞集団と細胞外基質 (ECM) との関係

次に、CSC は転移に関わっているということの機序を考えるために、CSC 様細胞集団と ECM との関係を検討した[47]。

子宮頸癌の発生源地である子宮頸部の上皮幹細胞集団の周囲には、コラーゲン IV が豊富に存在することが知られている[48]。そこで、CSC 様細胞集団とコラーゲン IV との関係を検討することとした。本検討では検討 1 同様、子宮頸癌由来細胞株 CaSki 細胞を用いた。この実験系を構築するにあたっては、CSC 様細胞集団と非 CSC 様細胞集団を区別して培養する必要があることから、選別の可能なマーカーを用いることで CSC 様細胞集団を抽出することとした。そこで、子宮頸癌における CSC マーカーとして提唱されている ALDH1 に着目して、ALDH1 陽性・陰性細胞とコラーゲン IV の有無との関係を検索した。既報において、子宮頸癌における ALDH1 陽性細胞は ALDH1 陰性細胞に比して、未分化性や分化能、*vivo* における高増殖能を有していることから、CSC 様細胞集団であると考えられている[27-29]。すなわち、本章においては ALDH1 陽性細胞を CSC 様細胞集団として扱い以後の検討を行った。検討項目としては、PAI1 の発現を検討した。ECM の分解に直接関わっているとされるのは MMP2 などのプロテアーゼであるとされるが、MMP を活性化するのに寄与している物質が uPA であり、PAI1 は uPA

を阻害する作用を持っているとされているためである[49-55]。すなわち、PAI1はECMの維持に関与していると言われている。

図5Aに示す通り、ALDH1陽性、陰性に関わらず、コラーゲンIVの存在下ではPAI1の発現が増加していた。実際、これは細胞上清中のタンパク濃度としても確認され(図5B)、細胞内のPAI1濃度に関しても同様の結果が得られた(図5C)。細胞内のPAI1濃度は、ALDH1陽性細胞の方がALDH1陰性細胞に比べて高い傾向にあったが(図5C)、これは、ALDH1陽性細胞においてはALDH1陰性細胞に比べて生成されたPAI1が細胞外へ分泌されにくいという何かしらの機序があると考えれば、PAI1の細胞外濃度の結果(図5B)と矛盾しないと考えられた。

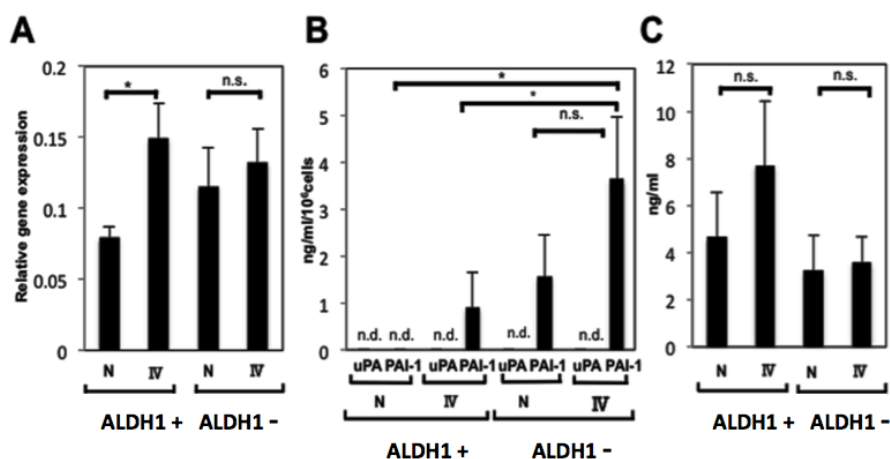


図5 PAI1の発現に対するコラーゲンIVの影響

- A. ALDH1陽性または陰性細胞における、PAI1の発現に対するコラーゲンIVの影響(RT-qPCR)。コラーゲンIVにより、ALDH1陽性細胞、陰性細胞いずれにおいても、PAI1の発現が上昇した。平均 ± 標準偏差。n = 4。
- B. ALDH1陽性または陰性細胞における、PAI1の発現に対するコラーゲンIVの影響(ELISA、細胞上清)。コラーゲンIVにより、ALDH1陽性細胞、陰性細胞いずれにおいても、PAI1の発現が上昇した。平均 ± 標準偏差。n = 6。

C. ALDH1陽性または陰性細胞における、PAI1の発現に対するコラーゲンIVの影響(ELISA、細胞内)。コラーゲンIVにより、ALDH1陽性細胞において、PAI1の発現が上昇傾向を示した。平均 ± 標準偏差。n = 3。

*: $p < 0.05$. n. s. : 有意差なし。N: non-coating plates, IV:collagen-IV coating plates。

以上の結果をまとめると下記のような仮説シエーマとなる(図6)。すなわち、コラーゲンIVの豊富な基底層付近の癌細胞はPAI1を多く分泌し、結果として周囲のECMが安定する。他方、増殖などにより基底層から物理的に離れた癌細胞ではPAI1の発現、分泌が低下し、結果として周囲のECMが脆弱となり、癌細胞が転移しやすくなる、というものである。さらにこれは、非CSC様細胞集団よりもCSC様細胞集団に起きやすい、ということが推察された。これらの結果は、CSCが転移・再発に寄与しているという概念に一致するものであると考えられた。

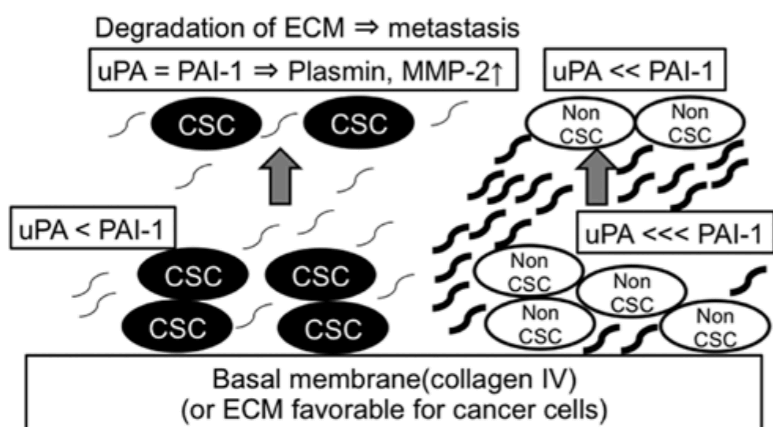


図6 仮説的シエーマ

コラーゲンIVに近接した癌細胞はPAI1を多く分泌し、結果として周囲のECMが安定する。他方、基底層から離れた癌細胞ではPAI1の発現、分泌が低下し、

結果として周囲の ECM が脆弱となり、癌細胞が転移しやすくなる。これらは、non-CSC よりも CSC に起きやすい。

3. CSC 様細胞集団の特性解析 -代謝の観点から-

1 の検討から、婦人科癌においても CSC 様細胞集団が存在することが示唆された。また、2 の検討では、CSC 様細胞集団の特徴の一つとして ECM との関係から、非 CSC 様細胞集団に比べて転移しやすい性質を有する可能性を検討した。以後の検討では、CSC 様細胞集団の特性の中でも特に中核となる特徴を抽出することを目的とした。つまり、治療戦略を構築する上で標的となりうる CSC 様細胞集団の特性解析を行うことを目的とした。本検討においては、CSC 様細胞集団に共通した知見を得るという目的で、卵巣癌由来細胞株 OVTOKO 細胞と子宮頸癌由来細胞株 SiHa 細胞を用いた。

ところで、メタボローム解析の開発・普及により、近年代謝が注目されている。生命の維持には、マイクロレベルであれマクロレベルであれエネルギーが必要となるが、細胞レベルではそのエネルギーとは ATP である。この ATP を得る回路が代謝系であり、遺伝子発現の変化や発現タンパクの変化というのは、この代謝系を動かす手段に他ならない。すなわち代謝の変化こそが細胞レベルでの表現系であり、この解析を行うことは、その細胞が生体内でどのように振る舞うか（癌細胞であれば悪性度が高いか、など）ということと密に関わると考えられる。つまり、代謝こそ「究極の表現系」として、様々な研究がなされている [56-64]。

そこで、CSC 様細胞集団の特性解析として代謝を検討することとした[65]。その際、既存の CSC マーカーで細胞を選別した場合には、単にそのマーカーによる代謝変化をとらえてしまう可能性がある。例えば、卵巣癌においては CD44v6 が CSC マーカーとして提唱されているが、同時にこの細胞表面抗原はシスチントランスポーターと相互作用をすることが知られているため、CD44v6 の陽性・陰性のみで細胞を選別し代謝を解析することは、シスチン代謝等の変化が強調してとらえられてしまう可能性があるということである[66]。そこで、なるべく恣意的でない CSC 様細胞集団の抽出方法として、当研究室では 3D 培養によるスフェロイドの形成を行っている[67]。

簡単なプロトコルを図 7A に示す。通常培養した細胞を播種する際に、従来のプレート(2D 培養)ではなく、低接着性プレート(3D 培養)に播種することによって、図 7B に示すようなスフェロイドが得られる。このスフェロイドは文献的にも腫瘍系性能が高く CSC 様の特徴を有していると考えられている[57, 68-69]。

子宮頸癌細胞に関してはスフェロイドが CSC 様細胞集団としての特徴を有していることを当研究室においても既報にて示している[67]。卵巣癌由来細胞株(OVTOKO)に関しても、図 7C に示す通り、3D 培養によって得られたスフェロイドにおいて、通常の 2D 培養で得られた細胞集団に比して、CD44v6、ALDH1 といった CSC マーカーを発現している細胞の割合が多いことを確認した。本研究ではこのスフェロイドが vivo において高い増殖能や分化能を有していることを検証はしていないが、CD44v6 や ALDH1 陽性細胞が CSC 様細胞集団であるとする既報やスフェロイド形成細胞自体が CSC 様細胞集団であるとする既報が存在するこ

とから[66, 68-69]、この3D培養細胞(スフェロイド)と2D培養細胞(通常培養細胞)の差を検討することが、CSC様細胞集団と非CSC様細胞集団の特性の違いの知見を得る実験系になりうると考えた。すなわち、本検討(検討3、図7以降の検討)を含め以後の検討(検討4、5)では、3D培養細胞(スフェロイド)をCSC様細胞集団と定義し、2D培養細胞(通常培養細胞)を非CSC様細胞集団として扱った。

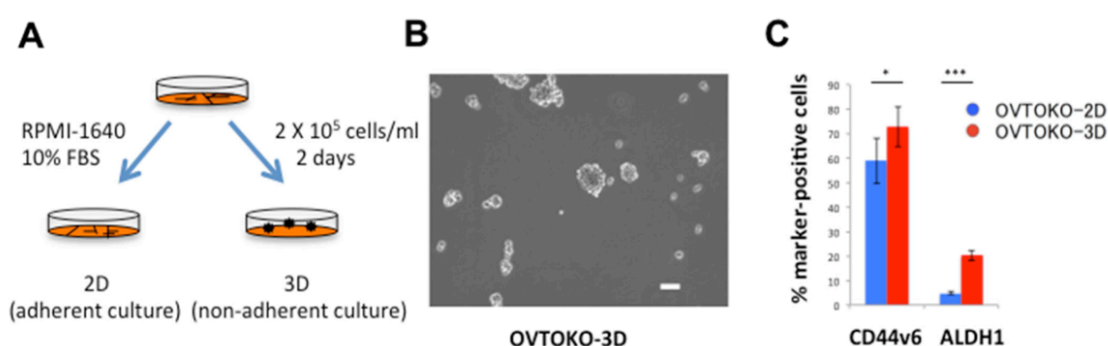


図7 CSC様細胞集団の単離

- A. 本実験のプロトコルシエーマ。培養細胞を通常のディッシュ(2D培養)、及び低接着性ディッシュ(3D培養)にて培養した。
- B. 代表的な3D培養細胞像。3D培養細胞は、スフェロイドを形成した。白線 = 100 μ m.
- C. CSCマーカー陽性細胞数。OVTOKOの3D培養細胞(OVTOKO-3D)は、OVTOKOの2D培養細胞(OVTOKO-2D)と比較し、有意に効率にCSCマーカーを発現していた。実験は少なくとも最低3回繰り返した。平均 \pm 標準偏差。***: $p < 0.001$ 、*: $p < 0.05$ 。

図8の通り酸化ストレスにおいてもCSC様細胞集団及び非CSC様細胞集団で異なる結果が得られ、スフェロイドが酸化ストレス抵抗性を示すことが考えら

れた。CSC様細胞集団と非CSC様細胞集団では、代謝が異なる可能性が示唆され、次のメタボローム解析へと進んだ。

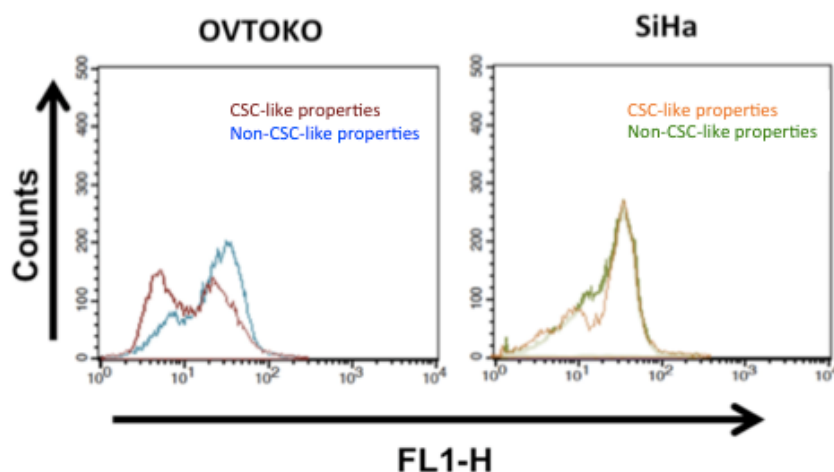


図8 細胞内活性酸素種 (ROS)

OVTOKOやSiHaのCSC様細胞集団においては、ROSの分布は二峰性を示した。これらの分布は、スフェロイド内においても代謝の観点から不均一性が存在することがうかがわれた。

メタボローム解析では、CSC様細胞集団と非CSC様細胞集団による細胞内代謝の違いを検索した。対象と方法の項に記載した通り、メタボローム解析では細胞内のアミノ酸など116種類の代謝物の定量値を求める解析である[70, 71]。

OVTOKO、SiHaという2種類の細胞株を用いたため、計4通りの細胞群を検討することになる。それら4群の代謝物を、主成分分析(PCA)によって解析した。図9に示す通り、4群は明確に分離された。特に、第二主成分(PC2)がCSC様細胞集団培養と非CSC様細胞集団の違いを反映していることが示唆された。

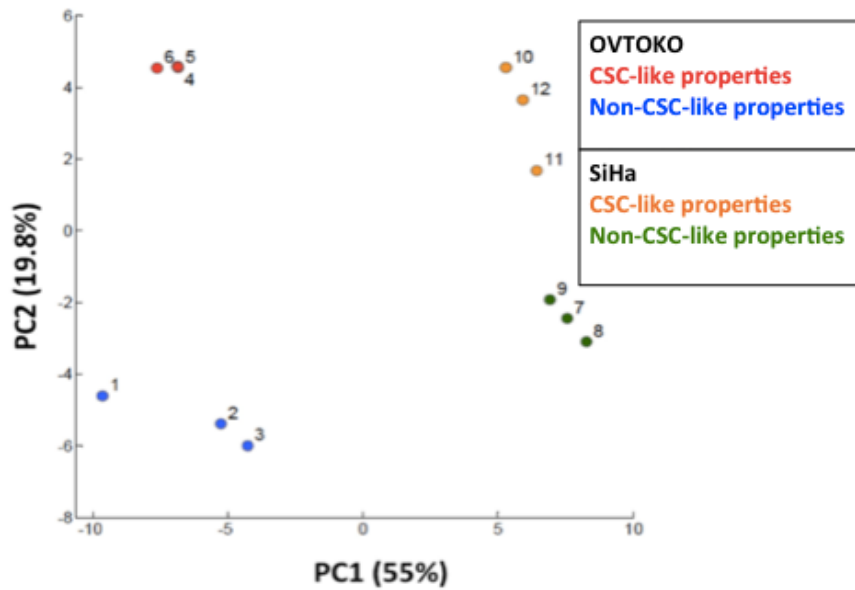


図9 主成分分析(PCA)結果

PCAによって4群が分けられた。主成分1(PC1)は細胞種を反映していると考えられ、主成分2(PC2)は培養条件の違い、すなわちCSC様細胞集団培養と非CSC様細胞集団の違いを反映していると考えられた。各群 n = 3。

そこで、PC2を説明する因子を抽出した。表3に示す通り、特にセリン(Ser)、アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)、グルタミン(Gln)といったアミノ酸が、PC2を説明する因子であった。

Metabolites (Top 30)	Factor loadings	Metabolites (Bottom 30)	Factor loadings
Ser	2.3E-01
Asp	2.2E-01	Asn	-3.2E-02
Glu	2.0E-01	Xanthine	-3.4E-02
Gln	1.7E-01	Cystathionine	-4.0E-02
Creatine	1.7E-01	Ribose 1-phosphate	-4.1E-02
<i>N</i> -Carbamoylaspartic acid	1.6E-01	Ala	-4.9E-02
NADH	1.5E-01	2-Oxoisovaleric acid	-5.1E-02
Gly	1.5E-01	2-Phosphoglyceric acid	-5.4E-02
Succinic acid	1.5E-01	Hydroxyproline	-6.7E-02
Carnitine	1.4E-01	Adenosine	-7.1E-02
Glutathione (GSH)	1.4E-01	Citrulline	-7.6E-02
GDP	1.4E-01	Carnosine	-9.1E-02
Glutathione (GSSG)	1.4E-01	3-Phosphoglyceric acid	-9.3E-02
NADPH	1.4E-01	cAMP	-9.6E-02
Malic acid	1.4E-01	Lys	-9.6E-02
cGMP	1.3E-01	Lactic acid	-9.7E-02
Citric acid	1.3E-01	Galactose 1-phosphate	-1.0E-01
ADP	1.3E-01	IMP	-1.1E-01
GMP	1.2E-01	Glucose 1-phosphate	-1.2E-01
Argininosuccinic acid	1.2E-01	Pro	-1.2E-01
Fumaric acid	1.2E-01	PRPP	-1.2E-01
γ -Aminobutyric acid	1.1E-01	Acetyl CoA	-1.3E-01
AMP	1.0E-01	Urea	-1.3E-01
2-Hydroxyglutaric acid	1.0E-01	Arg	-1.3E-01
Adenylosuccinic acid	1.0E-01	Inosine	-1.3E-01
2-Oxoglutaric acid	1.0E-01	Phosphoenolpyruvic acid	-1.3E-01
NADP ⁺	1.0E-01	Dihydroxyacetone phosphate	-1.4E-01
CoA	9.4E-02	Ornithine	-1.5E-01
Malonyl CoA	9.4E-02	Glyceraldehyde 3-phosphate	-1.6E-01
<i>cis</i> -Aconitic acid	9.3E-02	XMP	-1.7E-01
...	...	Ribose 5-phosphate	-1.7E-01

表3 PC2を説明する因子（上位及び下位30位）

上位30の代謝物は、セリンやアスパラギン酸、グルタミン酸など、TCAサイクルを効率良く回すことに用いられるアミノ酸であった。下位30の代謝物は、解糖系及びペントースリン酸回路などの中間代謝物が主であった。

実際、図 10 に示す通り CSC 様細胞集団は非 CSC 様細胞集団に比べて、各アミノ酸の濃度が有意に上昇していた。

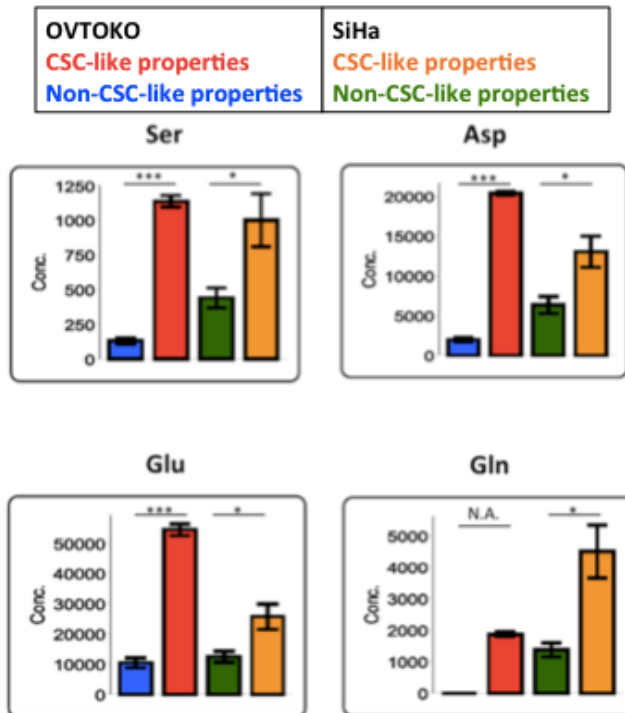


図10 PC2上位のアミノ酸

CSC様細胞集団において、有意にアミノ酸濃度は高値であった。平均 ± 標準偏差。縦軸: pmol/10⁶ cells。***: p < 0.001、*: p < 0.05。N.A.: 算出不能。測定方法に関しては第2章を参照。本結果はメタボローム解析によって得られた結果の一部である。

これらのアミノ酸はTCAサイクルを効率良く機能させる役割を果たしていることが知られている[61, 63-64, 72]。実際、図11に示す通り、CSC様細胞集団における総アデニレートは非CSC様細胞集団の総アデニレートに比して高濃度であることが示された。

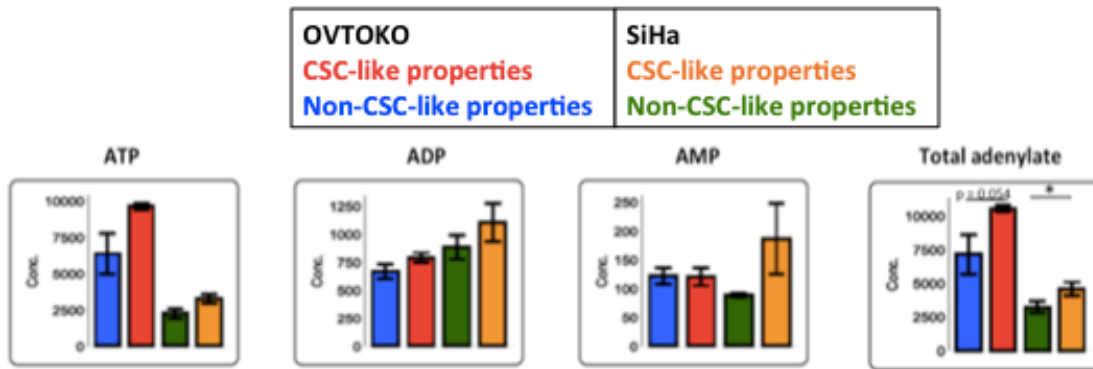


図11 培養条件の違いによる、アデニレート量の変化

CSC様細胞集団において、総アデニレート量は増加していた。平均 ± 標準偏差。縦軸: pmol/10⁶ cells。*: p < 0.05。測定方法に関しては第2章を参照。本結果はメタボローム解析によって得られた結果の一部である。

以上の結果から、CSC 様細胞集団に特徴的な代謝として、TCA を活用し効率的に ATP を得ているという特性が推察された。

4. 生体内におけるグルタミン代謝の意義

上記のように、CSC 様細胞集団が TCA サイクルを活用している可能性があるということは非常に興味深い結果である。というのは、正常細胞は酸素のある環境では TCA サイクルを活用し、酸素の得られない環境において酸素を必要としない解糖系に代謝を切り替えることに対して、癌の代謝は元来、「十分な酸素下であったとしても解糖系を行っている」と考えられてきたからである[56]。これは「好氣的解糖」や「ワーブルグ効果」とも言われており、これによって癌細胞が低酸素状態などに曝されても、増殖能を維持するのに役立っていると考えられてきた[56]。しかし代謝には、グルタミン中毒という言葉があるよう

に、癌細胞自体は必ずしも糖代謝（ワーブルグ効果）にのみ依存しなくても良いはずである[61]。実際、本研究で行ったメタボローム解析の結果からも、CSC様細胞集団にはグルタミン・グルタミン酸が蓄積していた。

そこで、生体内における癌細胞の代謝の手がかりを得るために、臨床におけるPET/CTの結果の検討を行った[73]。PET/CTとは、糖代謝の勢いを反映するものである。癌細胞は糖代謝を専ら活用しているという考えのもと、PETにおける取り込みが正常細胞に比べて上昇するというものである[74-75]。本検討において目的としたことは、検討3の*vitro*における実験で考察したような糖代謝を活性化していない癌というものが（それがCSC様細胞集団であるかどうか以前に）存在するのかを確認するということと、仮にそうした癌が実際に存在するのであればどのような特徴を有しているのかを検索するということ（例えば組織型により異なる、腫瘍の部位により異なる、進行期により異なる、など）、そしてそこからCSC様細胞集団に関係する知見が得られるかどうかを検討する、ということである。

まず、「PETにおける取り込みが高い・低い」ことの基準値を得るために、非悪性細胞と悪性細胞のPETにおける取り込みの程度を比較した。指標としてはSUVmaxを指標とした。

図12Aに示す通り、悪性細胞におけるSUVmaxは、非悪性細胞のSUVmaxに比べて有意に高値を示した。卵巣腫瘍を扱う臨床におけるPET/CTの活用方法・診断意義に関しては必ずしも結論は得られていないが、少なくとも本検討においては悪性・非悪性の区別に用いることができると考えた。図12Bに示す通りROC

曲線を用いてそのカットオフ値を検討したところ、 $SUV_{max} = 3.6$ が、一つの目安となった。

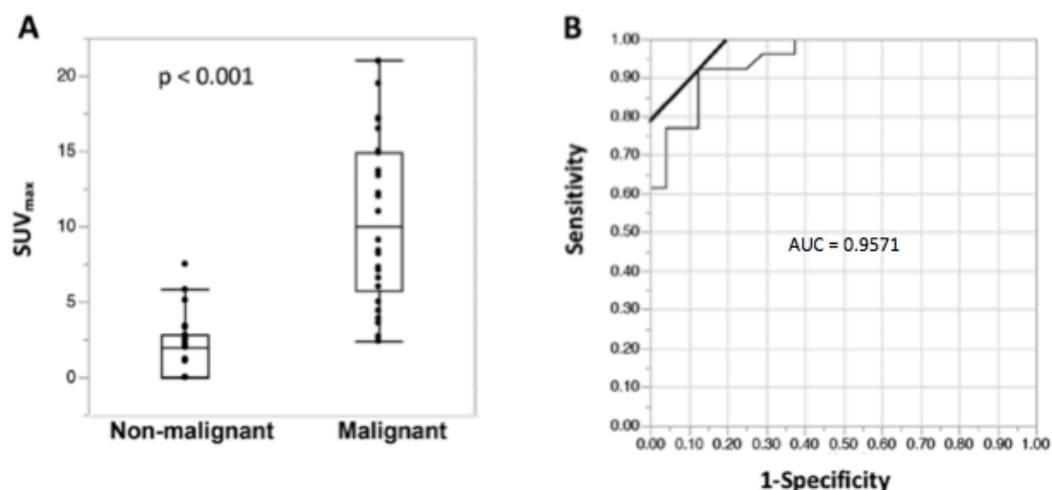


図12 診断的 SUV_{max} の値

- A. 非悪性腫瘍と悪性腫瘍の SUV_{max} 値。上皮悪性腫瘍では SUV_{max} 値が有意に高かった($p < 0.001$)。
- B. ROC曲線。カットオフ値を3.6とすると、感度・特異度がそれぞれ0.92、0.88となった。

次に、卵巣癌患者でPET/CTを施行した患者において、 SUV_{max} が低値を示す癌を検索した。前述の通りカットオフ値自体は3.6となったが、年度の異なる患者から抽出するために実験誤差があり得ることや、糖代謝を活性化していない癌を広く抽出するという意味で、 SUV_{max} が4.0未満の症例を検索した。結果は表4のようになった。表に示す通り、 SUV_{max} が低値を示す癌種のほとんどは卵巣明細胞腺癌であった。

Patients	Age (years)	Stage	Histology	SUV _{max}
1	70	I	clear	2.7
2	43	I	clear	3.6
3	43	I	clear	3.9
4	64	II	clear	3.9
5	51	I	other	3.3
6	65	I	clear	3.1
7	54	III	other	3.5
8	36	I	clear	2.3

表 4 SUV_{max} が低値である癌症例の特徴

SUV_{max} が 4.0 未満の症例を抽出した。患者 5 は漿液粘液性腺癌、患者 7 は明細胞腺癌+類内膜腺癌の混合癌、残りは全て明細胞腺癌 (clear) であった。

つまり、卵巣明細胞腺癌は他の癌腫に比べると、癌でありながらも糖代謝を活用していないと考えられた。検討 3 の結果とあわせて、卵巣明細胞腺癌において CSC 様細胞集団の割合が高ければ表 4 の結果を説明できるのではないかと考えた。

そこで以下、卵巣明細胞腺癌の代謝の特徴を vitro で検索することとした。OVTOKO、OVISE、JHOC5 という 3 種類の卵巣明細胞腺癌細胞株を用いた。さらに、検討 3 と同様に 2D 培養、3D 培養 (スフェロイド形成培養) を行うことで非 CSC 様細胞集団、CSC 様細胞集団を得、両者の代謝を比較した。代謝の比較方法としては、代謝に関わる輸送体のタンパク発現と、代謝のセンサーと言われる AMPK のリン酸化を比較した。いずれの細胞株においても、CSC 様細胞集団では非 CSC 様細胞集団に比して ASCT2 (グルタミン酸の流入トランスポーター) の発現が横ばいもしくは増加しており、逆に LAT1 (グルタミン酸流出トランスポーター) の発現は減少していた (図 13A)。糖代謝の指標とされる GLUT1 の発現に関しては、

JHOC5 以外の 2 種類の細胞株で、CSC 様細胞集団では非 CSC 様細胞集団に比して発現が低下していた。一方、AMPK(糖代謝スイッチ)のリン酸化は CSC 様細胞集団で非 CSC 様細胞集団に比べて低値であった(図 13B) [76]。これらの vitro の結果からは、細胞株による違いはあるものの、CSC 様細胞集団では非 CSC 様細胞集団に比べて糖代謝ではなくグルタミン酸代謝に依存している可能性を示唆した。

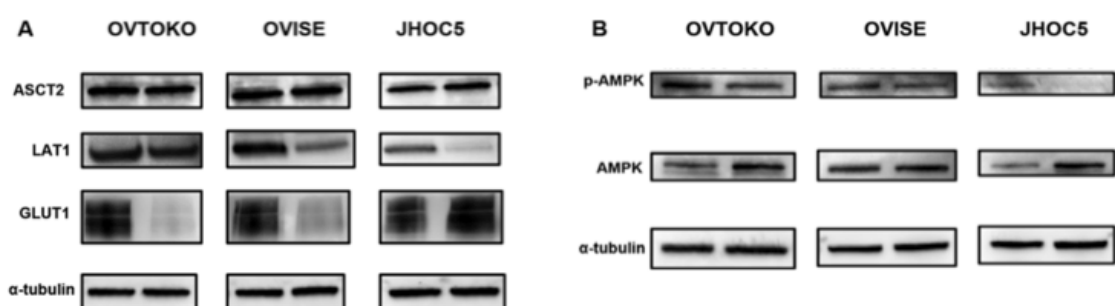


図13 CSC様細胞集団、非 CSC様細胞集団におけるトランスポーターや代謝センサーの発現

- A. 各種トランスポーターの発現。CSC様細胞集団では非 CSC様細胞集団に比してASCT2(グルタミン酸の流入トランスポーター)の発現が横ばいもしくは増加しており、逆にLAT1(グルタミン酸流出トランスポーター)の発現は減少していた。GLUT1(グルコース流入トランスポーター)の発現はOVTOKO、OVISEで低下していた。
- B. AMPKのリン酸化。糖代謝スイッチと言われるAMPKリン酸化は、CSC様細胞集団では非 CSC様細胞集団に比べて低発現であった。

各群左：非 CSC様細胞集団、右：CSC様細胞集団。

以上の結果は下記のように解釈された。PET/CTの結果からは卵巣明細胞腺癌は糖代謝に比較的依存しない癌種であると考えられた。一方で、 vitro

実験の結果からは、同一の卵巣明細胞腺癌由来の細胞であっても CSC 様細胞集団と非 CSC 様細胞集団において代謝が異なる可能性が示唆され、非 CSC 様細胞集団は糖代謝に比較的依存していると考えられた。統合して考えると、PET/CT において卵巣明細胞腺癌の糖代謝が比較的活性化されていなかった理由として、卵巣明細胞腺癌における CSC 様細胞集団の割合が高いためではないかと考えた。

5. グルタミン代謝を標的とした、新規治療標的の探索

3、4 の検討から、子宮頸癌や卵巣癌において、グルタミン代謝が治療標的として有望であるように思われた。他方、代謝というのは様々なサルベージ回路が存在したり、細胞の状態や微小環境の変化によって切り替わりが起こったりするため、単一の代謝酵素を阻害することは文献的には必ずしも好ましい結果が得られていない[64]。

そこで、代謝とは別の階層(系)での、標的の探索を検討した[77]。

具体的には、3 と同様のプロトコル・細胞群(OVTOKO および SiHa の CSC 様細胞集団と非 CSC 様細胞集団)を用いて、メタボローム解析と同様に網羅的解析の 1 つである RNA シーケンス(RNA-seq)を行った。

OVTOKO、SiHa それぞれで有意に変化のあった経路を図 14 に示す。その中で、両者で共通に変化のあった経路は Focal adhesion 経路のみであった。この経路は、インテグリンなどの接着等をスイッチとした、FAK というタンパクを中心と

する経路である。

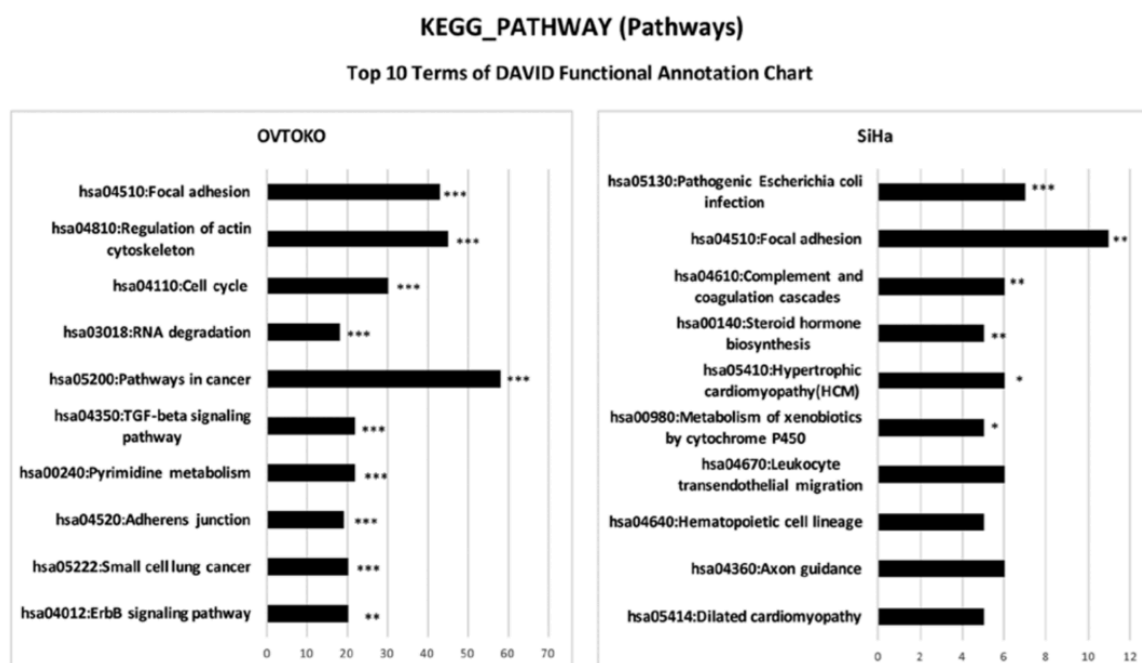


図 14 RNA シークエンス結果 (CSC 様細胞集団と非 CSC 様細胞集団の発現比較)

OVTOKO 及び SiHa の両者で共通に変化のあった経路は Focal adhesion 経路のみであった。***: $p < 0.001$ 、**: $p < 0.01$ 、*: $p < 0.05$ 。

実際、図 15 に示す通り各細胞株において、CSC 様細胞集団において非 CSC 様細胞集団と比べて、FAK のリン酸化が増加していた。

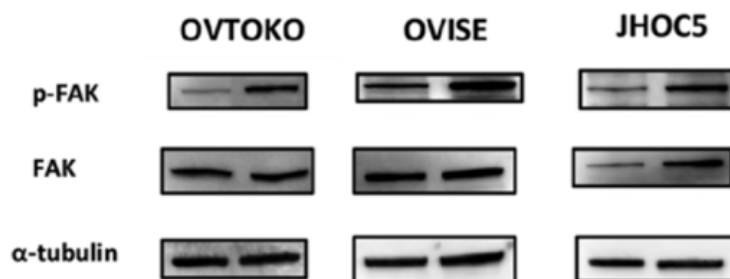


図 15 FAK のリン酸化

各細胞株において、CSC様細胞集団において非CSC様細胞集団に比べて、FAKのリン酸化が増加していた。各群左：非CSC様細胞集団、右：CSC様細胞集団。

FAK 自体は卵巣癌（漿液性腺癌）の治療標的として既に注目されており、諸外国では臨床治験も行われている [78-81]。図 16 に示す通り、FAK のリン酸化阻害剤である PF573228 を用いることで、CSC 様細胞集団、非 CSC 様細胞集団のいずれにおいても FAK のリン酸化を阻害することができた。しかしながら図 16 の結果は、PF573228 処理によっても、CSC 様細胞集団における FAK のリン酸化状態は、PF573228 処理のない非 CSC 様細胞集団の FAK のリン酸化状態以下に低下させることができなかつた、と解釈することにもつながると考えられた。

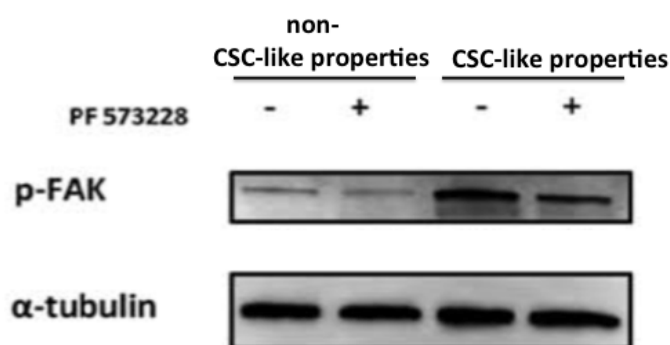


図 16 FAK 阻害剤 PF573228 の有効性

PF573228 処理により、CSC 様細胞集団、非 CSC 様細胞集団のいずれにおいても、FAK のリン酸化を阻害することができた。ただし、PF573228 処理によっても、CSC 様細胞集団における FAK のリン酸化状態は、PF573228 処理のない非 CSC 様細胞集団の FAK のリン酸化状態以下に低下させることができなかつた。

そこで、CSC 様細胞集団を治療標的とした際に相乗効果が得られることを期待して、グルタミン代謝と FAK のリン酸化を同時に阻害することを検討した。

前述の通り、FAK 阻害の可能性に関しては既に卵巣漿液性腺癌において見いだされていることから、本検討においては卵巣明細胞腺癌に注目して実験を行った。

CSC 様細胞集団に対して、グルタミン代謝の阻害剤(代謝酵素の一つである GOT1 を阻害する AOA)と、PF573228 の相乗効果を検討した[64, 82-83]。

評価項目として、卵巣癌で専ら効果判定や治療標的に使用される mTOR 経路の下流である、S6 のリン酸化を検討した[84-85]。

図 17 に示す通り、OVICE、JHOC5 では AOA と PF573228 の相乗効果が確認された。他方、OVTOKO では AOA、PF573228 いずれも単独での効果は認められるものの、併用ではむしろ S6 のリン酸化が増加していた。前述のように、これは何かしらのサルベージ回路の存在を示唆するものかとは考えられたが、逆に対象を選べばグルタミン代謝と FAK の併用が CSC 様細胞集団を標的とした治療として有望である可能性が示唆された。

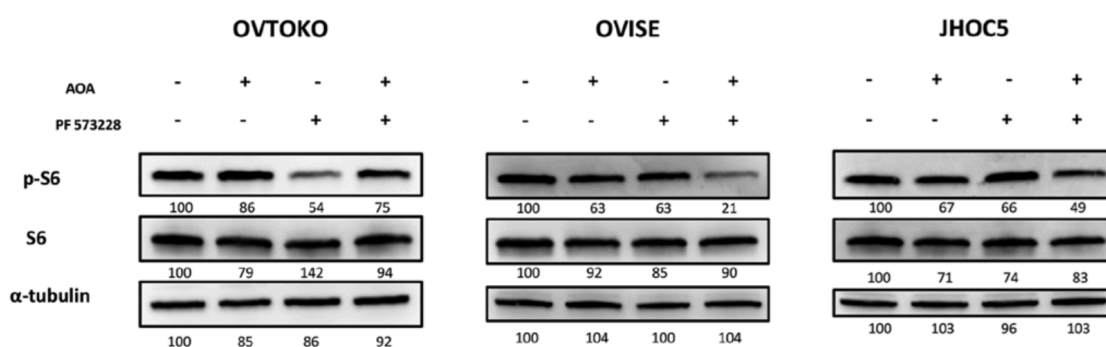


図 17 mTOR 経路を標的とした、グルタミン代謝及び FAK のリン酸化阻害による相乗効果

3D 培養細胞(CSC)に対して、AOA 及び PF573228 を使用することで、mTOR 経路の下流である S6 のリン酸化が阻害された。ただし、OVTOKO では AOA、PF573228 いずれも単独での効果は認められるものの、併用ではむしろ S6 のリン酸化が増加していることから、何かしらのサルベージ回路の存在が示唆された。ウェスタンブロットの定量化には Image J を用いた[67]。同様の実験を 3 回以上行い、

再現性を確認した。図および定量値は代表的な実験結果である。PF 573228 は終濃度 $1\ \mu\text{M}$ 、AOA は終濃度 2mM で用い、48 時間培養した。

6. 新たな CSC モデルの樹立の試み

3-5 で示した通り、CSC 様細胞集団を対象としたメタボローム解析や RNA シーケンスによる網羅的解析によって、新たな有望な治療標的を見出すことができると考えられた。

ただし、こうした研究に用いられる細胞は、文献的にも既存の樹立された細胞株であることが多い。しかしながら、細胞株は培養をしやすいというメリットがある反面、継代を重ねており必ずしも得られた知見が生体内での特徴を反映しているとは限らない。他方、臨床サンプルから得られたプライマリー細胞は継代など培養の確立が難しく、また、個体間差異もあり得るため、やはり CSC 様細胞集団の探索として適切であるかはわからない。

そこで、そうした限界の打開策として、多能性幹細胞 (iPS 細胞) から CSC モデルを樹立する方法論を探索することとした [86]。iPS 細胞から CSC モデルを樹立するプロトコルを作成できれば、理論的には各患者からそれぞれの特徴に応じた CSC モデルを誘導できるという理屈である。

CSC の起源には諸説ある。すなわち、(1) 正常幹細胞が癌化する (2) 正常上皮幹細胞が癌化する (3) 分化後の上皮が、癌化の過程で脱分化する・脱分化後に癌化する、というものである。iPS 細胞が作成可能となったことから明らかなように、(1)-(3) のいずれも有り得るとするのが共通認識である [6, 87-88]。

婦人科癌における発癌メカニズムに関しては、特に子宮頸癌が詳細に研究されている。子宮頸部には扁平上皮・円柱上皮境界(S-C junction)が有り、そこには扁平上皮にも円柱上皮にも分化しうる上皮幹細胞(リザーブ細胞)が存在すると言われている。このリザーブ細胞にヒトパピローマウイルス(HPV)が感染し、HPV由来の癌タンパクであるE6、E7が持続発現することで、異形成を経て癌化すると考えられている[89]。このプロセスは前述の(2)に相当すると考えられるが、この各段階のプロセスが詳細に検討されていることから、子宮頸癌はCSCの研究に適していると考えた。つまり、iPS細胞からリザーブ細胞を誘導することができれば、そこから子宮頸癌のCSCの特徴を見出すことができるという仮説である。さらに、この方法論(iPS細胞から上皮幹細胞を誘導すること)が確立されれば、他の癌種にも応用可能であると期待された。

プロトタイプの作成として、iPS細胞株である201B7株を用いた[30]。誘導の理論は発生学を根拠とした。つまり、子宮は発生学上ミューラー管由来であり、ミューラー管は中間中胚葉(IM)由来であることから、iPS細胞からIMを誘導し、さらにそこからリザーブ細胞を誘導することを検討した[90-93]。誘導した細胞をiPS細胞由来リザーブ細胞様細胞、iRCと命名した。IMの誘導に関しては既報に準じた[31-32]。そこからiRCの誘導は試行錯誤によったが、頸部上皮細胞で用いられる培養液(Keratinocyte-SFM)と、子宮頸部に豊富に存在するコラーゲンIVでディッシュをコーティングするという組み合わせを利用することとした。プロトコルのシェーマを図18に示す。iRCのマーカーとして、上皮幹細胞のマーカーとして、p63、CK5、CK8を用いた。p63は基底層に存在する前

駆細胞のマーカ―として広く用いられており、CK5 と CK8 は未分化なサイトケラチンとしてしばしば用いられているからである[94-98]。S-C junction のマーカ―としては既報に従い CK7、AGR2、CD63、MMP7、GDA の発現を検索した[94]。ミューラー管由来のマーカ―として ER α 、ER β 、CA125 の発現を検討した[94-98]。

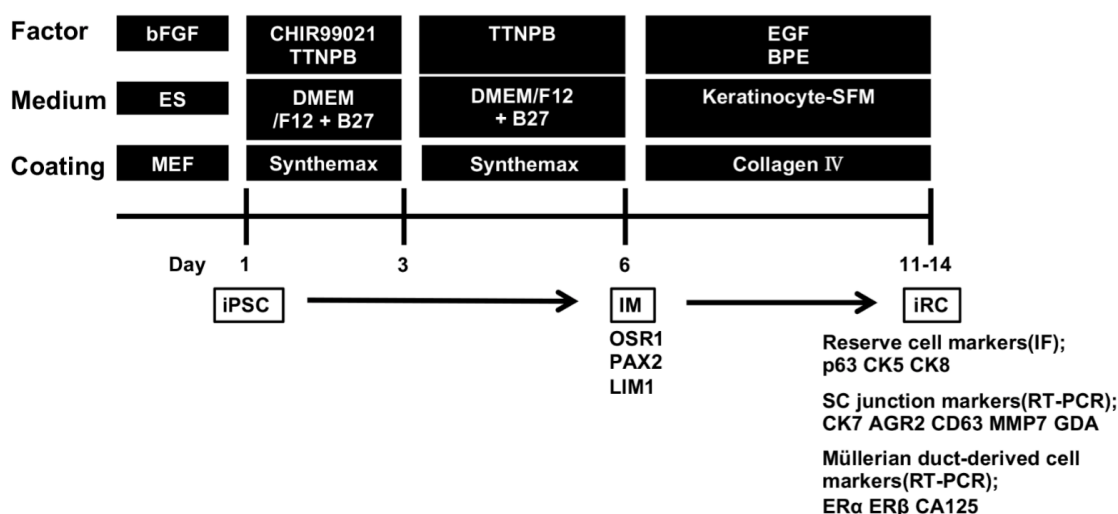


図18 誘導プロトコルのデザイン

プロトコルは主に2つの部分からなる。前半はIMの誘導であり、後半はIMから上皮細胞の誘導である。

誘導後11日前後の代表的なiRCの画像を図19に示す。細胞質に比較し腫大した核が認められ、リザーブ細胞の病理学的特徴としては矛盾しない所見であった。

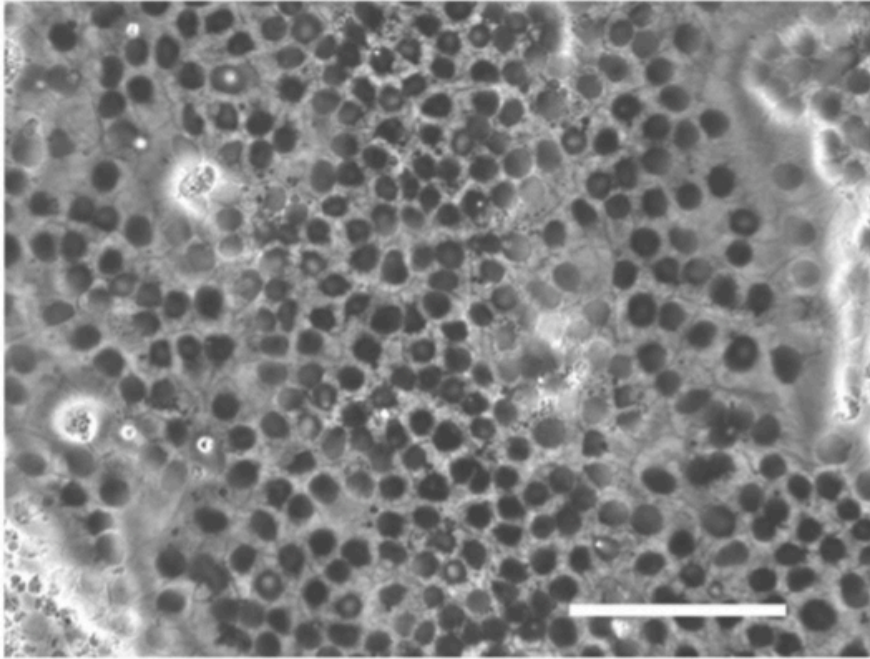
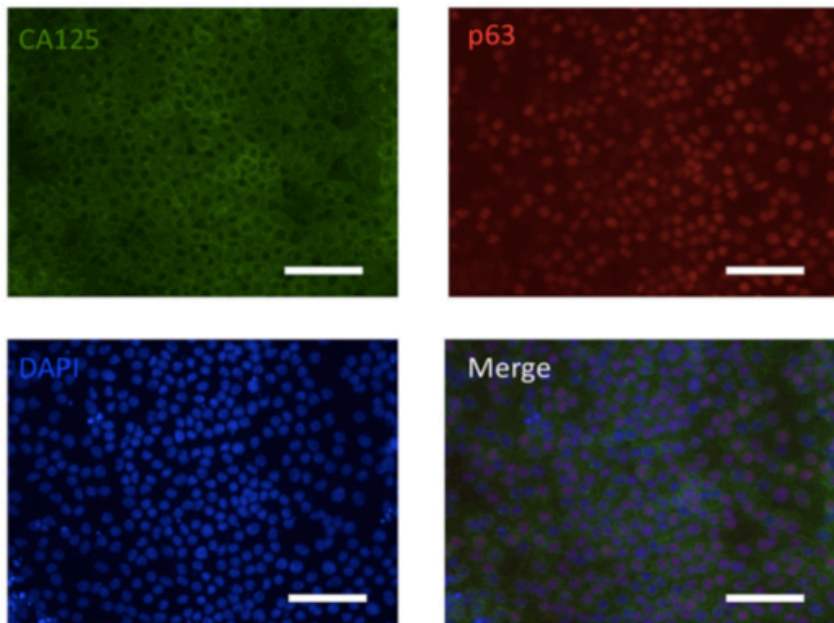


図 19 iRC の位相差顕微鏡像

代表的な iRC 像。核は類円形で核細胞質比が高かった。白線 = 100 μ m。

各種蛍光免疫染色の結果を図 20 に示す。約 70%程度の細胞が、上皮幹細胞のマーカーとして考えた p63、CK5、CK8 が陽性であった。コンフルエンス後の時間によっては細胞が盛り上がるがあった(垂直方向への進展)。図 20 では A より B の方がコンフルエンス後の時間が経っていた。

A



B

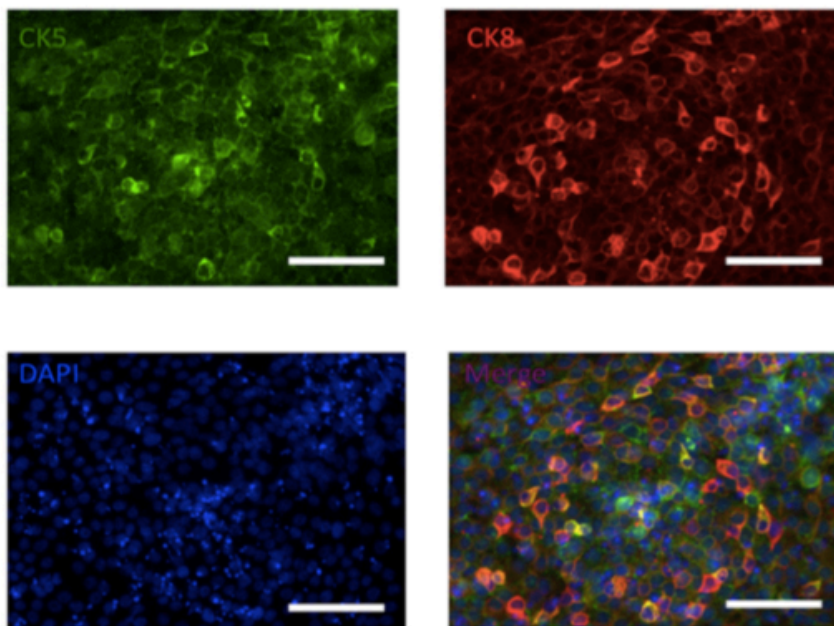


図20 リザーブ細胞マーカーの発現

A. CA125およびp63の発現。p63は基底層の前駆細胞のマーカー、CA125はミューラー管由来細胞のマーカーとして用いた。

B. CK5およびCK8の発現。いずれも未分化なサイトケラチンのマーカーとして用いた。

誘導後11-14日目のiRC像。約70%以上の細胞が、リザーブ細胞マーカー陽性であった。コンフルエンス後の時間によっては細胞が盛り上がるがあった(垂直方向への進展)。図ではAよりBの方がコンフルエンス後の時間が経っていた。白線 = 100 μ m.

遺伝子発現の組み合わせとしては、各種 S-C junction マーカーを発現していた(図 21)。コントロールとして内頸部よりの頸部上皮細胞(Endocervix)、外頸部よりの頸部上皮細胞(Ectocervix)を用いた。遺伝子発現の組み合わせは、Endocervix に似ていたが、これはリザーブ細胞が円柱上皮の下に位置し、円柱上皮様の特徴を有するという既報とも矛盾しない結果であった[94]。

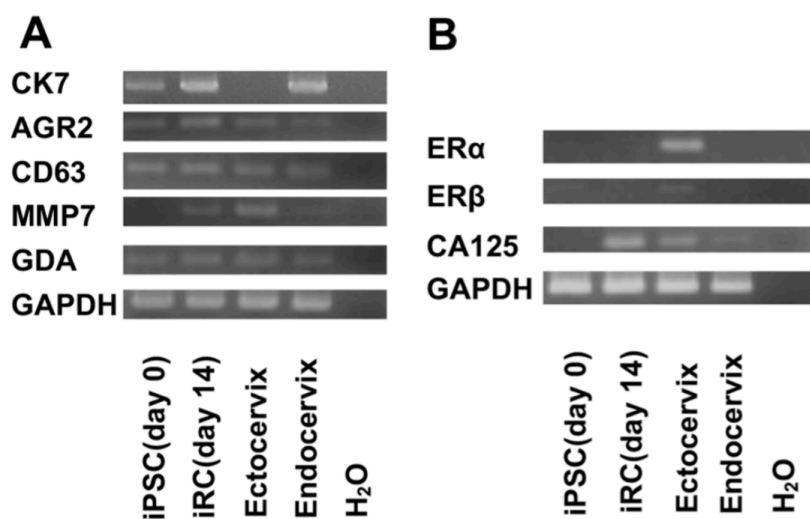


図21 iRCにおけるSC junctionマーカー及びミューラー管マーカーの発現

A. 誘導前(iPS細胞)及び誘導後(iRC)におけるSC junctionマーカーの発現(RT-PCR)。iRCの発現パターンは、Endocervixのそれと似ている。

- B.** 誘導前(iPS細胞)及び誘導後(iRC)におけるミュー管マーカ―の発現(RT-PCR)。iRCはER α 及びER β は発現していないが、CA125を発現していた。これは(A)同様、Endocervixに似た発現パターンであった。

リザーブ細胞の特徴は、円柱上皮にも扁平上皮にも分化しうることである[26, 95]。そこで、第2章に記載の方法でiRCを3D培養することで、それぞれへの分化能を検討した。マトリゲル内での培養では、図22Aに示すように腺様の細胞集団を形成した。また図22Bに示すように、ALI培養では扁平上皮様の発育を認めた。Vitroでの実験ではあるが、iRCの分化能が確認された。

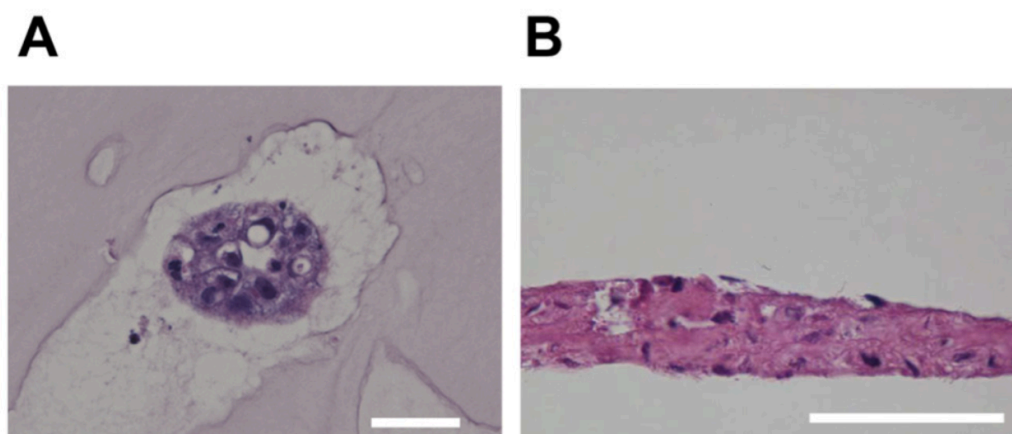


図22 iRCの3D培養におけるHE染色

- A. 代表的な3D培養像。2-3日後に、iRCsは腺様構造を形成した。白線 = 50 μ m。
- B. 代表的なALI培養像。1-3週間の培養で、iRCは垂直方向へと成長した。白線 = 50 μ m。

厳密な意味での分化能の検証としては、免疫不全マウスにiRCを移植し生体内での分化能を確認する、等の手法が考えられるが、本検討の目的は「CSCの特徴を抽出できるモデルの作成」であることから以下の検討を行った。つまり、

誘導された iRC の特徴を検討することで CSC の洞察が得られるか、という検討を行った。iRC の上清内のサイトカインをサイトカインアレイにて検討した。図 23 に示すように、iRC の上清には、MIF 及び PAI1 が認められた。2 で既に検討したように、PAI1 は CSC 様細胞集団の転移に関わっていることが示唆されていることから翻って、iRC の特性解析を行うことが子宮頸癌の CSC 様細胞集団の特性解析につながる可能性が示された。

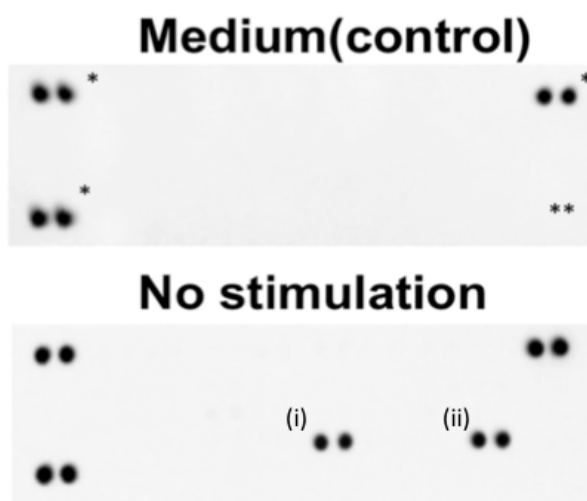


図23 iRCにおけるサイトカイン分泌パターン

(i)MIF及び(ii)PAI1が検出された。*:ポジティブコントロール、**:ネガティブコントロール

第4章 考察

本検討においては、下記の3点を検討した。

- ① 婦人科癌における CSC 様細胞集団の存在の確認と特徴解析
- ② 網羅的解析を用いた CSC 様細胞集団の特性解析と治療戦略の構築
- ③ iPS 細胞を用いた新規 CSC モデルの提唱

① 婦人科癌における CSC 様細胞集団の存在の確認と特徴解析

本研究では、婦人科癌における CSC 様細胞集団の存在を確認することから検討を開始した。具体的には、発生学的に分化に関わっている BMP を阻害する Gremlin1 に着目し、それが CSC の定義と言われる未分化能、増殖能等に与える影響を検討した。BMP は中胚葉の発生に重要であると考えられているため、婦人科臓器がミューラー管由来である事、ミューラー管は中胚葉由来である事を合わせて、婦人科癌においても BMP シグナルが関与していると考えerことは理にかなっているからである。実際、子宮頸癌由来細胞株を Gremlin1 で処理することで、未分化マーカーの一つとされる Nanog の発現は上昇するとともに、ALDH1 陽性細胞の割合も増加した(図 3)。また、増殖能の指標と言われるスフェロイド形成能も Gremlin1 処理によって増加した(図 4)。この検討から、婦人科癌においても、CSC 様細胞集団が存在することが確認され、その維持において Gremlin1 の関与が示唆された。Gremlin1 の処理により CSC 様細胞が維持された結果としてその割合が増えたのか、非 CSC 様細胞が CSC 様細胞になったために CSC 様細胞の割合が増えたのかに関しては検討できていない。しかしながら、Gremlin1 は分化

を阻害することで未分化性の維持に寄与していると考えられていることから [44-45]、もともと細胞株内に存在していた CSC 様細胞が Gremlin1 への暴露によってその未分化性を維持し、結果として CSC 様細胞の割合が増加したのではないかと考えた。

次に、CSC 様細胞集団及び非 CSC 様細胞集団の PAI1 の分泌を ECM との関係から検討することで、CSC 様細胞集団が転移しやすい理由の一つを見出した。すなわち、コラーゲン IV から離れた CSC 様細胞集団においては PAI1 の分泌が減少するため、相対的に uPA の濃度が高くなり、その下流として知られる MMP が活性化され、CSC 様細胞集団の周囲の ECM が脆弱になるという仮説である (図 6)。

これらの検討は子宮頸癌株のみを用いた検討であるという限界はあるものの、婦人科癌においても CSC 様細胞集団が存在することを示した。既存の癌研究では細胞株を一様な集団として扱っている検討が少なくないが、このような不均一性 (heterogeneity) を念頭に置いた研究の重要性を (CSC 様細胞集団に着目するか否かに関わらず) 提示したと言える。

② 網羅的解析を用いた CSC 様細胞集団の特性解析と治療戦略の構築

CSC 様細胞集団の特性を解析する上で、まず代謝に注目した。

メタボローム解析の登場により、近年代謝の研究は注目を集めている。すなわち、元来ゲノム解析、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析などの網羅的解析が行われてきたものの必ずしも細胞の包括的な働きは理解できず、近年では表現系に最も近いとされるメタボローム解析を行うことが重要だと考

えられているのである。

検討としては、CSC 様細胞集団と非 CSC 様細胞集団の代謝物を網羅的に解析することで、CSC 様細胞集団に特徴的な代謝パターンを抽出することを試みた。実際、PCA により CSC 様細胞集団に特徴的な代謝変化を分離することができた(図 9)。具体的には、セリンやアスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミンといった TCA サイクルを効率良く働かせるアミノ酸が CSC 様細胞集団で増加していたこと(図 10)、総アデニレートが CSC 様細胞集団で高かったことから(図 11)、CSC 様細胞集団では非 CSC 様細胞集団に比べて、TCA サイクルを活性化させて効率良くエネルギーを蓄えている可能性を示した。この結果は、CSC 様細胞集団が高い増殖能を持つこと、抗癌剤などに抵抗性を示すことを説明し得る結果であると考えられた。そしてこれは代謝の観点からは極めて重要な知見であると考えられた。なぜならば、ワーブルグ効果という好氣的解糖の概念が 1920 年代に提唱されて以来、癌の代謝は専ら解糖系であると考えられてきたからである[56]。TCA サイクルが実際に活性化しているかの検証に関しては、ミトコンドリアにおける酸素消費量を測定したり、同位体でラベルされた代謝物質の追跡実験を行ったりすることが厳密には必要である。しかしながら、本実験からは少なくとも相対的に TCA サイクルが用いられている状態であるということは推察された。

実際、PET/CT の結果(表 4)から示された通り、糖代謝活性の低い癌種(本検討においては卵巣明細胞腺癌)が存在することが明らかとなった。これらを一元的に考えると次のようになる。つまり、CSC 様細胞集団では TCA サイクルを活性化し、非 CSC 様細胞集団が解糖系を利用しているというもので、さらに CSC

様細胞集団の割合が癌種によって異なるという解釈である。例えば卵巣明細胞腺癌においては、CSC 様細胞集団の割合が高いために、PET/CT の結果からは糖代謝の活性が低いと考えられたのではないかということである。こうして解釈すると、本研究で得られた結果と過去 100 年近く支持されている好氣的解糖の概念とは矛盾しないと考えられた。また、卵巣明細胞腺癌において解糖系が亢進しているという既報も存在する[99,100]。本検討においても vitro 実験においては非 CSC 様細胞集団が糖代謝を活性化している可能性を見いだしているため、そうした既報とも矛盾しないと考えられた。

PET/CT を用いた検討の限界としては、婦人科悪性腫瘍を扱う臨床において、PET/CT は日常的に行われている検査ではないため、施行されている症例内での検討しか行えなかったことが挙げられる。つまり、例えば再発時において糖代謝がどうなるか、再発部位など部位の違いによって糖代謝がどのように変化するか、という点に関しては検討できていない。また、卵巣明細胞腺癌の振る舞いが特徴的であったために vitro 実験においては卵巣明細胞腺癌に関する検討のみを行った。そのため卵巣明細胞腺癌以外の組織型の癌に関する知見は得られていないため、今後は他の組織型に関しても状態や集団によって代謝が切り替わるのか、切り替わるとすればどのように切り替わるのか、という検討が期待される。

このように少数の細胞集団の代謝まで詳細に検討できるようになってきたのは、メタボローム解析の発明による。実際、メタボローム解析の登場以降、癌代謝のリプログラミング、癌組織内の代謝の不均一性に着目した検討は近年

多く報告されている[101-106]。CSC の代謝に関しては、TCA サイクルを活性化しているという報告、解糖系を利用しているという報告のいずれも存在するが、筆者の解釈では、CSC には代謝の可塑性があるのではないかと考えている[101-102, 106]。本研究では CSC 様細胞集団としてスフェロイドを一貫して用いた。そもそもなぜスフェロイドにおいて CSC 様細胞の割合が増えるかという疑問が生じるが、これに関しては、Gremlin1 の検討の際の解釈同様、もともと細胞株内に存在していた CSC 様細胞が 3D 培養という浮遊状態においてその状態を維持し、結果として CSC 様細胞の割合が増加したのではないかと考えている。状態の維持の機序に関しては更なる検討が必要であるが、スフェロイド(3D 培養細胞)における代謝活性経路やエネルギー状態が、状態の維持に寄与しているのではないかと推察している。

代謝に関する検討の最後には、メタボローム解析で得られた知見をもとに、代謝を標的とした治療の探索を試みた。特に、グルタミン中毒という名で知られるように、癌代謝においてグルタミン代謝が重要であることから、グルタミン代謝経路を阻害することを検討することとした(図 10)。ところで、前述の通り近年では癌代謝の検討が詳細に行われつつあるが、代謝を標的とした治療は必ずしも成果を出していない。この理由の一つに、サルベージ回路の存在が示唆されている。つまり、代謝経路は複雑であるがゆえに、一つの代謝酵素や代謝系路を阻害したとしても、他の経路を癌細胞が利用できてしまうということが挙げられる。

そこで、CSC 様細胞集団の特性解析としてメタボローム解析とは別の網羅的解析を行うこととした。具体的には RNA シーケンスを行い、CSC 様細胞集団に特徴的な経路を見出すことを目的とした。興味深いことに、卵巣癌由来 CSC 様細胞集団と子宮頸癌由来 CSC 様細胞集団において、Focal adhesion 経路のみが共通していた(図 14)。すなわち、婦人癌由来 CSC 様細胞集団において Focal adhesion 経路の重要性が示唆された。実際、婦人科の臨床においては Focal adhesion 経路が卵巣癌の転移において重要な役割を果たすとされており、Focal adhesion 経路において中心的な役割を示す FAK のリン酸化阻害が新規治療として諸外国を初め治験が進んでいる[78-81]。今回得た新しい知見としては、FAK のリン酸化は CSC 様細胞集団において非 CSC 様細胞集団よりも増加していることから、CSC 様細胞集団の FAK のリン酸化を阻害するためには高濃度の FAK 阻害剤が必要になるという可能性があるという結果である(図 15)。実際、高濃度の PF573228 を用いて FAK のリン酸化を阻害しても、CSC 様細胞集団における FAK のリン酸化状態は、PF573228 処理のない非 CSC 様細胞集団の FAK のリン酸化状態以下に低下させることができなかった(図 16)。

以上より、CSC 様細胞集団におけるグルタミン代謝と FAK の働きを同時に阻害することによって、各々を単独で標的とする限界を補完して、相乗効果が得られるのではないかと考えた。実際、グルタミン代謝経路の阻害剤の一つである AOA と、PF573228 で処理することで、卵巣癌由来 CSC 様細胞集団において mTOR 活性が相乗的に阻害された(図 17)。検討した三種の癌細胞株のうち OVTOKO においては相乗効果が認められず、バイオマーカーの探索が今後必要であるとは考

えられるものの、グルタミン代謝と FAK を同時に阻害することが、CSC 様細胞集団を標的とした治療として有望である可能性が示唆された。同時に、メタボローム解析と RNA シーケンスという網羅的解析を組み合わせることで CSC 様細胞集団の特性解析を行うことが、CSC を標的とした新たな治療戦略を模索するための手段として有用であることが示された。

以上の検討の解釈の上での注意点としては、本研究では CSC 様細胞集団としてスフェロイドを用いていることである。スフェロイドは形態学的にも周囲との接着という点でも、本研究において非 CSC 様細胞集団として用いた通常培養細胞とは異なっている。つまり、CSC 様細胞集団における FAK 経路の重要性について考えたが、実際のところはスフェロイドという浮遊細胞の特徴を見ているという可能性を否定できない。しかしながら、癌細胞は血液やリンパ液中に浮遊して転移していくこと、卵巣癌に関しては腹水中に浮遊して腹腔内に播種していくことなどを考慮すれば、スフェロイドの特性解析を行うことは再発・転移に関する知見を得るためには重要な実験系であると考えられた。

③ iPS 細胞を用いた新規 CSC モデルの樹立

これまでの検討は既存の細胞株を用いた検討であった。しかしながら、細胞株というものは継代を繰り返されてきた細胞であり、癌細胞の生体内での振る舞いとは必ずしも一致しない可能性がある。また、そもそも細胞株由来細胞集団の中に CSC 様細胞集団が含まれているのかどうかということ自体から議論の余地がある。

そこで、新規 CSC モデルの樹立を検討した。CSC の起源には諸説あるものの、正常上皮幹細胞が癌化する、ということは妥当であると考えられている。そのため、iPS 細胞から正常上皮幹細胞を誘導しその特性解析をすることが、CSC の知見を得る新たなモデルとなると考えた。

子宮頸部には S-C junction (扁平上皮-円柱上皮境界) が有り、そこには扁平上皮も円柱上皮にも分化しうる上皮幹細胞 (リザーブ細胞) が存在すると言われている [89, 107-108]。子宮頸癌の発癌メカニズムの 1 つの仮説としては、このリザーブ細胞に HPV が感染し、HPV 由来の癌タンパクである E6、E7 が持続発現することで、異形成を経て癌化するというものが存在する。つまり、iPS 細胞からリザーブ細胞を誘導することができれば、癌幹細胞の発生前後の知見を得られるのではないかと考え、本検討の目的とした。

iPS 細胞からリザーブ細胞を誘導したとする既報は存在しないことから、プロトコルに関しては試行錯誤を繰り返した。iPS 細胞の誘導に関しては絶対の法則はないものの、発生学を模倣するやり方が標準的である。そのため、子宮頸部はミューラー管由来であること、ミューラー管自体は中間中胚葉であることから逆算して、iPS 細胞から中間中胚葉を誘導し、そこからミューラー管由来様の上皮集団を誘導することとした。最終的には Keratinocyte-SFM 培地とコラーゲン IV コーティングを組み合わせることで、リザーブ細胞様細胞集団 (iRC) を得ることができた (図 18)。Keratinocyte-SFM は子宮頸部の細胞株を培養するのに用いられていること、また、コラーゲン IV は子宮頸部に豊富に含まれる ECM であることから、このプロトコルは理にかなっていると考えられた [109]。ここで誘導さ

れた iRC は PAI1 を分泌しており (図 23)、これは CSC の転移において PAI1 が重要な役割を果たしているという先の結果 (図 6) と関係している可能性が示唆された。このように、iRC の特性解析をすることが CSC の洞察を得るモデルとなることが示された。

iPS 細胞から癌 (幹) 細胞を誘導するという試みは多数存在するものの、そのほとんどは実際の発癌メカニズムとは異なり人工的な系となっている [110-112]。

その点、リザーブ細胞を癌化させるという発想は実際の発癌プロセスを忠実に再現していることになる。今後は、実際に iRC に HPV を感染させることで、さらに詳細な発癌メカニズム、CSC の特性解析が可能になると期待される。

結論

本研究では、婦人科癌における CSC 様細胞集団の特性解析とそれを応用した治療戦略に関する検討を行った。

本研究で確認したように、婦人科癌においても CSC 様細胞集団の存在は明らかであり、今後の癌研究にはこの不均一性 (heterogeneity) を念頭に置いた方法論の確立が必須であると考えられた。また、特性解析には網羅的解析を組み合わせることが有用であることが示された。とりわけ、表現系に最も近いとされるメタボローム解析によって、抗癌剤耐性などのメカニズムが明らかになることが期待された。そして、CSC の新規モデルとして、iPS 細胞から CSC モデルを樹立するという方法論を提案した。子宮頸癌は発癌メカニズムが詳細に研究されている癌の一つであるため、そのプロセスを模倣するのに適したモデルとあると考えられた。iPS 細胞から子宮頸癌 CSC モデルを樹立する方法論が、演繹的に他の癌種にも応用され得ることが考えられた。

今後さらなる CSC の特性解析が行われ、癌の再発・転移を阻止する治療戦略が構築されることが期待される。

引用文献

1. Ginsburg O, Bray F, Coleman MP, Vanderpuye V, Eniu A, Kotha SR, et al. The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. *Lancet*;389(10071):847-60, 2017
2. Pectasides D, Fountzilas G, Papaxoinis G, Pectasides E, Xiros N, Sykiotis C, et al. Carboplatin and paclitaxel in metastatic or recurrent cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*;19(4):777-81, 2009
3. Yeung TL, Leung CS, Yip KP, Au Yeung CL, Wong ST, Mok SC. Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol*;309(7):C444-56, 2015
4. Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT, et al. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet*;95 Suppl 1:S161-92, 2006
5. Ozols RF. Systemic therapy for ovarian cancer: current status and new treatments. *Semin Oncol*;33(2 Suppl 6):S3-11, 2006
6. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*;414(6859):105-11, 2001
7. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*;112(13):4793-807, 2008
8. Chen X, Rycaj K, Liu X, Tang DG. New insights into prostate cancer stem cells. *Cell Cycle*;12(4):579-86, 2013
9. Skibinski A, Kuperwasser C. The origin of breast tumor heterogeneity. *Oncogene*;34(42):5309-16, 2015
10. Triscott J, Rose Pambid M, Dunn SE. Concise review: bullseye: targeting cancer

- stem cells to improve the treatment of gliomas by repurposing disulfiram. *Stem Cells*;33(4):1042-6, 2015
11. Zeki SS, Graham TA, Wright NA. Stem cells and their implications for colorectal cancer. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*;8(2):90-100, 2011
 12. Liu CW, Li CH, Peng YJ, Cheng YW, Chen HW, Liao PL, et al. Snail regulates Nanog status during the epithelial-mesenchymal transition via the Smad1/Akt/GSK3beta signaling pathway in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*;5(11):3880-94, 2014
 13. Wang D, Lu P, Zhang H, Luo M, Zhang X, Wei X, et al. Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget*;5(21):10803-15, 2014
 14. Iv Santaliz-Ruiz LE, Xie X, Old M, Teknos TN, Pan Q. Emerging role of nanog in tumorigenesis and cancer stem cells. *Int J Cancer*;135(12):2741-8, 2014
 15. Kregel S, Szmulewitz RZ, Vander Griend DJ. The pluripotency factor Nanog is directly upregulated by the androgen receptor in prostate cancer cells. *The Prostate*;74(15):1530-43, 2014
 16. Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*;38(4):431-40, 2006
 17. Miyazawa K, Tanaka T, Nakai D, Morita N, Suzuki K. Immunohistochemical expression of four different stem cell markers in prostate cancer: High expression of NANOG in conjunction with hypoxia-inducible factor-1alpha expression is involved in prostate epithelial malignancy. *Oncol Lett*;8(3):985-92, 2014
 18. Kumazawa S, Kajiyama H, Umezu T, Mizuno M, Suzuki S, Yamamoto E, et al.

- Possible association between stem-like hallmark and radioresistance in human cervical carcinoma cells. *The journal of obstetrics and gynaecology research*;40(5):1389-98, 2014
19. Liu XF, Yang WT, Xu R, Liu JT, Zheng PS. Cervical cancer cells with positive Sox2 expression exhibit the properties of cancer stem cells. *PLoS One*;9(1):e87092, 2014
 20. Shen L, Huang X, Xie X, Su J, Yuan J, Chen X. High Expression of SOX2 and OCT4 Indicates Radiation Resistance and an Independent Negative Prognosis in Cervical Squamous Cell Carcinoma. *J Histochem Cytochem*;62(7):499-509, 2014
 21. Wang L, Guo H, Lin C, Yang L, Wang X. Enrichment and characterization of cancer stemlike cells from a cervical cancer cell line. *Mol Med Rep*;9(6):2117-23, 2014
 22. Klonisch T, Wiehenc E, Hombach-Klonisch S, Ande SR, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K, et al. Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications. *Trends Mol Med*;14(10):450-60, 2008
 23. Curley MD, Therrien VA, Cummings CL, Sergent PA, Koulouris CR, Friel AM, et al. CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer. *Stem Cells*;27(12):2875-83, 2009
 24. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res*;68(11):4311-20, 2008
 25. Friel AM, Sergent PA, Patnaude C, Szotek PP, Oliva E, Scadden DT, et al. Functional analyses of the cancer stem cell-like properties of human endometrial tumor initiating cells. *Cell Cycle*;7(2):242-9, 2008
 26. Lopez J, Valdez-Morales FJ, Benitez-Bribiesca L, Cerbon M, Carranca AG. Normal

- and cancer stem cells of the human female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol*;11:53, 2013
27. Liu SY, Zheng PS. High aldehyde dehydrogenase activity identifies cancer stem cells in human cervical cancer. *Oncotarget*;4(12):2462-75, 2013
28. Bortolomai I, Canevari S, Facetti I, De Cecco L, Castellano G, Zacchetti A, et al. Tumor initiating cells: development and critical characterization of a model derived from the A431 carcinoma cell line forming spheres in suspension. *Cell Cycle*;9(6):1194-206, 2010
29. Yao T, Wu Z, Liu Y, Rao Q, Lin Z. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) positivity correlates with poor prognosis in cervical cancer. *J Int Med Res*;42(4):1038-42, 2014
30. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*;126(4):663-76, 2006
31. Mae SI, Shono A, Shiota F, Yasuno T, Kajiwara M, Gotoda-Nishimura N, et al. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. *Nat Commun*;4:1367, 2013
32. Araoka T, Mae S, Kurose Y, Uesugi M, Ohta A, Yamanaka S, et al. Efficient and rapid induction of human iPSCs/ESCs into nephrogenic intermediate mesoderm using small molecule-based differentiation methods. *PLoS One*;9(1):e84881, 2014
33. Mikhailova A, Ilmarinen T, Uusitalo H, Skottman H. Small-molecule induction promotes corneal epithelial cell differentiation from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*;2(2):219-31, 2014
34. Rossi A, Appelt-Menzel A, Kurdyn S, Walles H, Groeber F. Generation of a three-dimensional full thickness skin equivalent and automated wounding. *J Vis*

Exp(96), 2015

35. Debnath J, Mills KR, Collins NL, Reginato MJ, Muthuswamy SK, Brugge JS. The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell*;111(1):29-40, 2002
36. Leung CT, Brugge JS. Outgrowth of single oncogene-expressing cells from suppressive epithelial environments. *Nature*;482(7385):410-3, 2012
37. Lang SH, Stark M, Collins A, Paul AB, Stower MJ, Maitland NJ. Experimental prostate epithelial morphogenesis in response to stroma and three-dimensional matrigel culture. *Cell Growth Differ*;12(12):631-40, 2001
38. Khokha MK, Hsu D, Brunet LJ, Dionne MS, Harland RM. Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nat Genet*;34(3):303-7, 2003
39. Church RH, Krishnakumar A, Urbanek A, Geschwindner S, Meneely J, Bianchi A, et al. Gremlin1 preferentially binds to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and BMP-4 over BMP-7. *Biochem J*;466(1):55-68, 2015
40. Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis*;1(1):87-105, 2014
41. Ducy P, Karsenty G. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int*;57(6):2207-14, 2000
42. Ciuculan L, Sheppard K, Dong L, Sutton D, Duggan N, Hussey M, et al. Treatment with anti-gremlin 1 antibody ameliorates chronic hypoxia/SU5416-induced pulmonary arterial hypertension in mice. *Am J Pathol*;183(5):1461-73, 2013
43. Worthley DL, Churchill M, Compton JT, Tailor Y, Rao M, Si Y, et al. Gremlin 1

- identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential.
Cell;160(1-2):269-84, 2015
44. Seoane J. Gremlins sabotage the mechanisms of cancer stem cell differentiation.
Cancer Cell;25(6):716-7, 2014
45. Yan K, Wu Q, Yan DH, Lee CH, Rahim N, Tritschler I, et al. Glioma cancer stem cells secrete Gremlin1 to promote their maintenance within the tumor hierarchy.
Genes & development;28(10):1085-100, 2014
46. Sato M, Kawana K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, Nishida H, et al. Clinical significance of Gremlin 1 in cervical cancer and its effects on cancer stem cell maintenance. Oncol Rep;35(1):391-7, 2016
47. Sato M, Kawana K, Adachi K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, et al.
Decreased expression of the plasminogen activator inhibitor type 1 is involved in degradation of extracellular matrix surrounding cervical cancer stem cells. Int J Oncol;48(2):829-35, 2016
48. Goldberg I, Davidson B, Lerner-Geva L, Gotlieb WH, Ben-Baruch G, Novikov I, et al. Expression of extracellular matrix proteins in cervical squamous cell carcinoma--a clinicopathological study. J Clin Pathol;51(10):781-5, 1998
49. Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, et al.
Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. Nat Med;4(8):923-8, 1998
50. Fabre-Guillevin E, Malo M, Cartier-Michaud A, Peinado H, Moreno-Bueno G, Vallee B, et al. PAI-1 and functional blockade of SNAI1 in breast cancer cell migration. Breast Cancer Res;10(6):R100, 2008
51. Smit JW, van der Pluijm G, Romijn HA, Lowik CW, Morreau H, Goslings BM.

- Degradation of extracellular matrix by metastatic follicular thyroid carcinoma cell lines: role of the plasmin activation system. *Thyroid*;9(9):913-9, 1999
52. Maillard C, Jost M, Romer MU, Brunner N, Houard X, Lejeune A, et al. Host plasminogen activator inhibitor-1 promotes human skin carcinoma progression in a stage-dependent manner. *Neoplasia*;7(1):57-66, 2005
53. Riddick AC, Shukla CJ, Pennington CJ, Bass R, Nuttall RK, Hogan A, et al. Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues. *Br J Cancer*;92(12):2171-80, 2005
54. Vial D, McKeown-Longo PJ. PAI1 stimulates assembly of the fibronectin matrix in osteosarcoma cells through crosstalk between the α v β 5 and α 5 β 1 integrins. *J Cell Sci*;121(Pt 10):1661-70, 2008
55. Woo M, Park K, Nam J, Kim JC. Clinical implications of matrix metalloproteinase-1, -3, -7, -9, -12, and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*;22(7):1064-70, 2007
56. Dang CV. Rethinking the Warburg effect with Myc micromanaging glutamine metabolism. *Cancer Res*;70(3):859-62, 2010
57. Li D, Fu Z, Chen R, Zhao X, Zhou Y, Zeng B, et al. Inhibition of glutamine metabolism counteracts pancreatic cancer stem cell features and sensitizes cells to radiotherapy. *Oncotarget*;6(31):31151-63, 2015
58. Antonov A, Agostini M, Morello M, Minieri M, Melino G, Amelio I. Bioinformatics analysis of the serine and glycine pathway in cancer cells. *Oncotarget*;5(22):11004-13, 2014
59. Amelio I, Cutruzzola F, Antonov A, Agostini M, Melino G. Serine and glycine

- metabolism in cancer. *Trends Biochem Sci*;39(4):191-8, 2014
60. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijevic D, Sundier SY, Robb EL, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*;515(7527):431-5, 2014
61. Duran RV, Oppliger W, Robitaille AM, Heiserich L, Skendaj R, Gottlieb E, et al. Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. *Mol Cell*;47(3):349-58, 2012
62. Kim D, Fiske BP, Birsoy K, Freinkman E, Kami K, Possemato RL, et al. SHMT2 drives glioma cell survival in ischaemia but imposes a dependence on glycine clearance. *Nature*;520(7547):363-7, 2015
63. Maddocks OD, Berkers CR, Mason SM, Zheng L, Blyth K, Gottlieb E, et al. Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature*;493(7433):542-6, 2013
64. Son J, Lyssiotis CA, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, et al. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature*;496(7443):101-5, 2013
65. Sato M, Kawana K, Adachi K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, et al. Spheroid cancer stem cells display reprogrammed metabolism and obtain energy by actively running the tricarboxylic acid (TCA) cycle. *Oncotarget*;7(22):33297-305, 2016
66. Tjhay F, Motohara T, Tayama S, Narantuya D, Fujimoto K, Guo J, et al. CD44 variant 6 is correlated with peritoneal dissemination and poor prognosis in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Sci*;106(10):1421-8, 2015
67. Fujimoto A, Kawana K, Taguchi A, Adachi K, Sato M, Nakamura H, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum (ER) stress sensors sensitizes cancer stem-like

- cells to ER stress-mediated apoptosis. *Oncotarget*;7(32):51854-64, 2016
68. Peart T, Ramos Valdes Y, Correa RJ, Fazio E, Bertrand M, McGee J, et al. Intact LKB1 activity is required for survival of dormant ovarian cancer spheroids. *Oncotarget*;6(26):22424-38, 2015
69. Vermeersch KA, Wang L, Mezencev R, McDonald JF, Styczynski MP. OVCAR-3 spheroid-derived cells display distinct metabolic profiles. *PLoS One*;10(2):e0118262, 2015
70. Makinoshima H, Takita M, Matsumoto S, Yagishita A, Owada S, Esumi H, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling regulates global metabolic pathways in EGFR-mutated lung adenocarcinoma. *J Biol Chem*;289(30):20813-23, 2014
71. Takebayashi S, Tanaka H, Hino S, Nakatsu Y, Igata T, Sakamoto A, et al. Retinoblastoma protein promotes oxidative phosphorylation through upregulation of glycolytic genes in oncogene-induced senescent cells. *Aging cell*;14(4):689-97, 2015
72. Chaneton B, Hillmann P, Zheng L, Martin ACL, Maddocks ODK, Chokkathukalam A, et al. Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature*;491(7424):458-62, 2012
73. Sato M, Kawana K, Adachi K, Fujimoto A, Taguchi A, Fujikawa T, et al. Low uptake of fluorodeoxyglucose in positron emission tomography/computed tomography in ovarian clear cell carcinoma may reflect glutaminolysis of its cancer stem cell-like properties. *Oncol Rep*;37(3):1883-8, 2017
74. Sarker A, Im HJ, Cheon GJ, Chung HH, Kang KW, Chung JK, et al. Prognostic Implications of the SUVmax of Primary Tumors and Metastatic Lymph Node

- Measured by 18F-FDG PET in Patients With Uterine Cervical Cancer: A Meta-analysis. *Clin Nucl Med*;41(1):34-40, 2016
75. Yamamoto M, Tsujikawa T, Fujita Y, Chino Y, Kurokawa T, Kiyono Y, et al. Metabolic tumor burden predicts prognosis of ovarian cancer patients who receive platinum-based adjuvant chemotherapy. *Cancer Sci*;107(4):478-85, 2016
76. Kishton RJ, Barnes CE, Nichols AG, Cohen S, Gerriets VA, Siska PJ, et al. AMPK Is Essential to Balance Glycolysis and Mitochondrial Metabolism to Control T-ALL Cell Stress and Survival. *Cell Metab*;23(4):649-62, 2016
77. Sato M, Kawana K, Adachi K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, et al. Targeting glutamine metabolism and the focal adhesion kinase additively inhibits the mammalian target of the rapamycin pathway in spheroid cancer stem-like properties of ovarian clear cell carcinoma in vitro. *Int J Oncol*;50(4):1431-8, 2017
78. McGrail DJ, Khambhati NN, Qi MX, Patel KS, Ravikumar N, Brandenburg CP, et al. Alterations in ovarian cancer cell adhesion drive taxol resistance by increasing microtubule dynamics in a FAK-dependent manner. *Sci Rep*;5:9529, 2015
79. Infante JR, Camidge DR, Mileskin LR, Chen EX, Hicks RJ, Rischin D, et al. Safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic phase I dose-escalation trial of PF-00562271, an inhibitor of focal adhesion kinase, in advanced solid tumors. *J Clin Oncol*;30(13):1527-33, 2012
80. Schultze A, Fiedler W. Therapeutic potential and limitations of new FAK inhibitors in the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs*;19(6):777-88, 2010
81. Walsh C, Tanjoni I, Uryu S, Tomar A, Nam JO, Luo H, et al. Oral delivery of PND-1186 FAK inhibitor decreases tumor growth and spontaneous breast to lung metastasis in pre-clinical models. *Cancer Biol Ther*;9(10):778-90, 2010

82. Feld FM, Nagel PD, Weissinger SE, Welke C, Stenzinger A, Moller P, et al.
GOT1/AST1 expression status as a prognostic biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*;6(6):4516-26, 2015
83. Thornburg JM, Nelson KK, Clem BF, Lane AN, Arumugam S, Simmons A, et al.
Targeting aspartate aminotransferase in breast cancer. *Breast Cancer Res*;10(5):R84, 2008
84. Mabuchi S, Kuroda H, Takahashi R, Sasano T. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*;137(1):173-9, 2015
85. Yamamoto D, Sonoda Y, Hasegawa M, Funakoshi-Tago M, Aizu-Yokota E, Kasahara T. FAK overexpression upregulates cyclin D3 and enhances cell proliferation via the PKC and PI3-kinase-Akt pathways. *Cell Signal*;15(6):575-83, 2003
86. Sato M, Kawana K, Adachi K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, et al.
Regeneration of cervical reserve cell-like cells from human induced pluripotent stem cells (iPSCs): A new approach to finding targets for cervical cancer stem cell treatment. *Oncotarget*;8(25):40935-45, 2017
87. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*;501(7467):328-37, 2013
88. Greaves M. Cancer stem cells: back to Darwin? *Semin Cancer Biol*;20(2):65-70, 2010
89. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*;11(11):1048-56, 2010
90. Taylor HS, Vanden Heuvel GB, Igarashi P. A conserved Hox axis in the mouse and

- human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod*;57(6):1338-45, 1997
91. Klattig J, Englert C. The Mullerian duct: recent insights into its development and regression. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*;1(5):271-8, 2007
92. Kobayashi A, Behringer RR. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nat Rev Genet*;4(12):969-80, 2003
93. Orvis GD, Behringer RR. Cellular mechanisms of Mullerian duct formation in the mouse. *Dev Biol*;306(2):493-504, 2007
94. Herfs M, Vargas SO, Yamamoto Y, Howitt BE, Nucci MR, Hornick JL, et al. A novel blueprint for 'top down' differentiation defines the cervical squamocolumnar junction during development, reproductive life, and neoplasia. *J Pathol*;229(3):460-8, 2013
95. Martens JE, Smedts F, van Muyden RC, Schoots C, Helmerhorst TJ, Hopman A, et al. Reserve cells in human uterine cervical epithelium are derived from mullerian epithelium at midgestational age. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*;26(4):463-8, 2007
96. Martens JE, Smedts FM, Ploeger D, Helmerhorst TJ, Ramaekers FC, Arends JW, et al. Distribution pattern and marker profile show two subpopulations of reserve cells in the endocervical canal. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*;28(4):381-8, 2009
97. Darwiche N, Celli G, Sly L, Lancillotti F, De Luca LM. Retinoid status controls the

- appearance of reserve cells and keratin expression in mouse cervical epithelium.
Cancer Res;53(10 Suppl):2287-99, 1993
98. Zinner B, Gyongyosi B, Babarczy E, Kiss A, Sobel G. Claudin 1 expression characterizes human uterine cervical reserve cells. J Histochem Cytochem;61(12):880-8, 2013
99. Amano Y, Mandai M, Yamaguchi K, Matsumura N, Kharma B, Baba T, et al. Metabolic alterations caused by HNF1beta expression in ovarian clear cell carcinoma contribute to cell survival. Oncotarget. 2015;6(28):26002-17.
100. Mandai M, Amano Y, Yamaguchi K, Matsumura N, Baba T, Konishi I. Ovarian clear cell carcinoma meets metabolism; HNF-1beta confers survival benefits through the Warburg effect and ROS reduction. Oncotarget. 2015;6(31):30704-14.
101. Altieri DC. Mitochondria on the move: emerging paradigms of organelle trafficking in tumour plasticity and metastasis. Br J Cancer;117(3):301-5, 2017
102. Cliff TS, Dalton S. Metabolic switching and cell fate decisions: implications for pluripotency, reprogramming and development. Curr Opin Genet Dev;46:44-9, 2017
103. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. Cell Metab;7(1):11-20, 2008
104. Shibao S, Minami N, Koike N, Fukui N, Yoshida K, Saya H, et al. Metabolic heterogeneity and plasticity of glioma stem cells in a mouse glioblastoma model.

- Neuro Oncol [Epub ahead of print], 2017
105. Kawada K, Toda K, Sakai Y. Targeting metabolic reprogramming in KRAS-driven cancers. *Int J Clin Oncol*;22(4):651-9, 2017
 106. Li X, Han G, Li X, Kan Q, Fan Z, Li Y, et al. Mitochondrial pyruvate carrier function determines cell stemness and metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncotarget*;8(28):46363-80, 2017
 107. Lopez J, Ruiz G, Organista-Nava J, Gariglio P, Garcia-Carranca A. Human papillomavirus infections and cancer stem cells of tumors from the uterine cervix. *Open Virol J*;6:232-40, 2012
 108. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*;189(1):12-9,1999
 109. Fichorova RN, Rheinwald JG, Anderson DJ. Generation of papillomavirus-immortalized cell lines from normal human ectocervical, endocervical, and vaginal epithelium that maintain expression of tissue-specific differentiation proteins. *Biol Reprod*;57(4):847-55,1997
 110. Chen L, Kasai T, Li Y, Sugii Y, Jin G, Okada M, et al. A model of cancer stem cells derived from mouse induced pluripotent stem cells. *PLoS One*;7(4):e33544, 2012
 111. Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, et al. Induction of cells with cancer stem cell properties from nontumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene*;33(5):643-52, 2014
 112. Oshima N, Yamada Y, Nagayama S, Kawada K, Hasegawa S, Okabe H, et al.

Induction of cancer stem cell properties in colon cancer cells by defined factors.

PLoS One;9(7):e101735, 2014

謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導・ご協力いただきました、東京大学医学部産科婦人科教室の藤井知行教授、大須賀穰教授、日本大学医学部産科婦人科教室の川名敬教授に深く感謝いたします。また、実験計画・実験手技につきご指導・ご協力いただいた、東京大学医学部産科婦人科教室の永松健准教授、織田克利准教授、平池修准教授、有本貴英先生、松本陽子先生、長阪一憲先生、江口聡子先生、冨尾賢介先生、山下亜紀先生、田口歩先生、西田晴香先生、井上知子先生、中村寛江先生、河田啓先生、荻島樹里先生、吉田光代先生、藤本麻葉先生、足立克之先生、横山照史さんに心より御礼申し上げます。

また、iPS 細胞株である 201B7 を供与いただいた京都大学の山中伸弥教授に心より御礼申し上げます。