

論文の内容の要旨

論文題目 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

婦人科悪性腫瘍における再発癌は極めて予後不良であり、再発をさせない治療が命題である。つまり、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求められている。

他方、癌の再発・転移に関しては、癌幹細胞(CSC)の関与が近年指摘されている。すなわち、癌組織の中には不均一性が存在し、その一部のCSCが再発や治療抵抗性に関わっているというものである。しかしながら、CSCとして必要十分であるという条件・マーカーの確立された見解は存在しない。

そこで我々は、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本研究の目的とした。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様細胞集団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の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。

まず、婦人科癌におけるCSC様細胞集団の存在の確認として、子宮頸癌細胞株であるCaSki株を用いて、CSC様細胞集団の維持におけるGremlin1の意義を検討した。CaSki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。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。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るとともに、その維持においてGremlin1の関与が示唆された。

次に、CSC 様細胞集団と細胞外基質 (ECM) との関係を検討した。すわなち、CaSki 株由来 CSC 様細胞集団として ALDH1 陽性細胞・陰性細胞を分離したのち、基底層に多く含まれる ECM であるコラーゲン IV の変化と、ECM の維持に関わるとされる PAI1 の分泌の関係を検索した。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。この傾向は、CSC 様細胞集団において顕著であった。この結果から、増殖などにより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、という仮説が見出され、特にこれは、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った。

次に、卵巣癌細胞株 (OVTOKO) 由来及び子宮頸癌細胞株 (SiHa) 由来 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 (メタボローム解析)、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。これ以後の検討では、3D 培養により形成されたスフェロイドを CSC 様細胞集団とし、2D 培養 (通常培養) によって得られた細胞を非 CSC 様細胞集団のモデルとした。実際、主成分分析 (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。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、総アデニレートが CSC 様細胞集団で高値であった。このことから、CSC 様細胞集団では非 CSC 様細胞集団に比べて、解糖系ではなく 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が示唆された。

そこで、悪性腫瘍における TCA サイクルの意義を考えるために、解糖系に比較的依存していない癌の特徴を検討することとした。手法として、FDG-PET/CT を施行した患者の中から、SUVmax を指標として糖代謝活性の低い癌種を抽出することを検討した。すると、卵巣明細胞腺癌において糖代謝が他の癌種と比較し活性化されていない可能性が示唆された。そこで卵巣明細胞癌由来細胞株である OVTOKO、OVISe、JHOC5 を用いて、解糖系、TCA サイクルの意義を *in vitro* において検討した。TCA サイクルが活性化している指標として、グルタミン中毒としても知られており栄養素として重要であるグルタミン代謝に着目した。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) の発現は低下していた。また、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。これらの結果から、卵巣明細胞腺癌においては他の癌種と比較した際に、解糖系よりもグルタミン代謝が重要であると考えられ、特にその中でも CSC 様細胞集団がその代謝変化に関与している可能性が示唆された。

以上のことから、グルタミン代謝を標的とした、CSC 様細胞集団の新規治療標的の探索を検討した。標的の検索にあたり、前述の代謝物の網羅的解析 (メタボローム解析) に加え、CSC 様細胞集団と非 CSC 様細胞集団を比較した RNA シーケンスを行った。この検討から、CSC 様細胞集団

においては FAK 経路が重要である可能性が示唆された。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。方法としては、卵巣癌株 OVTOKO、OVISe、JHOC5 細胞株由来 CSC 様細胞集団に対して、グルタミン代謝の阻害剤(AOA)と、FAK のリン酸化阻害剤(PF573228)を使用し、mTOR 経路の下流である S6 のリン酸化を評価対象とした。OVISe、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。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、逆に症例を選べばグルタミン代謝と FAK の阻害を組み合わせることが、CSC 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。

これまでの検討には、既存の樹立された細胞株を用いた。しかしながら、細胞株は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ず、他方、臨床サンプルから得られたプライマリー細胞は個体間誤差もあり得るため、いずれも CSC の探索として適切であるかは議論の余地がある。そこで我々は、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。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可能性は広く受け入れられている。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ことから、子宮頸癌における CSC モデルの樹立を試みた。具体的には、子宮頸部に存在するとされる扁平上皮にも円柱上皮にも分化しうる、かつ子宮頸癌の発生源とされる上皮幹細胞(リザーブ細胞)を iPS 細胞から誘導することを検討した。iPS 細胞株である 201B7 株を用いて、中間中胚葉を誘導した。その細胞集団を、頸部上皮細胞で用いられる培養液(Keratinocyte-SFM)を用いて、子宮頸部に豊富に存在する ECM であるコラーゲン IV でコーティングされたディッシュ上で培養することで、リザーブ細胞様細胞集団(iRC)を誘導した。iRC は上皮幹細胞のマーカーである p63、CK5、CK8 を 70%程度の割合で発現していた。また、S-C junction のマーカーである CK7、AGR2、CD63、MMP7、GDA の発現、及びミューラー管由来のマーカーである ER α 、ER β 、CA125 の発現のパターンは、子宮頸部内頸部由来細胞のそれと類似しており、文献と比較しても矛盾はなかった。また、iRC をマトリゲル内で 3D 培養することで腺様細胞集団を得るとともに、ALI 培養によって扁平上皮様の発育を確認し、*vitro*において iRC の未分化性・分化能を確認した。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ところ、iRC の上清には MIF 及び PAI1 が認められた。先の検討である、PAI1 は CSC 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 の特性解析につながる可能性が示された。

本検討においては、婦人科癌における CSC 様細胞集団の存在を確認するとともにその特徴の一端を解析した。さらに網羅的解析を組み合わせることで CSC 様細胞集団において重要な特性解析と治療戦略の構築を検討した。加えて、iPS 細胞を用いた新規 CSC モデルの提唱を行った。総じて、CSC の特性解析を行うことが、婦人科悪性腫瘍におけ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を示した。