

氏 名 すん い
孫 毅

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 248 号

学位授与年月日 平成 29 年 9 月 28 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学 専攻

学位論文題目

Isolation of cancer stem like cells in primary endometrial cancer
using cell surface markers CD133 and CXCR4

(細胞表面マーカーCD133, CXCR4 を用いたヒト子宮内膜癌からの癌
幹細胞様細胞の単離)

論文審査委員

(主査)	教授	笹原 正清
(副査)	教授	井村 穰二
(副査)	教授	北村 寛
(副査)	教授	野口 誠
(指導教員)	教授	二階堂 敏雄

論文内容の要旨

Aim

Endometrial cancer (EC) is the most common gynecologic malignant tumor identified in the female reproductive system in developed countries; EC incidence rates have been increasing yearly. It has been reported that a small subpopulation of cancer cells possess the ability of cell proliferation, promoting the hypothesis that cancer stem cells (CSCs) present in malignant tumors are responsible for tumor formation and progression. I hypothesized the small subpopulation which were marked by CD133 and CXCR4 might be owe of CSCs, then isolated the cells from primary EC tissues and were investigated in vitro and in vivo. The aim of this research is the identification of surface marker related to target CSCs in the primary EC.

Materials and Methods

1. Human primary endometrial cancer tissues.
Isolation of cells.
Transplantation of human primary endometrial cancer cells in vivo.
2. Flow cytometric analysis.
3. Expression analysis of mRNA by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).
4. Cell sorting by Magnetic-activated cell sorting (MACS).
5. Immunofluorescence.
6. Cell proliferation assay.
7. Sphere formation assay.
8. Soft agar colony formation assay.
9. Chemo-sensitivity assay.
11. Xenograft tumor formation assay.

Result

Tissue samples were obtained from EC patients during surgical procedures. Single cells were isolated from the tissues for culturing, transfection into nude mice, and histopathology analysis. Isolated EC cells expressed stemness-related genes, such as *c-Myc*, *Sox-2*, *Nanog*, *Oct 4 A*, *ABCG2*, *BMI-1*, *CK-18*, and *Nestin*. The expression of surface markers CD24, CD133, CD47, CD29, CD44, CXCR4, SSEA3 and SSEA4 were measured by flow cytometry. The result showed CD24, CD133 and the chemokine marker CXCR4 accounted for 22.1±3.4 %, 25.6±5.4 %, and 12±1.3 %, respectively in EC cells. Then the ratio of CD133+CXCR4+ cells was 9.3%, CD133-CXCR4- cells were 61.0%, in EC cells. Following cell sorting, CD133+CXCR4+ EC cells grew faster, exhibited high expression of stemness-related genes, produced more spheres, and had

higher clonogenic ability than other subpopulations. 103 cells CD133+CXCR4+ cells formed tumors after Xenograft transplantation. Besides, CD133+CXCR4+ cells were also more resistant to anti-cancer drugs than other subpopulations.

Conclusion

All these data showed that CD133+CXCR4+ EC cells possess greater proliferation, clonogenic, tumorigenic, and chemoresistance abilities, and suggested the CD133+CXCR4+ EC cells may be owe of CSCs like cells. Although further studies will be required to characterize CD133+CXCR4+ EC cells in details and to be well defined their mechanisms for drug resistance, it suggests that surface markers of CD133 and CXCR4 will be excellent novel molecular targets for EC therapy.

学位論文審査の要旨

〔目的〕 子宮内膜癌（endometrial cancer : EC）は先進国における婦人科癌の中で主流を占める癌であり、近年、増加する傾向にある。子宮体癌に対する外科手技、放射線療法、化学療法はすでに確立されているものの、再発例も多い。Clarke ら（2006 年）は、癌組織の中に、放射線療法、化学療法に抵抗性を示す細胞群（がん幹細胞 cancer stem cell: CSC）が存在し、これらを撲滅しない限り、癌根絶をもたらすことは困難であると報告した。CSC は、正常組織に存在する幹細胞とほとんど同様の性質を有する細胞で、白血病を始めとする種々の癌種において CSC の存在が証明されている。しかし、婦人科癌では、cell line での CSC の報告はなされているが、患者組織から CSC を同定したという報告は未だになされていない。孫 毅氏は、CSC を標的とした新たな治療方法の開発の基礎として、細胞表面マーカーを利用することで、患者組織から CSC 細胞を単離することを目的とし本研究を企図した。

〔方法並びに結果〕

- （1） 富山大学付属病院において外科的に処理された子宮体癌組織から、組織及び細胞を分離し、実験に供した。実験は全て富山大学倫理委員会及び富山大学動物実験倫理委員会の承認を受けている。
- （2） 分離された EC 細胞について、表面マーカーと幹細胞関連 mRNA の発現の相関を FACS (fluorescence activated cell sorting) 法及び PCR 法を用いて検討した。その結果、本研究に使用した 20 例のうち 5 例において、細胞を分離、継代することができた。また、その中の 2 例は、幹細胞関連転写因子 Oct4A, Nanog, Sox-2, c-Myc, ABCG2, BMI-1 さらに神経幹細胞で高発現する Nestin を強く発現した。この 1 例について、表面マーカーを測定したところ、CD24, CXCR4, CD133 の発現率がそれぞれ 28.2%, 41.6%, 8.3%を示した。
そこで、当該例に由来した細胞について、これらの表面マーカーを指標として MACS (Magnetic cell sorting) 法により細胞を分取し、幹細胞関連 mRNA の発現を測定したところ、CD133+細胞と CD133-細胞、及び CXCR4+細胞と CXCR4-細胞の比較では、それぞれの陽性細胞にのみ強い発現が認められた。しかしながら、CD24+細胞と CD24-細胞における幹細胞関連 mRNA の発現には差が認められなかった。
以上のことから、CSC を同定するための細胞表面マーカーとして CD133 及び CXCR4 が有効と考え研究を遂行した。
- （3） 上記症例由来の細胞について CD133+CXCR4+（二重陽性）の細胞（9.3%）を分取し、CSC の特性について検討した。
 - ① CD133+CXCR4+細胞は、CD133-CXCR4-細胞及び分離前の細胞群よりも、増殖が顕著であった。

- ② CD133+CXCR4+細胞は、CD133-CXCR4-細胞より、多くの種類の幹細胞関連 mRNA の発現や幹細胞関連タンパク質の発現が認められた。
 - ③ CD133+CXCR4+細胞は、CD133-CXCR4-細胞に比較して Sphere 形成能や soft agar 培地における colony 形成能が有意に亢進していた。
 - ④ EC 細胞は cisplatin あるいは paclitaxel を添加した後の細胞数を測定したところ、いずれの抗がん剤に対しても濃度依存性に細胞数の減少がみられた。しかし、CD133+CXCR4+細胞は、CD133-CXCR4-細胞に比べ、生細胞数の減少率がわずかであり、各濃度における CD133+CXCR4+細胞と CD133-CXCR4-細胞数の比較では、前者の細胞群が有意に生存していた。CD133+CXCR4+細胞は抗がん剤に対し、抵抗性を示した。
- (4) CD133+CXCR4+細胞と CD133-CXCR4-細胞のそれぞれから 10^4 個及び 10^3 個を、nude mouse に移植したところ、 10^4 個の移植では、いずれの細胞群においても腫瘍形成が見られたが、 10^3 個移植マウスでは CD133+CXCR4+細胞移植群のみに腫瘍の形成が認められた。

〔総括〕

子宮内膜癌は予後不良の悪性腫瘍であり、癌幹細胞を標的とした新しい治療方法の開発に期待が寄せられている。しかしながら、癌組織に由来する癌幹細胞の同定には至っていない。本研究ではこれまで癌幹細胞の指標としてあるいは細胞生存促進因子としてそれぞれ注目されてきた細胞表面マーカーである CD133 と CXCR4 を同時に発現する細胞を子宮内膜癌患者組織より分離同定した。これらが、幹細胞関連分子を高発現し、さらに CSC 様の細胞動態を示すこと、最後に Nude mouse への移植実験で強い腫瘍形成能を有することを明らかにした。以上のことから、CD133 と CXCR4 の二重陽性で CSC 様性格を有する細胞を癌組織から分離同定したことには新規性があり、CSC の同定は子宮内膜癌にとどまらず様々な種類の癌病変においても治療標的として注目されていることから医学における学術的重要性も高い。また CSC 様細胞を得た手法は他の癌病巣にも応用可能であるとともに細胞を生存した状態で得ることが可能であることから治療方法の開発を含めて将来の臨床的発展性が期待できる。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。