

婦人科がん幹細胞を標的とした新規免疫療法の確立

札幌医科大学医学部産婦人科学講座 真里谷 奨

要約

我々は難治性の婦人科がん治療の新たな標的として、各種婦人科がんのがん幹細胞に着目した研究を進めてきた。子宮頸がんにおけるBORISは細胞障害性Tリンパ球細胞による治療標的として有効であることが示唆され、また卵巣がんにおいてはMMP10を標的とした抗体治療によるがん幹細胞の治療抵抗性克服の可能性を示してきた。今回我々は子宮内膜がんにおける有効な治療標的を見出すべく、Nx-1 seqシステムを用いた子宮内膜がんのシングルセル解析を行なった。解析に用いた子宮内膜がんは強い筋層浸潤を伴う類内膜がんであり、子宮内腔への突出部分と筋層浸潤部分に分離し解析を行なった。結果は子宮内腔側の細胞によりがん幹細胞様の成分が多く未分化であり、筋層浸潤に伴い幹細胞様形質が失われると同時に細胞分化が進んでいくというダイナミックな遺伝子発現変化が確認された。我々はさらに本症例の細胞集団を詳細に解析すべく、初代培養細胞にスフェア培養を行いがん幹細胞集団の抽出を行ない、さらに単細胞へ分離培養を行うことで非がん幹細胞クローン株とがん幹細胞クローン株を樹立した。がん幹細胞クローンはその性状からS(Sphere)クローンとLL(Leukemia like)クローンへ分離を行なった。LLクローンは高いSOX2遺伝子の発現や造腫瘍能を示す一方で、化学療法抵抗性はSクローンに劣る結果であった。これらの結果より、がん幹細胞様亜集団の中には造腫瘍と治療抵抗性を担う集団が別途存在することが示唆され、各々を標的とした治療法の模索が必要であると考えられた。

緒言

がん幹細胞とは、1. 高い造腫瘍能、2. 自己複製能、3. 多分化能を有する細胞群と定義される。がん幹細胞は、化学療法や放射線療法といった既存の抗悪性腫瘍治療に強い抵抗性を示すことが知られており¹、临床上深刻な問題であるがんの再発や転移に関与するとされている(図1)。今日では幅広いがん種においてがん幹細胞の分離・同定が可能となり、さまざまな分子メカニズムの介在が解明されつつある。

Cancer stem cells (CSCs)

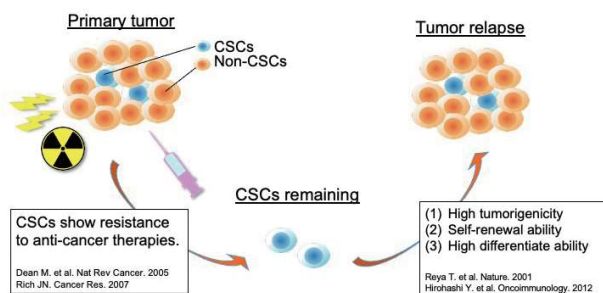


図1. がん幹細胞の生物学的特徴

抗PD-1抗体等の免疫チェックポイント阻害剤の台頭により広く知られるところとなったがんに対す

る免疫療法であるが、我々がかねてよりがん幹細胞特異抗原に対するCTL(細胞障害性Tリンパ球細胞)を誘導し選択的に障害する、がん幹細胞標的ワクチン療法の開発に取り組んできた。婦人科領域においては、ALDEFLUOR法を用いた卵巣がん幹細胞の分離解析²をはじめ、がん幹細胞分画に特異的に発現していたMMP10(Matrix metalloproteinase-10)がWNTシグナルを介した卵巣がん幹細胞の幹細胞性維持や化学療法抵抗性に関与し、治療標的となり得ることを示してきた³。また、子宮頸がんにおいては、がん精巢抗原であるBORISを標的としたCTLの誘導に成功し、子宮頸がん幹細胞を特異的に殺傷可能であることを示した⁴。これらの標的治療はがん選択性に優れ、免疫チェックポイント阻害剤に認められるような正常臓器への障害は極めて少ないことが予想され、化学療法不耐となった患者への治療法としても期待される場所であり、また同時に機序からは免疫チェックポイント阻害剤との併用においても奏功が期待されるものである。

今回我々のはがん幹細胞の子宮内膜がんにおけるがん幹細胞の微小環境の解析を介した新規標的治療の

確立を目標として、本研究を行なった。

方法

今回我々は橋本らの開発したNx1-seqシングルセル解析システム(Next generation 1 cell RNA sequencing)を用いて子宮内膜がんの単細胞レベルのトランスクリプトーム解析を行なった。本手法はマイクロビーズ上にバーコード部分を付加したオリゴdTを合成する過程と、細胞とバーコードビーズを混合する過程である2つの技術の組み合わせによって構成される。あらかじめ合成したビーズをマイクロウェル中に挿入し、細胞をポアソン分布に従ってプレートへ播種させていく。各マイクロウェル中にてバーコードオリゴdT結合ビーズでトラップし、それを逆転写・増幅後シーケンスする(図2)。

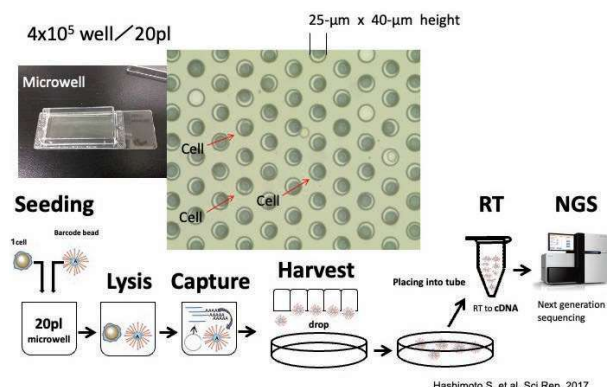


図2. シングルセル遺伝子発現解析 (Nx1-seq)

Nx1-seqに用いた新鮮子宮内膜がん組織を初代培養株とした上で、がん幹細胞クローンの作成を行なった。FACS Aria IITM(Becton, Dickinson and Company)を用いたシングルセル分離および限界希釈を用いて、各クローン細胞株を樹立した。

がん幹細胞の抽出を目的として、各細胞にスフェア培養を行なった。N-2サプリメント、リコンビナントヒト上皮細胞成長因子、ヒト塩基性線維芽細胞成長因子およびヘパリンを添加した無血清DMEM/F12培地を用い超低接着プレート上で培養することで、がん幹細胞が濃縮された浮遊したスフェア(球状)細胞集塊の形成を確認し、回収・解析を行なった。

なお、樹立したクローン細胞は、特にスフェア培養における増殖細胞の形態学的特徴から、スフェアクローン(S clone: Sphere)細胞と白血病様クローン(LL clone: Leukemia like)細胞に分類した。

本研究の組換え遺伝子実験、動物実験および健常

人および患者臨床検体を用いる研究については、各種通知およびガイドラインに従い札幌医科大学医学部倫理委員会に申請し、審査され承認を受けている。

結果

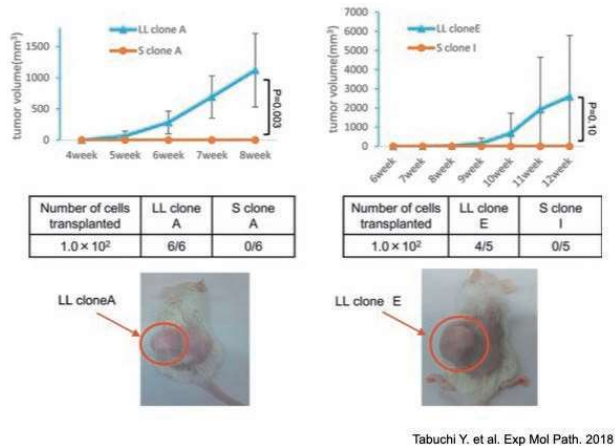
・子宮内膜がんのNx1-seqシングルセル解析

患者検体から摘出した新鮮子宮内膜がん組織の内臓側と筋層浸潤先端部それぞれから細胞を分離し、Nx1-seqを行った。同時に新鮮子宮内膜がん組織からスフェア細胞を樹立し、Nx1-seqにて解析した。組織から分離した細胞および培養スフェア細胞の計5,943の細胞についてtSNEクラスタリング解析を施行したところ、がん細胞12個、免疫細胞2個の計14個のクラスターに分類された。内臓側および筋層浸潤先端部における幹細胞関連遺伝子(UCHL1, MGP, SOX2)の免疫染色を施行したところ、内臓側の細胞での発現が高い結果であったが、tSNE解析においてもこれらの遺伝子発現は内臓側がん細胞ならびにスフェア細胞で高い結果であった。これらの結果から、がん組織内の部位によっても細胞集団のプロファイルが異なっており、微小環境による変化が異なった細胞集団を形成し、それが病態に影響を与えていると考えられた。一方、組織から得られた培養細胞株はある程度in vivoの状態を表現していると考えられるが、培養の条件によってもダイナミックに遺伝子発現が変化するため、培養および解析環境については繊細な注意が必要である。

・子宮内膜がん幹細胞クローン機能解析

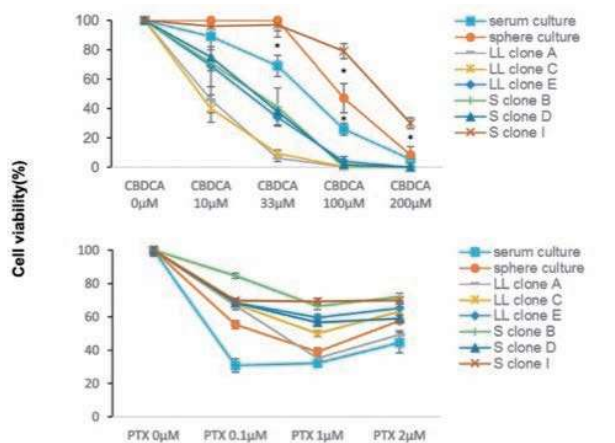
これまでの研究において、卵巣がんおよび子宮頸がん細胞において、スフェア培養細胞はがん幹細胞形質を強く発現することを示してきた。本研究においても子宮内膜がんスフェア培養細胞の解析を行ない、さらに新たな取組みとしてスフェア培養細胞から2つの細胞クローンタイプ(Sクローン、LLクローン)を樹立した。これまでの研究では、血清培養細胞と比較し、スフェア培養細胞では造腫瘍能および治療抵抗性の高い細胞群が濃縮されていることが確認されているが、しかし、樹立したうち2つのSクローン細胞(クローンAおよびI)は、LLクローン細胞(クローンAおよびE)と比較して、腫瘍形成性が低いことが明らかとなった(図3:LLクローンは100個の細胞移植で著明な腫瘍を形成した一方で、Sクローンには腫瘍形成が認められなかった)。一方、

SクローンIはLLクローンと比較し化学療法に抵抗性を示した(図4: 上段がカルボプラチン、下段がパクリタキセルに対する治療反応性を示したグラフ)。これらの結果は、異なるがん幹細胞クローン細胞は異なる表現型を持つ可能性があることを示している。



Tabuchi Y. et al. Exp Mol Path. 2018

図3. がん幹細胞クローンと造腫瘍能



Tabuchi Y. et al. Exp Mol Path. 2018

図4. 各細胞クローンと化学療法抵抗性

LLクローン細胞は、1) 造腫瘍能が高い、2) SOX2の発現量が多い、3) ALDH^{high}細胞の比率が高い、4) in vitroでの増殖率が高い、などの特徴があった。一方、Sクローン細胞は、1) 造腫瘍能が高い、2) MMP10の発現レベルが高い、3) ALDH^{high}細胞の比率が低い、4) in vitroでの増殖率が低い、という対照的な特徴を示した。

考察

がん幹細胞の特徴を持つ子宮内膜がん細胞は、これまでALDH1、CD44およびCD133によって分離可能であることが示されてきた。近年では、子宮内膜

がん特異的な新規候補マーカーも報告されているが、既報は長期培養された細胞株を利用した報告に留まる。本研究においては、新鮮子宮内膜がん検体から、子宮内膜がん幹細胞クローンを樹立することに成功した。したがって、本研究のクローンは従来の細胞株を用いた研究と比較しがん幹細胞の生体内状態をより反映しているものと考えられた。また、免疫染色を含む組織学的検討の結果、原発腫瘍組織と樹立したクローン由来の異種移植腫瘍組織は病理組織学的に類似した形質を示しており、本研究で樹立したがん幹細胞クローンは、子宮内膜がんおよび同がん幹細胞を解析するための合理的なモデルであることが示された。

今回はSクローン、LLクローン2つの特徴的ながん幹細胞クローンの樹立に成功したが⁶、LLクローン細胞の最も顕著な表現型は、高い造腫瘍能である。これまでの研究では、SOX2とALDH^{high}がん幹細胞性および腫瘍形成に関係していることが示されてきた。LLクローン細胞は、SOX2の発現レベルが高く、ALDH^{high}細胞の比率が高く高い造腫瘍能を示した。一方で、Sクローン細胞は、SOX2発現およびALDH^{high}細胞比率の増加は同様であったにもかかわらず、ほとんど造腫瘍能を示さないことが明らかとなった。これらの結果は、SOX2とALDH^{high}だけが幹細胞性および腫瘍能を規定する因子ではないことを示している。また、私たちは以前、MMP10がWNTシグナルを介したがん幹細胞性の維持および化学療法抵抗性に関係していることを報告した³。したがって、Sクローン細胞においてMMP10が高発現していることが、化学療法抵抗性の原因である可能性がある。興味深いことに、本研究では、幹細胞性の主たる指標であるSOX2の発現レベルは、これらのクローンの化学療法抵抗性とは関係していなかった。

アレイCGH法を用いたエンリッチメント解析により、Sクローン細胞とLLクローン細胞間の遺伝子発現の特徴の違いが明らかになった。Sクローン細胞では、組織発生(胚、骨格、感覚器、中胚葉の発生など)に関与する遺伝子が高発現されている一方で、Sクローン細胞は幹細胞性を呈する傾向があることがわかった。一方、LLクローン細胞では、細胞増殖に関わる経路が亢進しており、細胞の増殖や分化に関係するセカンドメッセンジャーシグナル発現が著明となっていた。また、LLクローンにおい

て亢進していたMAPK経路は、腫瘍進展に関係していることが報告されており、子宮内膜がん治療の標的となり得ると考えられた。

がん幹細胞は高い腫瘍形成能と化学療法抵抗性を有することが報告されている¹。しかし、これらの特徴は、今回のような新鮮検体を用いた分析を行っても、単一遺伝子や単一クローンの細胞では説明困難であった。患者の悪性度や予後は、1つの遺伝子や1つのクローン細胞ではなく、複数の遺伝子や複数のがん幹細胞亜集団によって決定されると考えるべきであろう。本研究では、がん幹細胞としての表現型は、腫瘍イニシエーターとしてのLLクローン細胞や化学療法抵抗性細胞としてのSクローンなど、複数のクローンに共通している一方で、遺伝子発現プロファイルはクローン間で大きく異なっていた。したがって、がん幹細胞の複雑な表現型を解明するためには、1人の患者から採取した検体をクローンレベルで解析する必要があるかもしれない、シングルセル解析手法の更なる解像度の上昇が望まれる。以上のように、がん幹細胞クローン解析を施行した本研究において、標的とすべきがん幹細胞集団の中には造腫瘍能をもつ細胞と化学療法耐性を示す細胞が混在することが確認された。いずれの細胞群も有効な標的となり得るが、今後はがん種や臨床状況に応じた標的分子の細分化も考慮に入れた、標的治療開発が必要となるかもしれない。

Abstract

We have been focusing on cancer stem cells (CSCs) in various gynecological cancers as a new target for the treatment of refractory cancers. In this study, we performed a single-cell analysis of endometrial cancer using the Nx-1 seq system to find effective therapeutic targets in endometrial cancer. The endometrial carcinoma used in the analysis was a type of endometrial carcinoma with strong myometrial invasion, and the analysis was performed by separating the protruding portion into the endometrial side and the myometrial invasion portion. The results showed that the cells on the endometrial side of the uterus were more undifferentiated with more CSCs-like components, and with myometrial invasion, CSCs-like traits were lost and cell differentiation progressed, indicating dynamic gene expression changes. In order to further analyze the cell population of this case, we extracted the CSCs population by sphere-culturing primary cultured cells, and then isolated and cultured them into single cells to establish non-CSCs clone lines and cancer stem cell clone lines. The CSC clones were separated into S (Sphere) and LL (Leukemia-like) clones based on their characteristics, and the LL clones showed higher SOX2 gene expression and tumorigenicity, but were less resistant to chemotherapy than the S clones. These results suggest that there are separate populations responsible for tumorigenesis and resistance to therapy within the CSCs-like subpopulation and that it is necessary to explore therapies that target each of these populations.

参考文献

1. Hirohashi Y, Torigoe T, Sato N. et al. Immune response against tumor antigens expressed on human cancer stem-like cells/tumor-initiating cells, *Immunotherapy*, 2010, Mar;2(2):201-11.
2. Kuroda T, Hirohashi Y, Mariya T. et al. ALDH1-high ovarian cancer stem-like cells can be isolated from serous and clear cell adenocarcinoma cells, and ALDH1 high expression is associated with poor prognosis, *PLoS One*, 2013, Jun 6;8(6):e65158.
3. Mariya T, Hirohashi Y, Sato N. et al. Matrix metalloproteinase-10 regulates stemness of ovarian cancer stem-like cells by activation of canonical Wnt signaling and can be a target of chemotherapy-resistant ovarian cancer, *Oncotarget*, 2016, May 3;7(18):26806-22
4. Asano T, Hirohashi Y, Mariya T. et al. Brother of the regulator of the imprinted site (BORIS) variant subfamily 6 is involved in cervical cancer stemness and can be a target of immunotherapy, *Oncotarget*, 2016, Mar 8;7(10):11223-37.
5. Hashimoto S, Mariya T, Torigoe T. et al. Comprehensive single-cell transcriptome analysis reveals heterogeneity in endometrioid adenocarcinoma tissues, *Sci Rep*, 2017, Oct 27;7(1):14225.
6. Tabuchi Y, Hirohashi Y, Mariya T. et al. Clonal analysis revealed functional heterogeneity in cancer stem-like cell phenotypes in uterine endometrioid adenocarcinoma, *Exp Mol Pathol*, 2019, Feb;106:78-88.