

# 子宮体癌における 癌幹細胞の生物学的特性解析

2013 年度

指導: 坂口 卓也 教授

倉敷芸術科学大学大学院

産業科学技術研究科

機能物質化学専攻

富安 聡

－目次－

要旨	4
第 1 章 序論	9
第 2 章 紫色レーザー搭載型セルソーターによる side population (SP) 細胞の分取法の確立	
2-1 研究の背景および目的	23
2-2 研究の方法	31
2-3 研究結果	34
2-4 考察	39
2-5 引用文献	44
第 3 章 細胞造腫瘍能解析系の確立	
3-1 研究の背景および目的	49
3-2 研究の方法	50
3-3 研究結果	51
3-4 考察	56
3-5 引用文献	59

<b>第 4 章 紫色レーザー搭載型セルソーターにより分取した SP 細胞中に存在する子宮体癌幹細胞の証明</b>	
4-1 研究の背景および目的	62
4-2 研究の方法	64
4-3 研究結果	67
4-4 考察	84
4-5 引用文献	87
<b>第 5 章 子宮体癌幹細胞における分子マーカーの探索</b>	
5-1 研究の背景および目的	90
5-2 研究の方法	93
5-3 研究結果	97
5-4 考察	102
5-5 引用文献	105
<b>第 6 章 結論</b>	109
<b>業績リスト</b>	110
<b>謝辞</b>	113

## 要旨

癌幹細胞とは、腫瘍組織内に極少数存在し、自己複製能・分化能・造腫瘍能を有しており、癌の発生・維持に関与している細胞である。また、癌幹細胞は薬剤排出能や DNA 修復能により化学療法や放射線療法に抵抗性を示すと共に、浸潤能が亢進していることから癌の再発、転移に関与している。従って、癌幹細胞が存在する限り、癌の根治は困難であると考えられている。癌幹細胞は、1997 年に急性骨髄性白血病において白血病幹細胞として最初に同定された。これを契機に様々な固形腫瘍においても癌幹細胞が同定され、その特性解析が行われており、癌幹細胞を標的とする新規治療法の開発が進められている。しかし、子宮体癌については、近年、食の欧米化に伴い増加傾向にあるものの、癌幹細胞は同定されておらず、解析が進んでいないのが現状である。

通常、癌幹細胞を分取するためには、癌幹細胞の薬剤排出能に基づき細胞を DNA 結合蛍光色素である Hoechst 33342 (Hoechst) により染色し、紫外線レーザーを用いて励起することで side population (SP) 分画に存在する細胞 (SP 細胞) として検出する必要がある。しかし、従来用いられている紫外線レーザー搭載型セルソーターは、高価な大型機器であり、紫外線を照射することから細胞の DNA に損傷をもたらす。さらに操作やメンテナンスが煩雑であることから専門のオペレーターを必要とする。以上の点が、SP 細胞分取による癌幹細胞研究の妨げとなっている。

本研究は、これら紫外線レーザー搭載型セルソーターの欠点を克服すること

のできる紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いた新規解析法による子宮体癌幹細胞の分取法の確立と、さらにその子宮体癌幹細胞を選択的に標識する分子マーカーを探索した結果に関するものである。

第 1 章では、癌幹細胞の概念とその同定、再発・転移への関与について詳細に記述した。また、本邦における子宮体癌の現状（罹患率、治療法、発癌機構）とその問題点について記述し、癌幹細胞の研究対象としての重要性を述べた。

第 2 章では、ヒト子宮体癌細胞株より紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて、紫外線レーザー搭載型セルソーターを用いた場合と同様に SP 細胞を検出することが可能か否か検討した結果について記述した。高分化型、中分化型、低分化型のヒト子宮体癌細胞株 3 株を対象に Hoechst 染色を施し、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いた新規解析法により SP 細胞の存在率を解析した。その結果、それぞれの細胞株において薬剤排出能を阻害する verapamil を投与することで消失する細胞集団を検出することができた。従って、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いた新規解析法は、紫外線レーザー搭載型セルソーター同様に SP 細胞を検出することが可能であると示唆された。

第 3 章では、細胞造腫瘍能解析系の確立について記述した。第 2 章において紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いた SP 細胞の分取法を確立した。しかし、分取した SP 細胞中に癌幹細胞が存在することを証明するためには、自己複製能、分化能、造腫瘍能を解析する必要がある。特に、造腫瘍能

は *in vivo* でのみ解析が可能である。そこで、分化度の異なる細胞株 3 株を免疫不全マウスへ移植し、造腫瘍能解析系の確立を目指した。また、SP 細胞を紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて分取する際には細胞を 4°C で 9 時間保存することになるため、その影響についても合わせて検討した。その結果、低分化型の細胞株は他の細胞株と比較して高い造腫瘍能を示した。また、細胞を 4°C で 9 時間保存することにより対照群と比較して腫瘍形成までにかかる期間の遅延が認められたが、腫瘍形成が認められたため、この実験系を用いて紫色レーザー搭載型 FACS Aria より分取した SP 細胞の造腫瘍能を解析することが可能であると示唆された。

第 4 章では、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて新規解析法により分取した SP 細胞中に癌幹細胞が存在することを証明するため、第 3 章の検討において最も高い造腫瘍能を示した低分化型細胞株の SP 細胞および非癌幹細胞で構成されていると考えられる main population (MP) 細胞を対象に自己複製能、分化能、造腫瘍能の解析を行った。その結果、SP 細胞は SP 分画を維持すると共に、MP 細胞へと分化し、自己複製能および分化能を有する細胞であることが確認された。また、SP 細胞は MP 細胞と比較して *in vivo* において高い造腫瘍能を示した。さらに、*in vitro* においても *in vivo* 同様に SP 細胞は高い増殖能を示した。これらの結果より、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて分取した SP 細胞中には子宮体癌幹細胞が存在することが証明された。従って、癌幹細胞は、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用い

て分取することが可能であり、癌幹細胞研究に有用な分取機器の一つに成り得ることが示唆された。

第 5 章では、子宮体癌幹細胞分子マーカーの探索について記述した。第 2 章および第 4 章より紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて分取した SP 細胞中に子宮体癌幹細胞の存在が証明されたことから、SP 細胞に特異的に発現する分子を検索することで、子宮体癌幹細胞分子マーカーの同定を試みた。そこで、子宮体癌の発生に関与していることが知られている *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS)* に着目し、KRAS の発現について mRNA および蛋白発現解析を行った。その結果、SP 細胞では KRAS の mRNA および蛋白発現共に MP 細胞と比較して有意に高値を示した。このことから、KRAS が子宮体癌において癌幹細胞分子マーカーと成り得ることが示唆された。また、近年の癌幹細胞研究において、マウス卵巣上皮細胞に *C-myc* および *v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (Kras)* を導入することで卵巣癌幹細胞が作製できたという報告がある。この報告より、ヒトの子宮体癌幹細胞の発生・維持においても KRAS が関与していることが考えられる。

以上の結果から、紫外線レーザー搭載型セルソーターを用いた場合と同様に、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて SP 細胞を分取できることが示された。また、ヒト子宮体癌細胞株より分取した SP 細胞は、自己複製能および分化能を有すると共に、MP 細胞と比較して高い造腫瘍能を有することから、SP

細胞中に子宮体癌幹細胞が存在することが証明された。さらに、悪性度の高いヒト子宮体癌細胞株において、SP 細胞は KRAS 陽性細胞を優勢に含むことから、癌幹細胞は KRAS を発現し、癌の発生・維持に関与していると考えられる。加えて、KRAS は高悪性度の子宮体癌において癌幹細胞分子マーカーとして診断に有用であることが示された。また、紫色レーザー搭載型 FACSAria は紫外線レーザー搭載型セルソーターの欠点を克服しており、この技術を用いた癌幹細胞分取の報告は、本研究が最初である。従って、本研究で提示した紫色レーザー搭載型 FACSAria による癌幹細胞分取法を検討評価することにより、癌幹細胞研究の更なる効率化が期待される。



## 第 1 章

### 序論

自己複製能と分化能を有する幹細胞は、組織・臓器を構成する細胞集団の階層性の維持に密接に関与しており、その機能の異常または低下による組織・臓器への影響は甚大である<sup>1)</sup>。幹細胞は薬剤排出に関わる ATP-binding cassette (ABC) transporter と呼ばれる細胞膜蛋白を発現することで、一旦取り込んだ薬剤や毒物を排出し有害物質から逃れる生態防御システムを備えている<sup>2)</sup>。

現在、本邦における死因の約 30% は悪性新生物、いわゆる「がん」によるものであり、心疾患や肺炎を上回り第 1 位となっている (Fig. 1)<sup>3)</sup>。近年、がん克服へ向けた新たな研究対象として「癌幹細胞」が重要視されている<sup>4)</sup>。癌幹細胞とは、幹細胞特性である自己複製能、分化能に加え、高い造腫瘍能を有しており、極少数の細胞により癌を形成することができ、癌組織の維持・増大に関与している細胞である (Fig. 2)<sup>4)</sup>。さらに、癌幹細胞は正常幹細胞と同様に ABC transporter を発現し、薬剤排出能を有すると共に、DNA 修復能が亢進している<sup>5,6)</sup>。そのため、化学療法や放射線療法に高い抵抗性を示し、治療後に残存することにより癌の再発に関与している (Fig. 2)<sup>5,6)</sup>。従って、癌幹細胞が存在する限り癌の根治は困難であり、癌幹細胞を標的とする新規治療法の開発が望まれている。また、癌細胞が他の臓器に転移するためには、その細胞が原発巣から遊離するだけでなく、周囲の組織に浸潤・遊走し、血管やリンパ

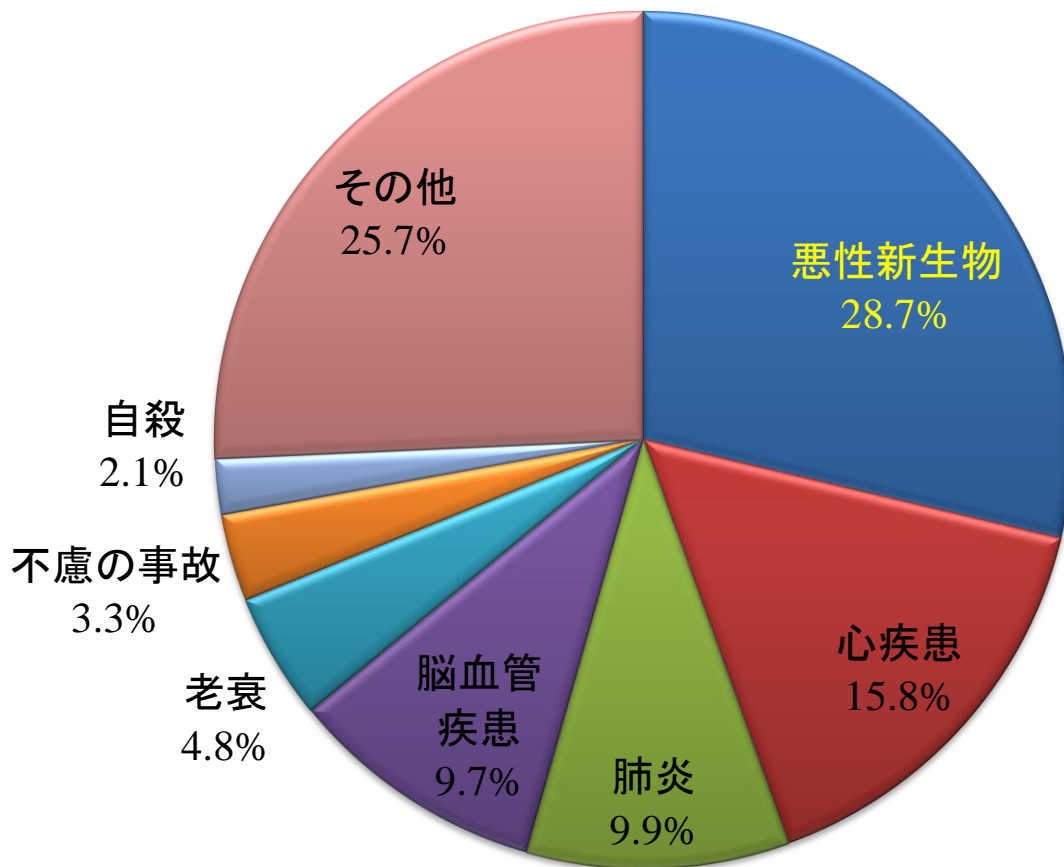
管に入り込まなければならない。さらに、到達した部位で新しく癌を形成する能力が必要となることから、浸潤・転移においても癌幹細胞が関与していると考えられている (Fig. 2)<sup>7)</sup>。これらのことから、癌幹細胞は、治療標的としてだけではなく、浸潤・転移のメカニズムを解明する上でも重要な知見を与えるものと考えられる。

癌組織が極少数の癌幹細胞の存在により形成されるという癌幹細胞仮説は、今から約 150 年前の 1867 年に Cohnheim により提唱された<sup>8,9)</sup>。この仮説を支持する報告が、近年の活発な幹細胞研究と解析技術の飛躍的な進歩による後年に行われた。1961 年に、McCulloch らにより組織幹細胞が癌の起源であることが提唱され、1967 年に、Pierce により幹細胞の成熟障害により癌が発生することが提唱された<sup>8,10,11)</sup>。そして、癌幹細胞仮説が提唱された 130 年後の 1997 年に Dick らにより、急性骨髄性白血病において白血病幹細胞の存在を証明され、世界で最初に癌幹細胞の存在が報告された<sup>12)</sup>。これを契機として、2003 年には乳癌や脳腫瘍において癌幹細胞が同定され、その後様々な腫瘍において癌幹細胞が同定されており、癌幹細胞研究が進められている<sup>4,13)</sup>。

近年、本邦における生活習慣の欧米化が進み、これまで欧米諸国で高値を示した子宮体癌の罹患率が著しい増加傾向を示している (Fig. 3)<sup>14-16)</sup>。類内膜腺癌は子宮体癌の組織型の中で 80% 以上を占めており、分化の程度により高分化型 (Grade 1; 明瞭な腺管構造が大半を占めており、

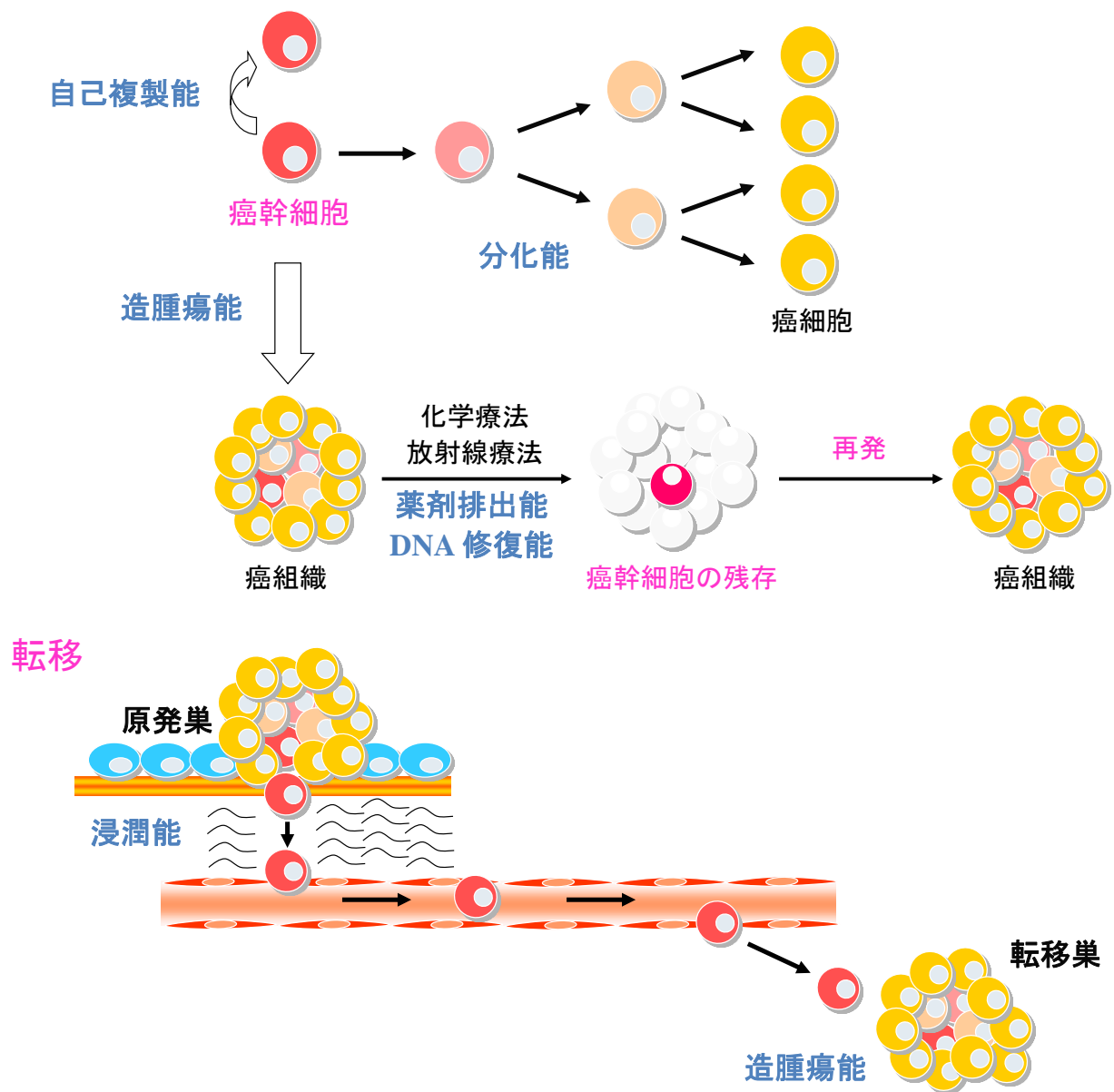
充実性胞巣からなる領域が 5% 以下のもの)、中分化型 (Grade 2; 充実性胞巣からなる領域が 5% をこえるが 50% 以下のもの。ただし、充実性成分が 5% 以下でも核異型が強いもの)、低分化型 (Grade 3; 充実性胞巣からなる領域が 50% をこえるもの。ただし、充実性成分が 50% 以下でも核異型が強いもの) に分類され、低分化なほど予後が悪いことが知られている (Table 1)<sup>17-21)</sup>。また、子宮体癌はエストロゲン依存性で、比較的若年者に発生し、病巣周囲に子宮内膜増殖症や子宮内膜異型増殖症を伴う比較的予後良好な type 1 と、エストロゲン非依存性で、高齢者に多く、予後不良な type 2 に分別される<sup>22)</sup>。Type 1 の組織型は類内膜腺癌の Grade 1、Grade 2 が多く、*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS)* や *phosphatase and tensin homolog (PTEN)* の変異頻度が高い (Fig. 4)<sup>23-27)</sup>。Type 2 の組織型は類内膜腺癌の Grade 3 や非類内膜腺癌 (漿液性腺癌、明細胞腺癌、未分化癌など) が多く、*tumor protein p53 (TP53)* の変異頻度が高い (Fig. 4)<sup>28,29)</sup>。このように、子宮体癌の発癌過程には *KRAS*、*PTEN*、*TP53* が関わっていることが知られているが、その他の詳細な発癌機構については解明されていない。子宮体癌の治療は外科的手術療法が主体となっており、化学療法や放射線療法は、再発の危険性が高い症例に対する補助療法として行われることが多い<sup>30)</sup>。子宮体癌幹細胞を同定し、その特性を解明することは、子宮体癌の発癌機構の解明、新規治療法の開発に繋がると考えられる。しかし、子宮体癌幹細胞は同定されておらず、子宮体癌幹細胞を同定することは早急に解決す

べき課題となっている。



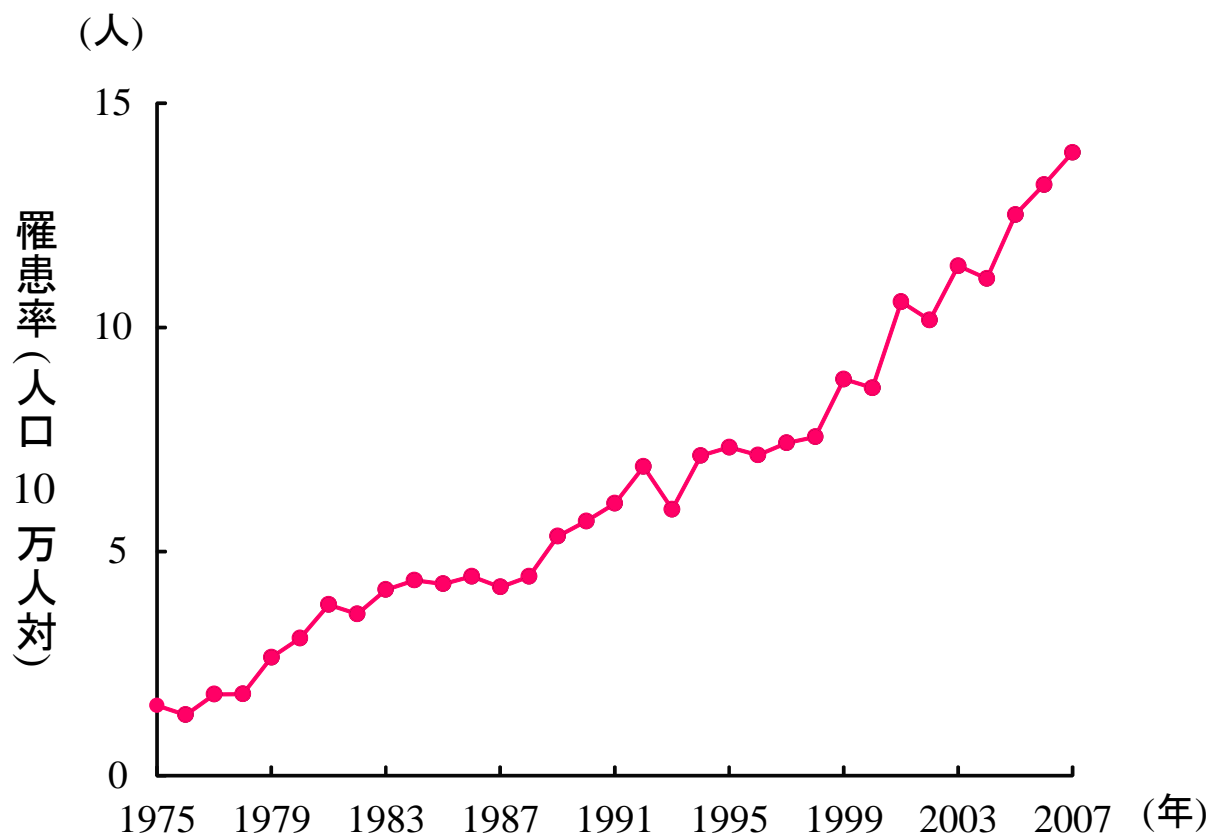
**Fig. 1 本邦における主な死因別死亡数の割合（平成 24 年）**

悪性新生物は、死因の約 30% を占めており、心疾患や肺炎を上回り第 1 位となっている。(厚生労働省平成 24 年人口動態統計データを基に作成)



**Fig. 2 癌幹細胞の特性**

癌幹細胞とは、自己複製能・分化能・造腫瘍能を有しており、癌の発生・維持に関与している細胞である。また、薬剤排出能や DNA 修復能により化学療法や放射線療法に抵抗性を示すと共に、浸潤能が亢進していることから癌の再発、転移に関与している。



**Fig. 3 本邦における子宮体癌の罹患率の年次推移**

生活習慣の変化に伴い、本邦における子宮体癌の罹患率は著しい増加傾向を示している。1975 年と比較して 2007 年では罹患率は 5 倍以上増加している。(国立がん研究センターがん対策情報センターのデータを基に作成<sup>14)</sup>)

Table 1. 子宮体部類内膜腺癌の組織分化度と5年生存率

組織分化度	5年生存率		
	Hauptmann S, <i>et al</i> <sup>11)</sup>	Creutzberg CL, <i>et al</i> <sup>12)</sup>	Salvesen HB, <i>et al</i> <sup>13)</sup>
Grade 1	81 %	97 %	92 %
Grade 2	71 %	94 %	83 %
Grade 3	33 %	76 %	57 %



類内膜腺癌の Grade 1、Grade 2 が多い。

エストロゲン依存性であり、*KRAS*、*PTEN* の遺伝子変異を伴う場合がある。



エストロゲン非依存性であり、*TP53* の遺伝子変異を伴う場合がある。

類内膜腺癌の Grade 3 や非類内膜腺癌 (漿液性腺癌、明細胞腺癌、未分化癌など) が多い。

#### Fig. 4 子宮体癌の発癌機構

エストロゲン依存性で、予後良好な type 1 子宮体癌の発生には、*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS)* や *phosphatase and tensin homolog (PTEN)* の遺伝子変異を伴う場合がある。また、エストロゲン非依存性で、予後不良な type 2 子宮体癌の発生には、*tumor protein p53 (TP53)* の遺伝子変異を伴う場合がある。

## 引用文献

1. Ross EA, Anderson N, Micklem HS. Serial depletion and regeneration of the murine hematopoietic system. Implications for hematopoietic organization and the study of cellular aging. *J Exp Med* 155: 432-444, 1982.
2. Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99: 507-512, 2002.
3. Matsuda A, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H; Japan Cancer Surveillance Research Group. Cancer Incidence and Incidence Rates in Japan in 2007: A Study of 21 Population-based Cancer Registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) Project. *Jpn J Clin Oncol* 43: 328-336, 2013.
4. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3983-3988, 2003.
5. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444:

- 756-760, 2006.
6. Blanpain C, Mohrin M, Sotiropoulou PA, Passegué E. DNA-Damage Response in Tissue-Specific and Cancer Stem Cells. *Cell Stem Cell* 8: 16-29, 2011.
  7. Li F, Tiede B, Massagué J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res* 17: 3-14, 2007.
  8. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* 66: 1883-1890, 2006.
  9. Cohnheim J. Ueber entzündung und eiterung. *Path Anat Physiol Klin Med* 40: 1-79, 1897.
  10. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14: 213-222, 1961.
  11. Pierce GB. Teratocarcinoma: model for a developmental concept of cancer. *Curr Top Dev Biol* 2: 223-246, 1967.
  12. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3: 730-737, 1997.
  13. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors.

- Cancer Res 63: 5821-5828, 2003.
14. Matsuda A, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H and The Japan Cancer Surveillance Research Group. Cancer Incidence and Incidence Rates in Japan in 2007: A Study of 21 Population-based Cancer Registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) Project. Japanese Journal of Clinical Oncology 43: 328-336, 2013.
  15. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. CA Cancer J Clin 57: 43-66, 2007.
  16. Jobo T, Arai T, Sato R, Kuramoto H. Clinicopathologic relevance of asymptomatic endometrial carcinoma. Acta Cytol 47: 611-615, 2003.
  17. 日本産婦人科学会, 日本病理学会, 日本医学放射線学会, 日本放射線腫瘍学会 編. 子宮体癌取扱い規約 第 3 版. 金原出版. 2012.
  18. Bilgin T, Ozuysal S, Ozan H. A comparison of three histological grading systems in endometrial cancer. Arch Gynecol Obstet 272: 23-25, 2005.
  19. Köbel M, Langhammer T, Hüttelmaier S, Schmitt WD, Kriese K, Dittmer J, Strauss HG, Thomssen C, Hauptmann S. Ezrin expression is related to poor prognosis in FIGO stage I endometrioid carcinomas. Mod Pathol 19: 581-587, 2006.

20. Scholten AN, Smit VT, Beerman H, van Putten WL, Creutzberg CL. Prognostic significance and interobserver variability of histologic grading systems for endometrial carcinoma. *Cancer* 100: 764-772, 2004.
21. Mauland KK, Trovik J, Wik E, Raeder MB, Njølstad TS, Stefansson IM, Oyan AM, Kalland KH, Bjørge T, Akslen LA, Salvesen HB. High BMI is significantly associated with positive progesterone receptor status and clinico-pathological markers for non-aggressive disease in endometrial cancer. *Br J Cancer* 104: 921-926, 2011.
22. Deligdish L, Cohen CJ. Histologic correlates and virulence implications of endometrial carcinoma associated with adenomatous hyperplasia. *Cancer* 56: 1452, 1985.
23. Enomoto T, Inoue M, Perantoni AO, Terakawa N, Tanizawa O, Rice JM. K-ras activation in neoplasms of human reproductive tract. *Cancer Res* 50: 6139-6145, 1990.
24. Enomoto T, Inoue M, Perantoni AO, Buzard GS, Miki H, Tanizawa O, Rice JM. K-ras activation in premalignant and malignant epithelial lesions of the human uterus. *Cancer Res* 51: 5308-5314, 1991.
25. Tashiro H, Blazes MS, Wu R, Cho KR, Bose S, Wang SI, Li J, Parsons R, Ellenson LH. Mutations in PTEN are frequent in endometrial

- carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res* 57: 3935-3940, 1997.
26. Kong D, Suzuki A, Zou TT, Sakurada A, Kemp LW, Wakatsuki S, Yokoyama T, Yamakawa H, Furukawa T, Sato M, Ohuchi N, Sato S, Yin J, Wang S, Abraham JM, Souza RF, Smolinski KN, Meltzer SJ, Horii A. PTEN is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nat Genet* 17: 143-144, 1997.
  27. Risinger JI, Hayes AK, Berchuck A, Barrett JC. PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer Res* 57: 4736-4738, 1997.
  28. Khalifa MA, Mannel RS, Haraway SD, Walker J, Min KW. Expression of EGFR, HER-2/neu, p53 and PCNA in endometrioid, serous papillary, and clear cell endometrial adenocarcinomas. *Gynecol Oncol* 53: 84-92, 1994.
  29. Inoue M, Okayama A, Fujita M, Enomoto T, Sakata M, Tanizawa O, Ueshima H. Clinicopathological characteristics of p53 overexpression in endometrial cancers. *Int J Cancer* 58: 14-19, 1994.
  30. Bakkum-Gamez JN, Gonzalez-Bosquet J, Laack NN, Mariani A, Dowdy SC. Current issues in the management of endometrial cancer. *Mayo Clin Proc* 83: 97-112, 2008.

## 第 2 章

### 紫色レーザー搭載型セルソーターによる side population (SP) 細胞の分取法の確立

#### 2-1 研究の背景および目的

正常幹細胞の薬剤排出能には ABC transporter が関与しており、中でも ATP-binding cassette, sub-family B, member 1 (ABCB1/MDR1) や ATP-binding cassette, sub-family G, member 2 (ABCG2) の発現が高いことが報告されている<sup>1,2)</sup>。同様に、癌幹細胞の薬剤排出能においても、ABCB1 および ABCG2 が関与していると考えられており、癌幹細胞分取には、ABCB1 および ABCG2 依存的に細胞外へと排出される細胞膜透過性 DNA 特異的蛍光色素 Hoechst 33342 (Hoechst) を用いる方法が応用されている (Fig. 1)<sup>1-4)</sup>。薬剤排出能を有する癌幹細胞は Hoechst を細胞外に排出するため、核は Hoechst 蛍光陰性を示す。一方、薬剤排出能を持たない非癌幹細胞は Hoechst を細胞外に排出することができないため、核は Hoechst 蛍光陽性を示す<sup>5-10)</sup>。これら Hoechst により染め分けられた細胞の解析には、従来、紫外線レーザー搭載型の蛍光標示式細胞分取器 (fluorescence activated cell sorter; FACS) が用いられてきた。Hoechst は紫外線レーザーで励起することにより青色から赤色の蛍光を放射する (Fig. 2)。そこで、個々の細胞の青色の蛍光強度を縦軸に、赤色の蛍光強度を横軸にとり展開すると、癌幹細胞は side

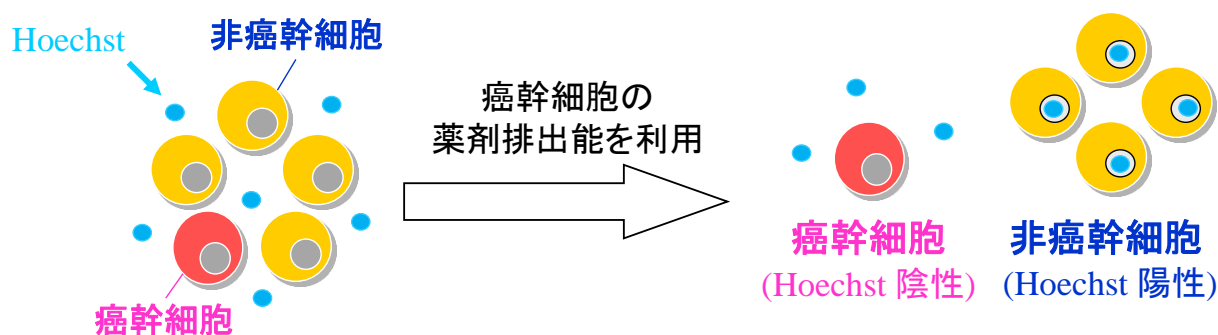
population (SP) 細胞と呼ばれる Hoechst 蛍光陰性の細胞集団を構成し、非癌幹細胞は main population (MP) 細胞あるいは non-SP (NSP) 細胞と呼ばれる Hoechst 蛍光陽性の細胞集団を構成する (Fig. 3)<sup>1-4)</sup>。SP 細胞は神経膠腫、乳癌、卵巣癌、肝癌、胃癌などの固形腫瘍やその細胞株から分離されており、SP 細胞中に癌幹細胞が存在することが明らかにされている<sup>3,4,11,12)</sup>。SP 細胞を検出するためには、350 nm の紫外線レーザーにより Hoechst を励起する必要がある<sup>3,13)</sup>。337 nm から 367 nm の励起紫外線光源の最も一般的な供給源は水冷アルゴンレーザーやクリプトンイオンガスレーザーである。しかし、これらのレーザーを搭載したフローサイトメトリーやセルソーターは大型で、操作やメンテナンスが煩雑であるという欠点があるため、専門のオペレーターを必要とする。また、紫外線を照射することから細胞の遺伝子損傷を避けることができない<sup>3,13)</sup>。従って、紫外線レーザーを搭載している FACS Vantage (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)、Cytomation MoFlo (Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA)、Beckman Coulter Altra (Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA) といったフローサイトメトリーやセルソーターの使用は限られている (Table 1)<sup>3,13)</sup>。FACS Vantage とは対照的に、紫色レーザー搭載型 FACS Aria (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) は、高い分取効率を有しており、操作やメンテナンスが容易であることから、専門のオペレーターを必要としない上に、細胞分取速度が速く、安価であるという特徴を有する。さらに、紫色レーザーは、紫外線による遺伝子損傷の可能性を最小



限に抑えることができる (Table 1) <sup>3,13</sup>)。現在までに、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて SP 細胞を分取したという報告はなされておらず、これが可能となれば癌幹細胞研究の効率化を図ることができると期待される。

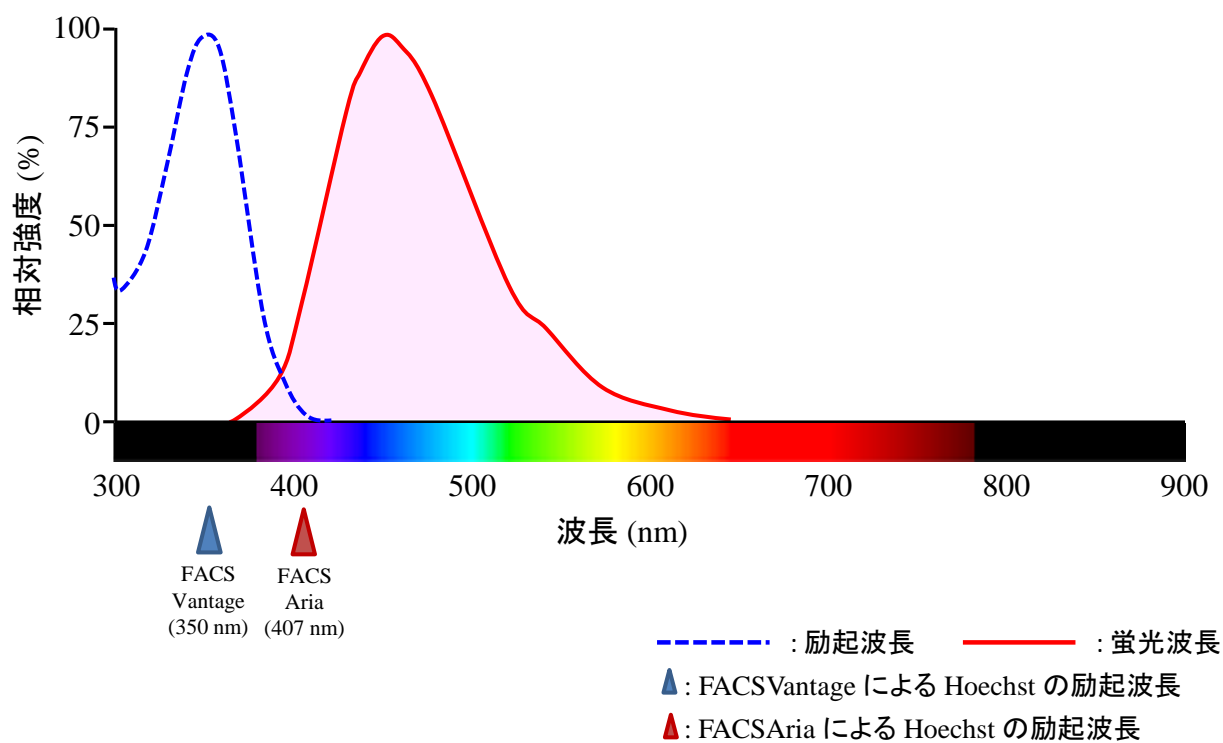
本研究で用いる紫色レーザー搭載型 FACS Aria は、細胞の分取において液滴荷電方式を用いており、ノズルを超音波振動させることにより、シース流は途中から液滴を形成する。目的の細胞を含むシース流が液滴を形成しようとする寸前にシース流を荷電すると、液滴を形成する以前のシース液はアースにより荷電がキャンセルされるが、液滴は荷電状態を維持する。荷電した液滴は下流にある偏向板に引き寄せられ、チューブへと回収される。この機構を用いることにより、個々の細胞が持つ多数の情報をもとに、極めて高い純度で、目的の生細胞を無菌的かつ正確に任意の数だけ入手することが可能となっている (Fig. 4)。

本研究では紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いた SP 細胞の分取法を確立することを目的に、紫外線レーザー同様に紫色レーザーで SP 細胞を検出・分取することが可能か否かヒト子宮体部類内膜腺癌細胞株を対象にフローサイトメトリー解析を行ったので報告する。



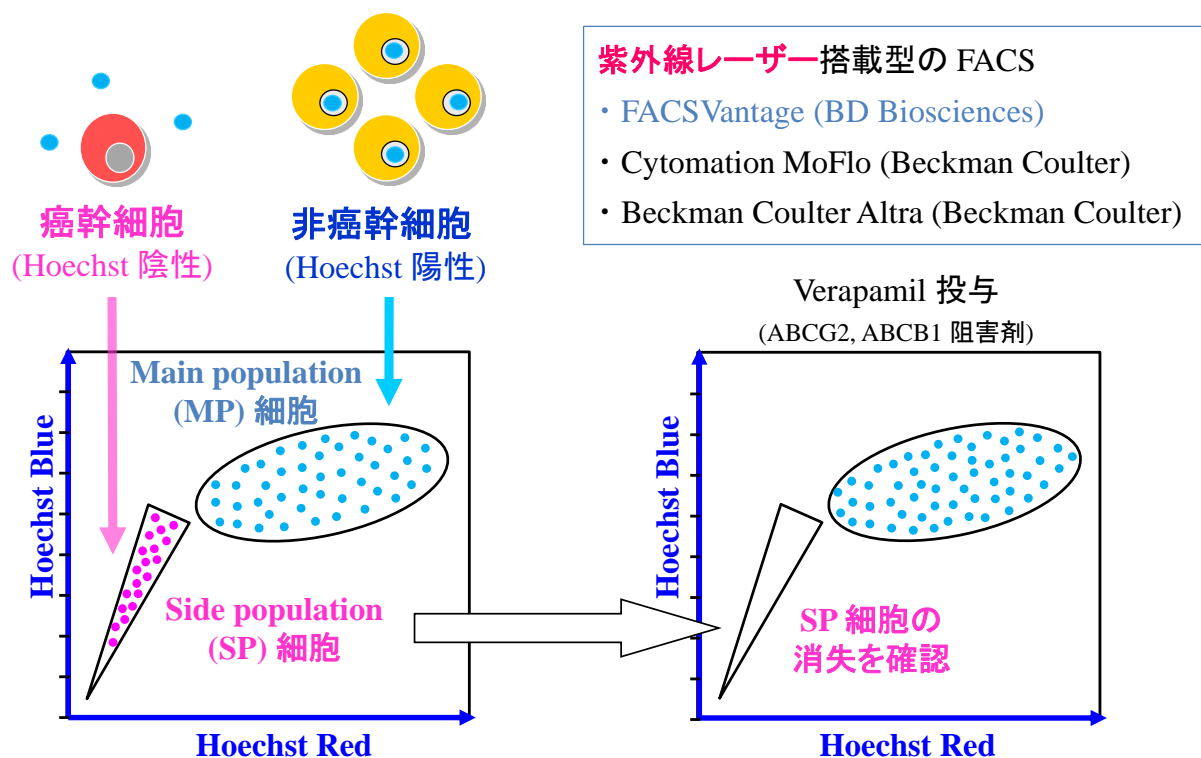
**Fig. 1 細胞膜透過型 DNA 結合蛍光色素 Hoechst 33342 (Hoechst) による選択的染色**

癌幹細胞の薬剤排出能に関わる ATP-binding cassette (ABC) transporter (ABCB1, ABCG2) による Hoechst 排出に基づき、癌幹細胞と非癌幹細胞を染め分けることができる。



**Fig. 2 Hoechst の励起波長および Hoechst を励起することで得られる蛍光波長**

Hoechst は紫外線レーザー (350 nm) により励起することで青色から赤色の蛍光を放射する。

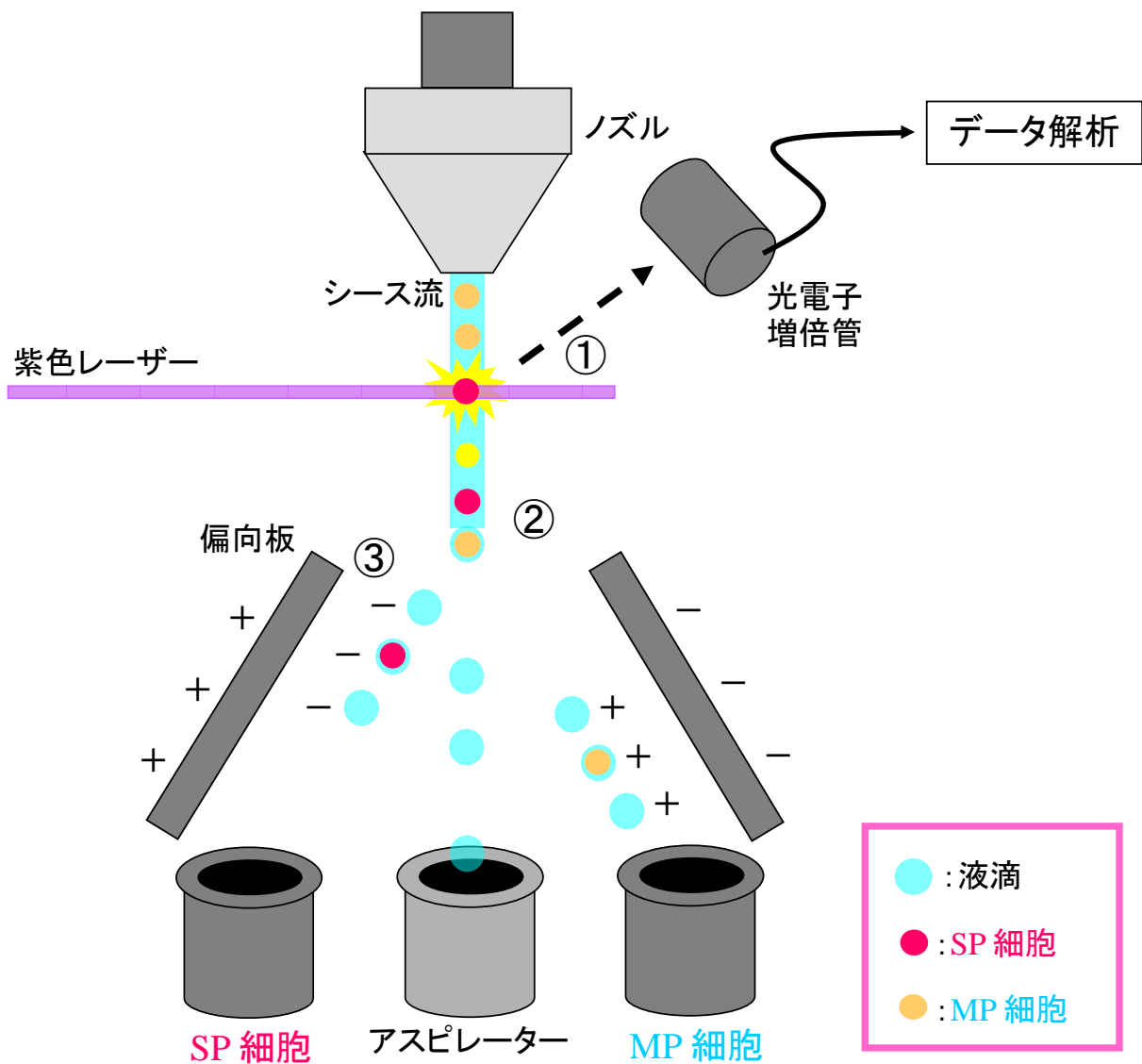


**Fig. 3 従来法 : 紫外線レーザー搭載型 FACS Vantage による解析・分取**

Hoechst が放出する青色の蛍光強度を縦軸に、赤色の蛍光強度を横軸にとり展開すると、SP 細胞を検出することができる。また、SP 細胞を分取するには、verapamil により薬剤排出能を阻害することで、SP 細胞が消失することを確認する。

**Table 1. FACS (FACSVantage および FACS Aria) の比較**

	Hoechst 励起用 レーザー	平均 分取効率 (個 / 秒)	操作 メンテナンス	オペレーター	細胞の 遺伝子損傷	装置の 大きさ	普及率	癌幹細胞 (SP 細胞) 分取
FACSVantage (従来法)	紫外線 レーザー (350 nm)	3,000 ? 10,000	難	必要	あり	大型	低	◎
FACS Aria	紫色 レーザー (407 nm)	8,000 ? 18,000	易	なし	なし	小型	高	?



**Fig. 4 紫色レーザー搭載型 FACS Aria による細胞分取の原理（液滴荷電方式）**

①紫色レーザーにより励起された個々の細胞における Hoechst 蛍光のデータを読み取る。②SP 細胞および MP 細胞を含むシース流が液滴を形成する瞬間に液滴を正または負に荷電させる。③荷電した液滴は電位差を有する偏向板に引きつけられるため、SP 細胞および MP 細胞の生細胞をチューブに回収することができる。

## 2-2 研究の方法

### 細胞株

分化度の異なるヒト子宮体部類内膜腺癌細胞株 Ishikawa (Grade 1; 高分化型、European Collection of Cell Culture, UK, 99040201)、HEC-1 (Grade 2; 中分化型、Japan Health Sciences Foundation, Japan, JCRB0042)、HEC-50B (Grade 3; 低分化型、Japan Health Sciences Foundation, Japan, JCRB1145) を用いた。

### 細胞培養

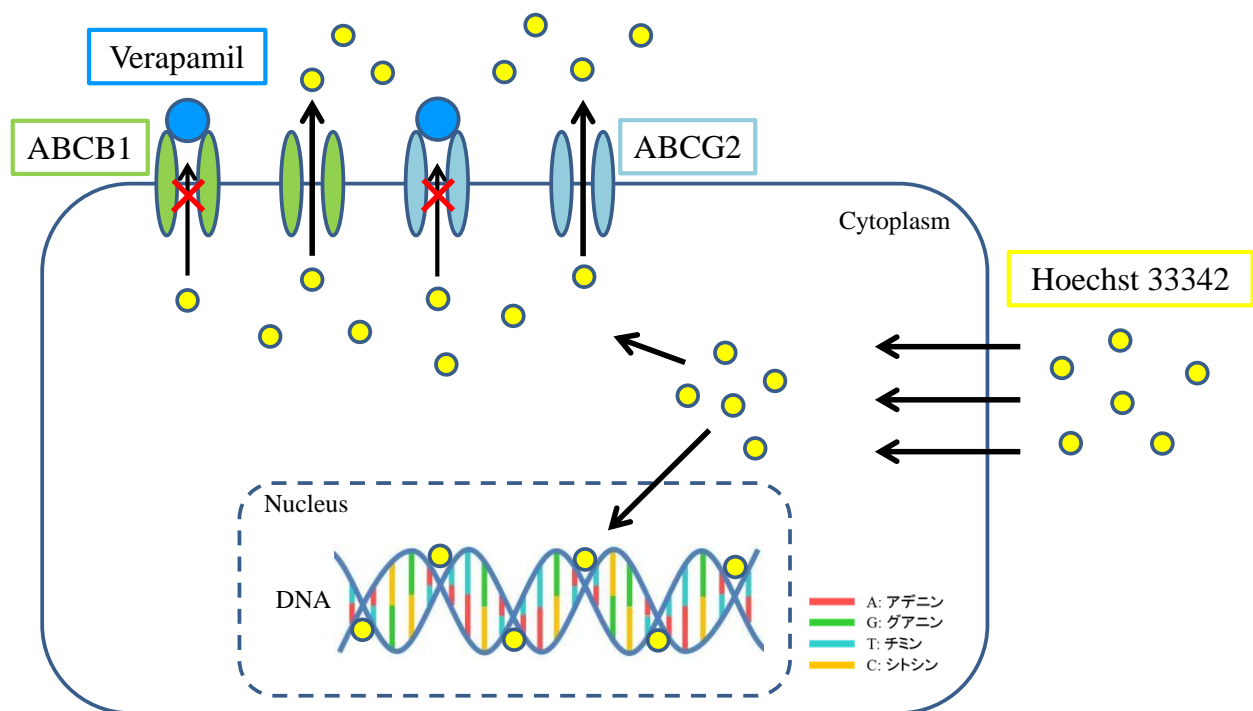
10% fetal bovine serum (FBS, MP Biomedicals, USA) を含む Eagles' minimum essential medium (EMEM, MP Biomedicals, USA) を各細胞株の培地として用いた。細胞を Cell Culture Dish 100×20 mm (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) に播種し、5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下にて培養した。

### フローサイトメトリー解析による SP 細胞および MP 細胞の検出

各細胞株において Hoechst を排出する SP 細胞の存在を紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて紫外線レーザー同様に検出することが可能か否か検討した。HEC-50B を 0.2% EDTA-2Na 加トリプシンにて培養皿より剥離し、2% FBS 加 Hanks' balanced salt solution (Nacalai Tesque, INC., Japan)

に  $1 \times 10^6$  個/mL になるように浮遊させ、Hoechst (8.9  $\mu$ M; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で 37°C にて 90 分間染色した。また、SP 細胞の存在の有無を確認するために、Hoechst および verapamil (ABC transporter inhibitor; 終濃度, 75  $\mu$ M; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加した細胞懸濁液を用意した。洗浄後、死細胞を検出するため、2  $\mu$ g/mL の propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) により 4°C で 10 分間染色した。染色後、紫色レーザー搭載型 FACS Aria により解析を行い、PI 陽性細胞を死細胞として除去後、Hoechst を指標に SP 細胞の検出を試みた。Hoechst および verapamil の作用機序は Fig. 5 に示す。





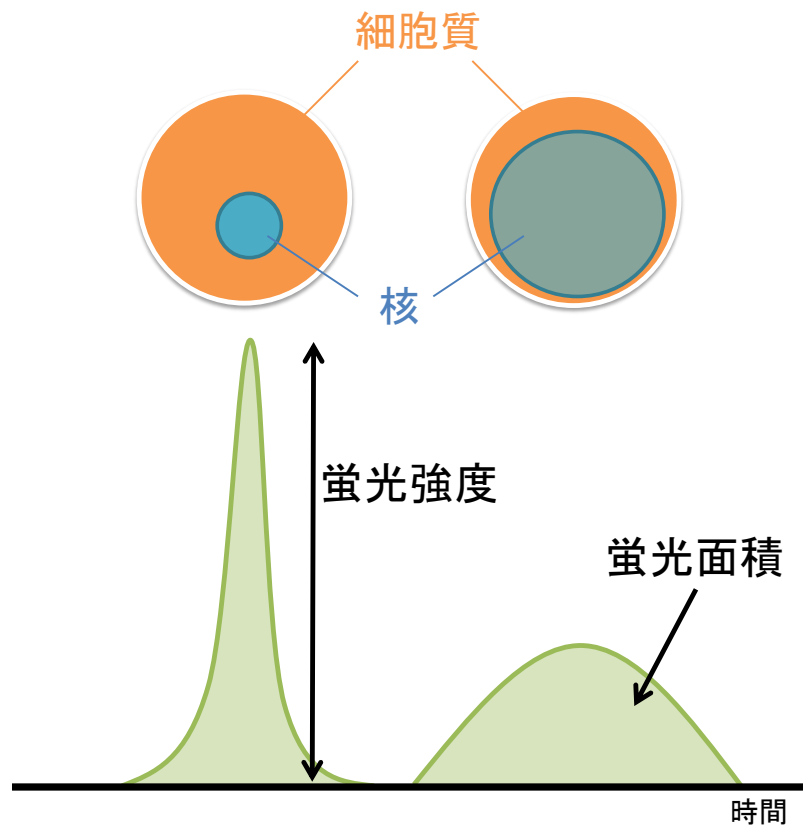
**Fig. 5 Hoechst および verapamil の作用機序**

薬剤排出能を有する細胞において、細胞膜透過型の Hoechst は細胞膜を通過後、ABCB1 および ABCG2 依存的に細胞外へ排出される。Verapamil は ABCB1 および ABCG2 の基質として働き、薬剤排出能を阻害する。Verapamil により Hoechst を細胞外へ排出することができなくなった細胞や薬剤排出能を持たない細胞は、細胞質内に残存する Hoechst が、さらに核膜を通過して DNA の副溝の AT 配列に結合するため核が染色される。

## 2-3 研究結果

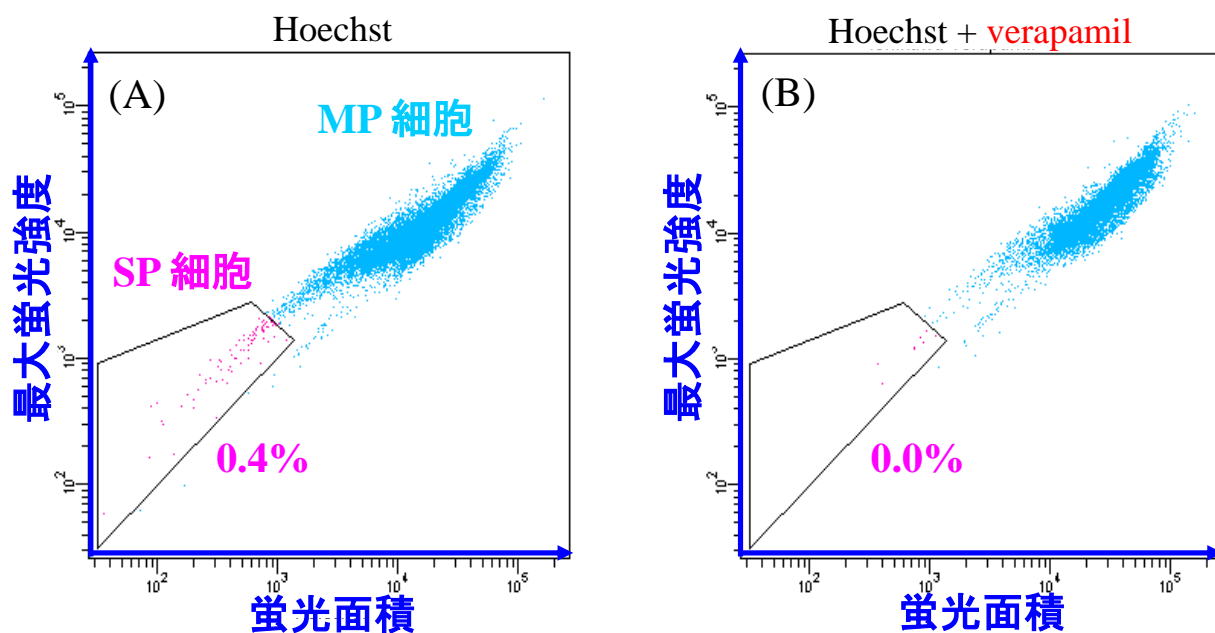
### フローサイトメトリー解析

紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて Hoechst 排出能に基づく SP 細胞の検出を試みた。紫色レーザーは、従来用いられている紫外線レーザーと同様の原理で Hoechst を励起し、青色と赤色の蛍光を検出することが不可能である。そこで、新規解析法として細胞がレーザーを通過する間の最大蛍光強度と蛍光面積を検出することにした (Fig. 6)。個々の細胞の最大蛍光強度を縦軸に、蛍光面積を横軸にとり展開したところ、Ishikawa (Grade 1) において、verapamil を投与することで消失する細胞集団、すなわち SP 細胞を 0.4% 検出した (Fig. 7)。同様に、HEC-1 (Grade 2) においては 0.5%、HEC-50B (Grade 3) においても 0.5% の SP 細胞を検出した (Fig. 8, 9)。



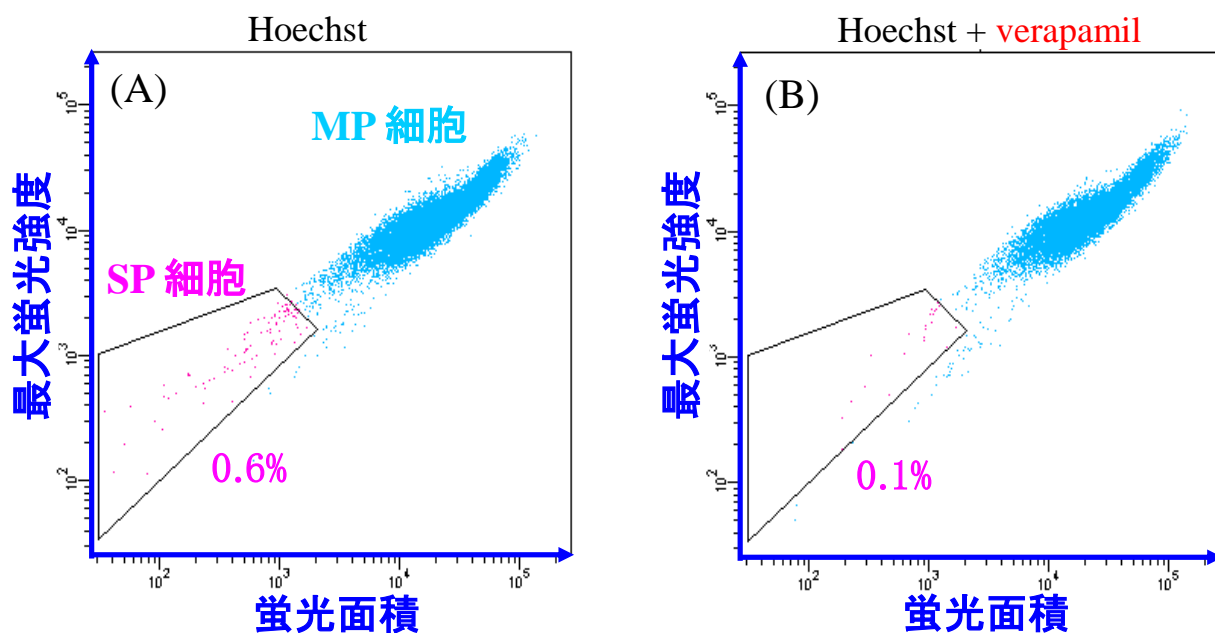
**Fig. 6 紫色レーザーにより Hoechst 蛍光を検出するための新規解析法**

紫色レーザーによる新規解析法として細胞の最大蛍光強度と蛍光面積を検出する。



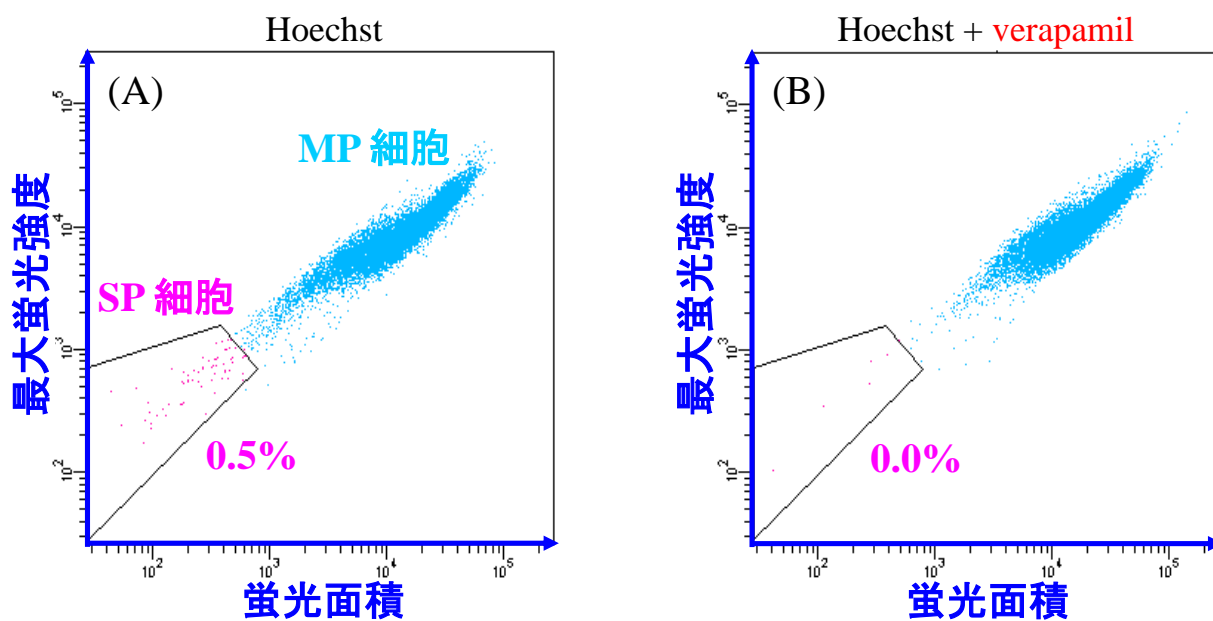
**Fig. 7 Ishikawa (Grade 1) のフローサイトメトリー解析**

紫色レーザー搭載型 FACS Aria による新規解析法を用いて Hoechst 排出能に基づく SP 細胞の検出を Ishikawa を対象に試みた。(A) Hoechst 蛍光強度、蛍光面積が共に弱い SP 分画を認めた。(B) Verapamil を投与することで、SP 分画は減少した。



**Fig. 8 HEC-1 (Grade 2) のフローサイトメトリー解析**

紫色レーザー搭載型 FACS Aria による新規解析法を用いて Hoechst 排出能に基づく SP 細胞の検出を HEC-1 を対象に試みた。(A) Hoechst 蛍光強度、蛍光面積が共に弱い SP 分画を認めた。(B) Verapamil を投与することで、SP 分画は減少した。



**Fig. 9 HEC-50B (Grade 3) のフローサイトメトリー解析**

紫色レーザー搭載型 FACS Aria による新規解析法を用いて Hoechst 排出能に基づく SP 細胞の検出を HEC-50B を対象に試みた。(A) Hoechst 蛍光強度、蛍光面積が共に弱い SP 分画を認めた。(B) Verapamil を投与することで、SP 分画は減少した。

## 2-4 考察

SP 細胞は元来、骨髄から Hoechst を排出する小集団として同定された<sup>1,3,13)</sup>。Hoechst は DNA に結合することで核を明るく染める<sup>1,3,4,13)</sup>。ABC transporter ファミリーのメンバーは、細胞の薬剤排出において重要な役割を果たしており、中でも ABCB1、ABCG2 は Hoechst 排出機構に関与している蛋白として特定された<sup>1,3,4,13)</sup>。ABC transporter による Hoechst を排出する能力を有する細胞は、SP 分画を構成し、ABC transporter を欠いた大部分の細胞は MP 分画を構成する。SP 細胞の検出は、紫外線レーザー励起による Hoechst 固有の蛍光発光に依存する<sup>3,13)</sup>。Hoechst の励起には、紫外線光源が必要であるが、紫外線レーザー搭載型セルソーターは高価な大型機器であり、高出力を必要とし、さらに細胞の DNA に損傷をもたらす<sup>3,13)</sup>。近年、Simpson らにより 407 nm 紫色レーザーで Hoechst を励起することでもマウスの骨髄から SP 細胞を検出することが可能であり、その中に造血幹細胞が存在することが報告された<sup>14)</sup>。このことから、紫色レーザー搭載型 FACSAria を用いて SP 細胞中に存在する癌幹細胞を検出することが可能であると示唆された。しかし、現在までにそのようなことは報告されていない。そこで、癌幹細胞の Hoechst 排出能に基づき紫色レーザー搭載型 FACSAria を用いてヒト子宮体部類内膜腺癌細胞株より SP 細胞を検出することが可能か否か検討した。本研究では、安価なレーザー光源で、紫外線による DNA 損傷の可能性を最小限に抑え、解析および分取することができる紫色レーザー搭載型 FACSAria

を用いた。この技術を用いた SP 細胞の分取の報告は、本研究が最初である。

癌幹細胞は、白血病、脳腫瘍、乳癌、肺癌、前立腺癌といった様々な悪性腫瘍の SP 細胞中に存在することが報告されている<sup>15-19)</sup>。本研究において、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて縦軸に最大蛍光強度、横軸に蛍光面積をとり、個々の細胞のデータを展開した。その結果、紫外線レーザーと同様に、癌幹細胞の薬剤排出能を阻害する verapamil を投与することで消失する細胞集団を Ishikawa (Grade 1) では 0.4%、HEC-1 (Grade 2) では 0.5%、HEC-50B (Grade 3) では 0.5% 検出することができた。これらの細胞集団が SP 細胞であると考えられる。従って、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いた新規解析法により SP 細胞を分取することが可能であることを実証した。しかし、薬剤排出能に基づき分取した SP 細胞中に必ず癌幹細胞が存在しているとは限らない。分取した SP 細胞中に癌幹細胞が存在することを証明することで、初めて紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いた新規解析法が癌幹細胞研究に有用であることを示すことができる。SP 細胞中に癌幹細胞が存在していることを証明するためには、自己複製能、分化能、造腫瘍能の解析が不可欠であり、癌幹細胞の造腫瘍能を解析する有効な実験系は、免疫不全マウスモデルを用いた *in vivo* における解析のみである。実際、これまでに同定されている多くの癌幹細胞の造腫瘍能は、免疫不全マウスを用いて *in vivo* において解析がなされている<sup>20-23)</sup>。そこで、紫色レーザー搭載型 FACS Aria により分取した SP 細胞中に癌幹細胞が存在していることを証明するにあたり、造腫瘍能



解析が必須となることから、まず細胞造腫瘍能解析系の確立を目指した。次の第 3 章において細胞造腫瘍能解析系の確立について述べた。

本研究の一部は以下にて発表済みである。

- Tomiyasu S, Miyamoto T, Mori M, Yaguchi T, Yakushiji H, Ohno S, Miyake Y, Sakaguchi T, Ueda M, Ohno E. Isolation of side population cells from endometrial cancer cells using a violet laser diode. *Human Cell* 27: 36-42, 2014.
- 富安 聡, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. 子宮体癌における side population 細胞の特性解析. 第 30 回 日本ヒト細胞学会学術集会 2012.
- 富安 聡, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. Sorting of cancer stem cells using FACS Aria equipped with violet laser. 第 71 回 日本癌学会学術総会 2012.
- 富安 聡, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. 子宮体癌における癌幹細胞の生物学的特性解析. 第 54 回 日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 2013.
- 富安 聡, 宮本朋幸, 森 康浩, 矢口貴博, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. Violet レーザーにより分取した side population 細胞の特性解析. 第 8 回 日本臨床検査学教育学会学術大会 2013.

- 富安 聡, 宮本朋幸, 森 康浩, 矢口貴博, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. **Characteristic of side population cells sorted by using violet laser.** 第 72 回 日本癌学会学術総会 2013.

## 2-5 引用文献

1. Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99: 507-512, 2002.
2. Bunting KD. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells* 20: 11-20, 2002.
3. Tomiyasu S, Miyamoto T, Mori M, Yaguchi T, Yakushiji H, Ohno S, Miyake Y, Sakaguchi T, Ueda M, Ohno E. Isolation of side population cells from endometrial cancer cells using a violet laser diode. *Human Cell* 27: 36-42, 2014.
4. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14228-14233, 2004.
5. 松本俊一，宮本朋幸，須々木ひとみ，薬師寺宏匡，大野節代，三宅康之，坂口卓也，荒武八起，大野英治．子宮体癌における癌幹細胞の検討．*日本臨床細胞学会岡山支部会誌* 26: 53-55, 2007.

6. 富安 聡，森 康浩，宮本朋幸，薬師寺宏匡，大野節代，三宅康之，坂口卓也，大野英治．子宮体癌における side population 細胞の特性解析．第 30 回 日本ヒト細胞学会学術集会要旨集 70, 2012.
7. 富安 聡，森 康浩，宮本朋幸，薬師寺宏匡，大野節代，三宅康之，坂口卓也，大野英治．Sorting of cancer stem cells using FACS Aria equipped with violet laser. 第 71 回 日本癌学会学術総会要旨集 138, 2012.
8. 富安 聡，森 康浩，宮本朋幸，薬師寺宏匡，大野節代，三宅康之，坂口卓也，大野英治．子宮体癌における癌幹細胞の生物学的特性解析．第 54 回 日本臨床細胞学会総会（春期大会）要旨集 260, 2013.
9. 富安 聡，宮本朋幸，森 康浩，矢口貴博，薬師寺宏匡，大野節代，三宅康之，坂口卓也，大野英治．Violet レーザーにより分取した side population 細胞の特性解析．第 8 回 日本臨床検査学教育学会学術大会要旨集 152, 2013.
10. 富安 聡，宮本朋幸，森 康浩，矢口貴博，薬師寺宏匡，大野節代，三宅康之，坂口卓也，大野英治．Characteristic of side population cells sorted by using violet laser. 第 72 回 日本癌学会学術総会要旨集 2013.

11. Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 781-786, 2004.
12. Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard GF, Mori M. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cell* 24: 506-513, 2006.
13. Mathew G, Timm EA Jr, Sotomayor P, Godoy A, Montecinos VP, Smith GJ, Huss WJ. ABCG2-mediated DyeCycle Violet efflux defined side population in benign and malignant prostate. *Cell Cycle* 8: 1053-1061, 2009.
14. Simpson C, Pearce DJ, Bonnet D, Davies D. Out of the blue: a comparison of Hoechst side population (SP) analysis of murine bone marrow using 325, 363 and 407 nm excitation sources. *J Immunol Methods* 310: 171-181, 2006.
15. Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner MK, Andreeff M, Goodell MA. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood* 98: 1166-1173, 2001.

16. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2<sup>+</sup> and ABCG2<sup>-</sup> cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res* 65: 6207-6219, 2005.
17. Engelmann K, Shen H, Finn OJ. MCF7 side population cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the tumor antigen MUC1. *Cancer Res* 68: 2419-2426, 2008.
18. Shi Y, Fu X, Hua Y, Han Y, Lu Y, Wang J. The side population in human lung cancer cell line NCI-H460 is enriched in stem-like cancer cells. *PLoS One* 7: e33358, 2012.
19. Chen Y, Zhao J, Luo Y, Wang Y, Wei N, Jiang Y. Isolation and identification of cancer stem-like cells from side population of human prostate cancer cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 32: 697-703, 2012.
20. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3: 730-737, 1997.

21. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445: 106-110, 2007.
22. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432: 396-401, 2004.
23. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 10158-10163, 2007.



## 第 3 章

### 細胞造腫瘍能解析系の確立

#### 3-1 研究の背景および目的

現在、癌幹細胞は 1997 年に同定された急性骨髄性白血病幹細胞をはじめ、乳癌、脳腫瘍、大腸癌など様々な固形癌においても同定されている<sup>1-6)</sup>。癌幹細胞を同定するためには、自己複製能、分化能、造腫瘍能の解析が必須である。造腫瘍能を評価するためには、分取した癌幹細胞の候補となる細胞集団を免疫不全マウスに移植し解析する必要がある。

第 2 章において、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いた SP 細胞の分取法を確立した<sup>7)</sup>。しかし、分取した SP 細胞中に癌幹細胞が存在することを証明するためには、自己複製能、分化能、そして特に造腫瘍能を解析する必要がある<sup>8,9)</sup>。そこで、本研究では細胞造腫瘍能解析系を確立することを目的に、紫色レーザー搭載型 FACS Aria により解析・分取する前のヒト子宮体部類内膜腺癌細胞株を免疫不全マウスに移植し造腫瘍能を解析した。また、SP 細胞分取に掛かる時間と温度による細胞への影響についても合わせて検討したので報告する。

## 3-2 研究の方法

細胞株、細胞培養は第 2 章に準ずる。

### 細胞造腫瘍能解析

4 週齢の BALB/c (nu/nu) メスヌードマウス (charles river, Japan) を購入し飼育した。*In vitro* において高い増殖能を示す Ishikawa (Grade 1)、HEC-1 (Grade 2)、HEC-50B (Grade 3) の培養皿より剥離した直後の細胞をヌードマウスに移植し、造腫瘍能を解析することで実験系の確立を目指した。また、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて SP 細胞および MP 細胞を分取し動物に移植するためには、氷冷中における操作が 9 時間程必要である。そこで、この保存操作による造腫瘍能への影響を検討するため、培養皿より剥離した直後の細胞の造腫瘍能と剥離後 4°C で 9 時間保存した細胞の造腫瘍能を比較した。造腫瘍能解析は、倉敷芸術科学大学動物実験委員会の承認の下 (承認番号; 21-46)、National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996) に基づいて行った。各条件 {(剥離直後; 対照群)、(剥離後 4°C・9 時間保存群)} の細胞  $1 \times 10^6$  個を 100  $\mu$ L のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に浮遊させ、深麻酔後に皮下移植した。移植後は 35 日間毎日観察を行い、腫瘍形成確認後から腫瘍径を計測した。

### 3-3 研究結果

#### 細胞造腫瘍能解析

紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて分取した SP 細胞中に癌幹細胞が存在することを証明するために必要である細胞造腫瘍能解析系の確立を目指した。また、SP 細胞分取に掛かる時間と温度による細胞への影響についても合わせて検討した。

その結果、Ishikawa (Grade 1) の対照群および 4°C・9 時間保存群は共に、動物移植 35 日後までには腫瘍の形成は確認されなかった (Table 1)。

HEC-1 (Grade 2) の対照群では移植 7 日後に、4°C・9 時間保存群では移植 11 日後に腫瘍の形成が確認された (Table 1)。また対照群の腫瘍は移植 7 日後に 1 mm、14 日後に 4 mm、21 日後に 5 mm、28 日後に 6 mm、35 日後に 8 mm と大きくなった。4°C・9 時間保存群の腫瘍は、移植 11 日後に 0.3 mm、14 日後に 0.6 mm、21 日後に 1 mm、28 日後に 2 mm、35 日後に 3 mm と大きくなった (Fig. 1)。

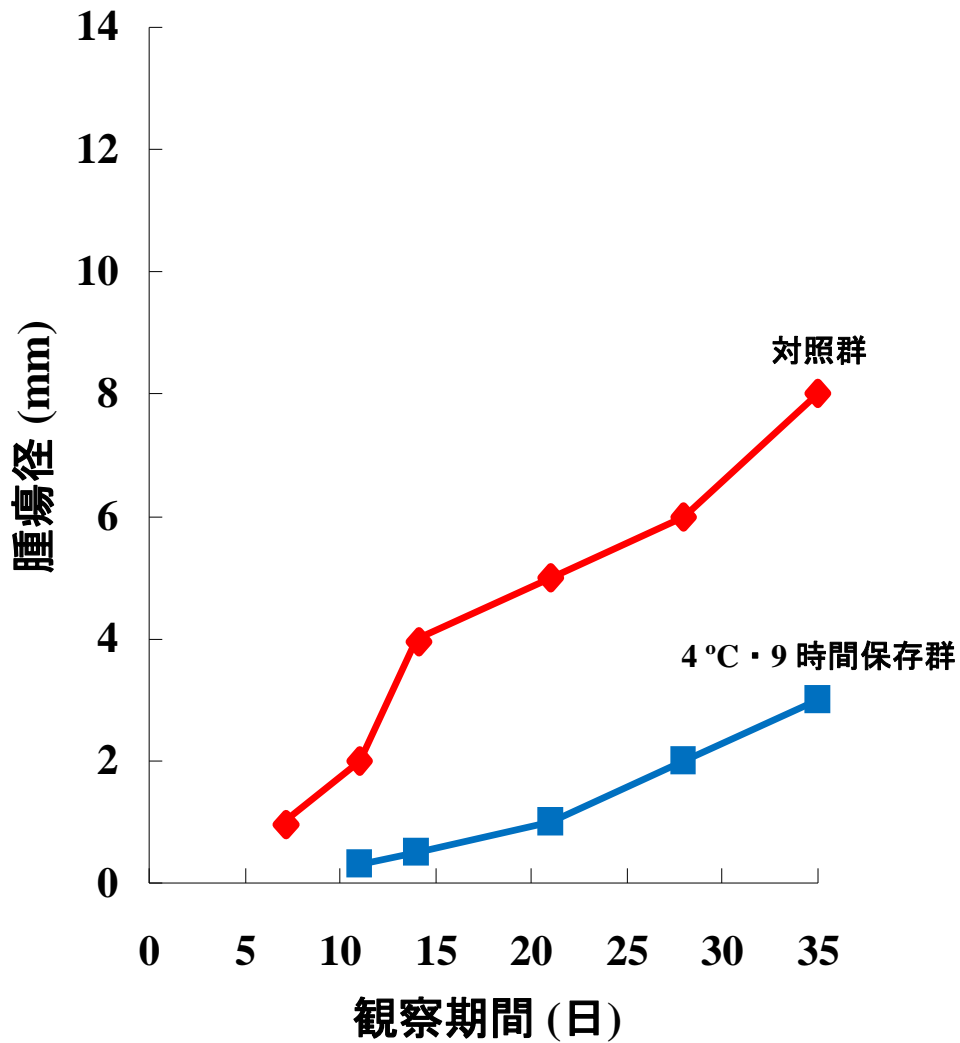
HEC-50B (Grade 3) の対照群では移植 5 日後に、4°C・9 時間保存群では移植 7 日後に腫瘍の形成が確認された (Table 1)。また、対照群の腫瘍は移植 5 日後に 2 mm、7 日後に 3 mm、14 日後に 6 mm、21 日後に 9 mm、28 日後に 11 mm、35 日後に 13 mm と大きくなった。4°C・9 時間保存群の腫瘍は、移植 7 日後に 1 mm、14 日後に 3 mm、21 日後に 5 mm、28 日後に 6 mm、35 日後に 8 mm と大きくなった (Fig. 2)。さらに HEC-50B

の腫瘍形成は、対照群および 4°C・9 時間保存群共に、HEC-1 と比較し早期に確認された。

Table 1. *In vivo* における腫瘍形成の有無

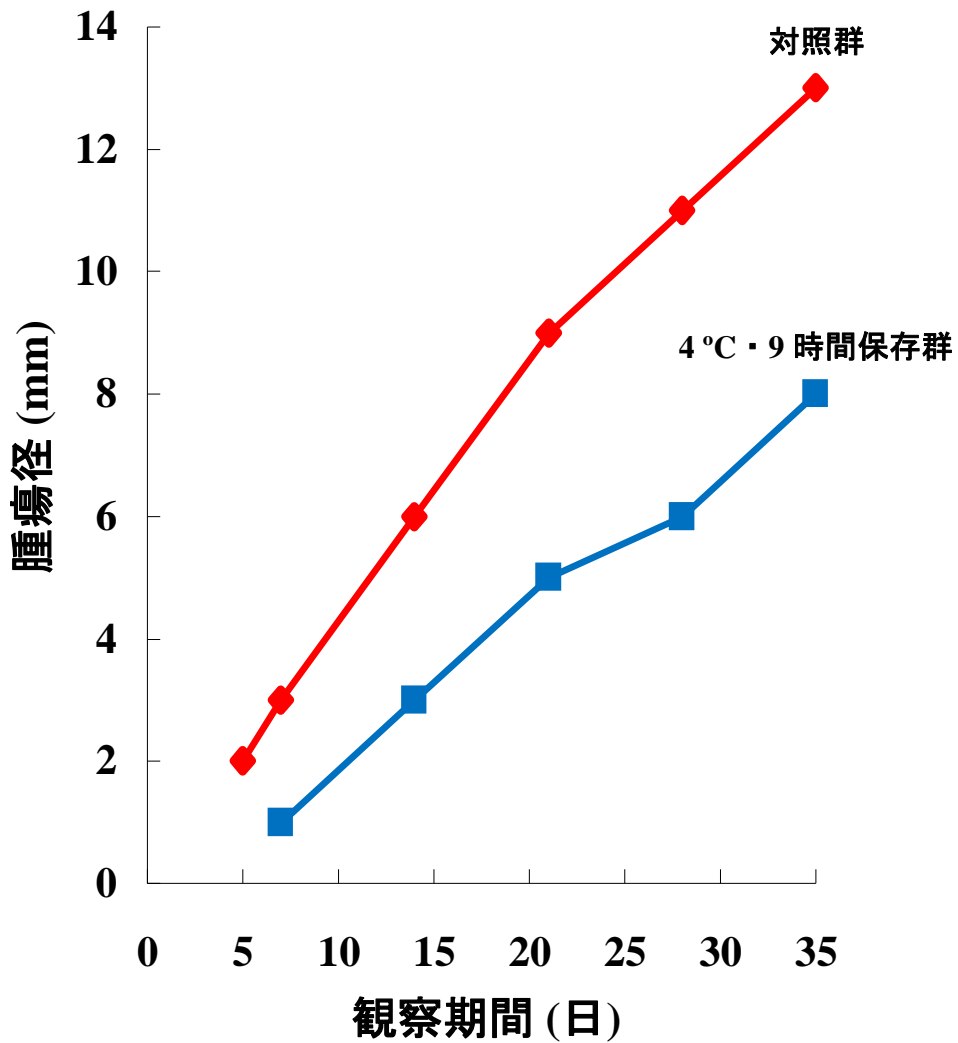
細胞株	対照群	4°C・9時間保存群
Ishikawa	-	-
HEC-1	+	+
HEC-50B	+	+

観察期間：35日間



**Fig. 1 HEC-1 (Grade 2) による腫瘍形成**

HEC-1 の各条件 {(剥離直後; 対照群)、(剥離後 4°C・9 時間保存群)} の細胞  $1 \times 10^6$  個を皮下移植した。移植後は 35 日間毎日観察を行い、腫瘍形成確認後から腫瘍径を計測した。対照群では移植 7 日後に、4°C・9 時間保存群では移植 11 日後に腫瘍形成が確認された。また、時間経過と共に腫瘍は大きくなった。



**Fig. 2 HEC-50B (Grade 3) による腫瘍形成**

HEC-50B の各条件 {(剥離直後; 対照群)、(剥離後 4°C・9 時間保存群)} の細胞  $1 \times 10^6$  個を皮下移植した。移植後は 35 日間毎日観察を行い、腫瘍形成確認後から腫瘍径を計測した。対照群では移植 5 日後に、4°C・9 時間保存群では移植 7 日後に腫瘍形成が確認された。また、時間経過と共に腫瘍は大きくなった。

### 3-4 考察

第 2 章において紫色レーザー搭載型 FACS Aria により SP 細胞を分取することが可能であることを実証してきた<sup>7)</sup>。しかし、腫瘍組織から分取した SP 細胞中に癌幹細胞が必ずしも存在しているというわけではない<sup>10,11)</sup>。

SP 細胞中に癌幹細胞が存在することを証明するためには、癌幹細胞の定義である自己複製能、分化能、造腫瘍能の解析が必須である。しかし、造腫瘍能を解析するためには、癌幹細胞の候補となる細胞集団を分取し、免疫不全マウスモデルを用いて造腫瘍能を解析しなければならない。分取した細胞集団が高い造腫瘍能を有しているのであれば、極少数の細胞でも腫瘍を形成することができると考えられる。この様な実験系を用いて 1997 年に前述の急性骨髄性白血病において最初に癌幹細胞の存在が証明された<sup>1)</sup>。その後、同様の実験系を用いて乳癌、脳腫瘍、大腸癌などの固形癌においても癌幹細胞の存在が証明されている<sup>2-6)</sup>。そこで、紫色レーザー搭載型 FACS Aria により分取した SP 細胞中に癌幹細胞が存在していることを証明するにあたり、まず、細胞造腫瘍能解析系の確立を目指した。紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて SP 細胞を分取し、動物に移植するためには、氷冷中における操作が 9 時間程必要である。今回の解析において、細胞を 4°C で 9 時間保存することで造腫瘍能に影響を及ぼすことが示唆されたが、腫瘍形成は確認されたため現行の保存方法で SP 細胞の造腫瘍能解析は可能であると考えられた。また、今回用いた癌細胞株の中では、Ishikawa の造腫瘍能は低く、HEC-50B が最



も高い造腫瘍能を有することが示された。Ishikawa に関しては、 $1 \times 10^7$  個を移植した場合、移植 21 日後に腫瘍の形成が確認されたが、63 日経過しても 1 cm 程度までにしか成長しなかったという報告がある<sup>12)</sup>。HEC-1 に関しては、 $5 \times 10^6$  個を移植した場合、移植 3 日後に腫瘍の形成が確認され、21 日後には 6 mm 程度に成長したという報告がある<sup>13)</sup>。HEC-50B に関しては、造腫瘍能を有することは報告されているが、詳細な報告はない<sup>12)</sup>。これらの報告より、今回の解析において Ishikawa による腫瘍の形成が確認されなかったのは、Ishikawa の造腫瘍能が低く、移植 35 日後までと観察期間が短かったためと考えられる。さらに、Ishikawa の造腫瘍能が低いのは、*in vivo* における Ishikawa の doubling time が 64 時間と HEC-1 の 31 時間や HEC-50B の 30 時間と比べて極めて遅いことが原因であると考えられる<sup>12)</sup>。また、HEC-1 において対照群が移植 7 日後に腫瘍を形成し、3 週間後には 5 mm 程度の大きさとなり、移植した細胞数は異なるが、報告と同様の経過を辿ったことから、今回行った実験の妥当性が示された。さらに、ヒト子宮体部類内膜腺癌細胞株を用いた造腫瘍能解析では、Grade の低い Ishikawa を用いるよりも Grade の高い HEC-50B を用いることで早期に結果を得ることができると考えられる。以上のことから、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて分取した SP 細胞および MP 細胞の造腫瘍能をこの実験系を用いて解析することが可能であると考えられた。

紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて分取した SP 細胞の自己複製

能、分化能、造腫瘍能解析については第 4 章において述べた。

### 3-5 引用文献

1. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3: 730-737, 1997.
2. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3983-3988, 2003.
3. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63: 5821-5828, 2003.
4. Harris MA, Yang H, Low BE, Mukherjee J, Guha A, Bronson RT, Shultz LD, Israel MA, Yun K. Cancer stem cells are enriched in the side population cells in a mouse model of glioma. *Cancer Res* 68: 10051-10059, 2008.
5. Carpentino JE, Hynes MJ, Appelman HD, Zheng T, Steindler DA, Scott EW, Huang EH. Aldehyde dehydrogenase-expressing colon stem cells contribute to tumorigenesis in the transition from colitis to cancer. *Cancer Res* 69: 8208-8215, 2009.
6. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem

- cells. *Cancer Res* 67: 1030-1037, 2007.
7. Tomiyasu S, Miyamoto T, Mori M, Yaguchi T, Yakushiji H, Ohno S, Miyake Y, Sakaguchi T, Ueda M, Ohno E. Isolation of side population cells from endometrial cancer cells using a violet laser diode. *Human Cell* 27: 36-42, 2014.
  8. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66: 9339-9344, 2006.
  9. Ailles LE, Weissman IL. Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol* 18: 460-466, 2007.
  10. Broadley KW, Hunn MK, Farrand KJ, Price KM, Grasso C, Miller RJ, Hermans IF, McConnell MJ. Side population is not necessary or sufficient for a cancer stem cell phenotype in glioblastoma multiforme. *Stem Cells* 29: 452-461, 2011.
  11. Golebiewska A, Bougnaud S, Stieber D, Brons NH, Vallar L, Hertel F, Klink B, Schröck E, Bjerkvig R, Niclou SP. Side population in human glioblastoma is non-tumorigenic and characterizes brain endothelial cells. *Brain* 136: 1462-1475, 2013.
  12. Kuramoto H, Nishida M. *Cell and Molecular Biology of Endometrial*

Carcinoma. Springer-Verlag: Tokyo; 2003.

13. Li Z, Zhao X, Bai S, Wang Z, Chen L, Wei Y, Huang C. Proteomics identification of cyclophilin a as a potential prognostic factor and therapeutic target in endometrial carcinoma. *Mol Cell Proteomics* 7: 1810-1823, 2008.

## 第 4 章

### 紫色レーザー搭載型セルソーターにより分取した SP 細胞中に存在する子宮体癌幹細胞の証明

#### 4-1 研究の背景および目的

SP 細胞の存在は、1996 年に細胞表面抗原を用いないマウス造血幹細胞の分取法として、Goodell らにより報告されている<sup>1)</sup>。SP 細胞の癌幹細胞研究への応用は、2004 年に Kondo らにより報告され、ラット C6 グリオーマ細胞株から分離した SP 細胞が、培養条件下において神経細胞やグリア細胞へ分化する神経幹細胞様の性質を示すこと、また、免疫不全マウスの腹腔内への移植実験より、MP 細胞と比較し造腫瘍能が明らかに高いことが報告されている<sup>2)</sup>。SP 細胞分取法を用いた幹細胞の検索は、選択的に標識する分子マーカーを持たない組織幹細胞に用いられてきたが、この報告により癌幹細胞の検索においても SP 細胞分取法の応用が急速に広がった。これら SP 細胞分取法を用いることで、正常な体性幹細胞と同様に癌幹細胞も分取することが可能であることが、現在、脳腫瘍など様々な癌細胞において報告されている。近年、癌幹細胞研究における論文の報告は相次いでおり、SP 細胞分取法を用いた癌細胞株の研究や prominin 1 (PROM1/CD133) などの幹細胞分子マーカーを応用した研究からも自己複製能、分化能および高い造腫瘍能を有する癌幹細胞の存在が報告されている<sup>3,4)</sup>。また、報告されている癌幹細胞は、数千

個またはそれ以下の細胞移植で腫瘍形成が認められている<sup>3,4)</sup>。さらに、これら同定された癌幹細胞については、発現分子やシグナル伝達経路がより詳細に明らかにされつつあり、新規治療法の開発が進められている<sup>5)</sup>。このように SP 細胞や CD133 を用いた癌幹細胞分取は、癌幹細胞を同定し、その特性を明らかにするために、極めて重要な役割を果たしている。

第 2 章において、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いた新規解析法により紫外線レーザー同様に SP 細胞を分取する方法を確立した<sup>6)</sup>。しかし、分取した SP 細胞中に癌幹細胞が存在しているか否かは明らかにしていない。紫色レーザー搭載型 FACS Aria が癌幹細胞研究に有用な分取機器であることを示すためには、SP 細胞中に癌幹細胞が存在していることを証明する必要がある。癌幹細胞とは、①癌全体の数 % のみに存在する造腫瘍能を有する細胞集団である、②造腫瘍能が低いあるいは欠く細胞集団を産生する能力がある、③自己複製能がある。以上 3 項目を満たすものであると考えられている<sup>7,8)</sup>。そこで、本研究では紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いてヒト子宮体部類内膜腺癌細胞株より分取した SP 細胞中に癌幹細胞が存在することを証明するために、分取した SP 細胞および MP 細胞において癌幹細胞の定義である自己複製能、分化能および造腫瘍能について比較検討した。また、*in vivo* において高い造腫瘍能を示す癌幹細胞の *in vitro* における動態を明らかにするため、分取した SP 細胞および MP 細胞の増殖能を比較したので報告する。

## 4-2 研究の方法

### 細胞株

第 3 章において *in vivo* で高い造腫瘍能を示したヒト子宮体部類内膜腺癌細胞株 HEC-50B (Grade 3; 低分化型、Japan Health Sciences Foundation, Japan, JCRB1145) を用いた。

細胞培養は第 2 章に準ずる。

フローサイトメリー解析および SP 細胞・MP 細胞の分取は、第 2 章のフローサイトメリー解析による SP 細胞および MP 細胞の検出に準ずる。

### 自己複製能および分化能解析

HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞をそれぞれ 10% FBS 加 EMEM にて培養した。3 週間後、再度フローサイトメリー解析を行い、自己複製能および分化能を解析した。

### 細胞造腫瘍能解析

細胞造腫瘍能解析は、倉敷芸術科学大学動物実験委員会の承認の下 (承認番号; 21-46)、National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996) に基づいて行った。造腫瘍能を解析するため、



Grade 3 の HEC-50B を対象に分取した SP 細胞および MP 細胞を種々の濃度 ( $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ ) に調整し、100  $\mu$ L の Matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) に浮遊させた後、6 週齢のメス nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) マウス (charles river, Japan) の脇腹に注入した。移植後は、毎日マウスの観察を行い、腫瘍形成までに要した期間を検討した。また、腫瘍形成率を次の式により算出した。腫瘍形成率 (%) = 腫瘍形成数 / 腫瘍移植カ所数  $\times 100$ 。さらに、腫瘍を摘出後、腫瘍径 (短径 mm  $\times$  長径 mm) を測定し、形成された腫瘍の組織型を診るためにホルマリン固定した後に、パラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を施した。

### 増殖能解析

マルチウェルセルカルチャープレート 96 ウェル (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて行った。培養液は 100  $\mu$ L/well で準備し、分取した SP 細胞および MP 細胞を播種した。播種した時点から 24、48、72 時間後に Cell Counting Kit-8 (Dojindo laboratories, Japan) を 10  $\mu$ L/well 投与し、5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下にて 4 時間反応させた。その後、Microplate Reader (model 680, BIO-RAD Laboratories, Japan) を用いて吸光度 (450 nm, reference 655 nm) を測定した。

## 統計学的解析

得られた結果の解析には Mann-Whitney  $U$ -test を用い、 $p$  値が 0.05 未満の群間に有意差があるものとした。

### 4-3 研究結果

#### 自己複製能および分化能解析

HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞を 3 週間培養し、再度フローサイトメトリーにより解析した。HEC-50B の SP 細胞は、0.5% の SP 分画を維持すると共に、MP 細胞へ分化していた。しかし、3 週間培養した MP 細胞からは SP 分画は認められなかった (Fig. 1)。

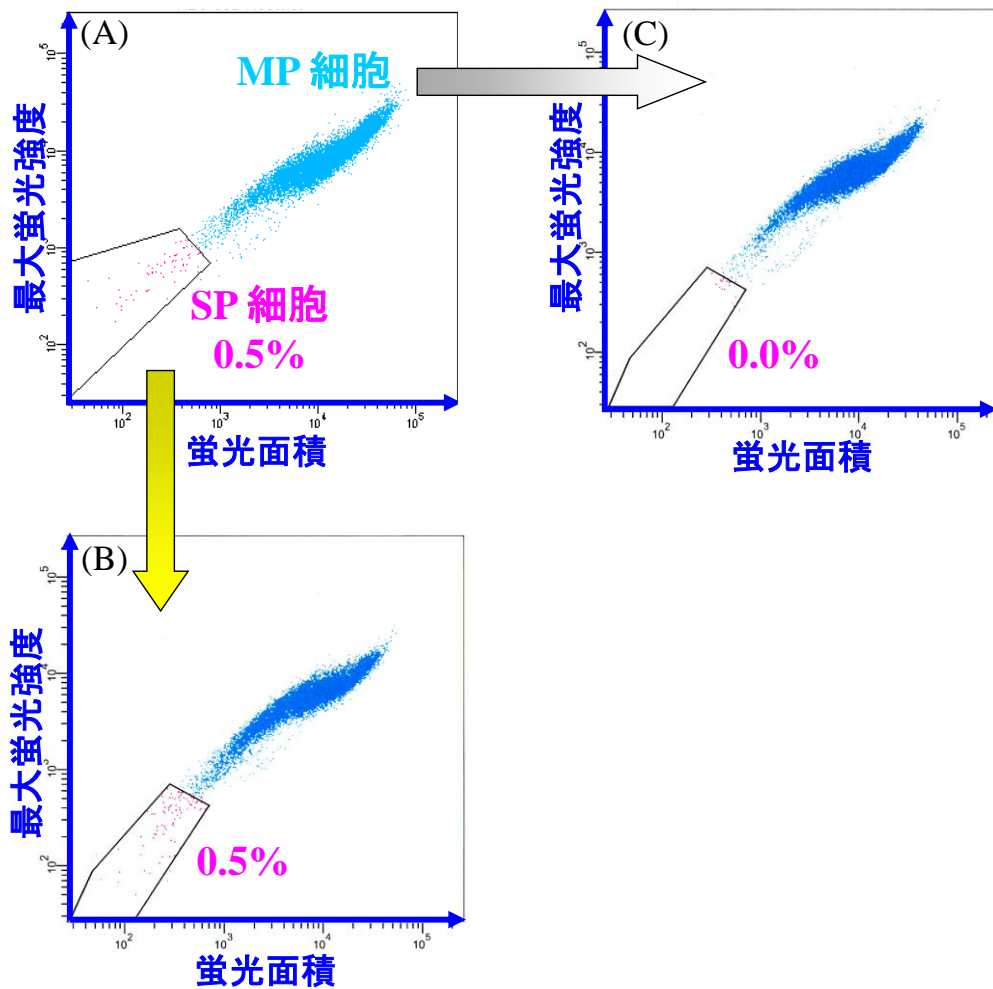
#### 細胞造腫瘍能解析

HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞の造腫瘍能を解析したところ、SP 細胞では  $1 \times 10^5$  個で 100%、 $1 \times 10^4$  個で 100%、 $1 \times 10^3$  個で 100%、 $1 \times 10^2$  個で 50% の腫瘍形成率を示した (Table 1)。MP 細胞では  $1 \times 10^5$  個で 100%、 $1 \times 10^4$  個で 75%、 $1 \times 10^3$  個で 25%、 $1 \times 10^2$  個で 0% の腫瘍形成率を示した (Table 1)。また、SP 細胞では MP 細胞と比較して早く腫瘍形成が認められた (Fig. 2-5)。腫瘍径については table 2 に示す。さらに、SP 細胞および MP 細胞を移植して形成された腫瘍の組織型は全て Grade 3 の低分化型類内膜腺癌であった (Fig. 6-12)。

#### 増殖能解析

HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞をそれぞれ播種し、24、48、72 時間後に細胞数を測定したところ、播種後 72 時間において SP 細

胞は MP 細胞と比較して有意な細胞数の増加を示した (Fig. 13)。

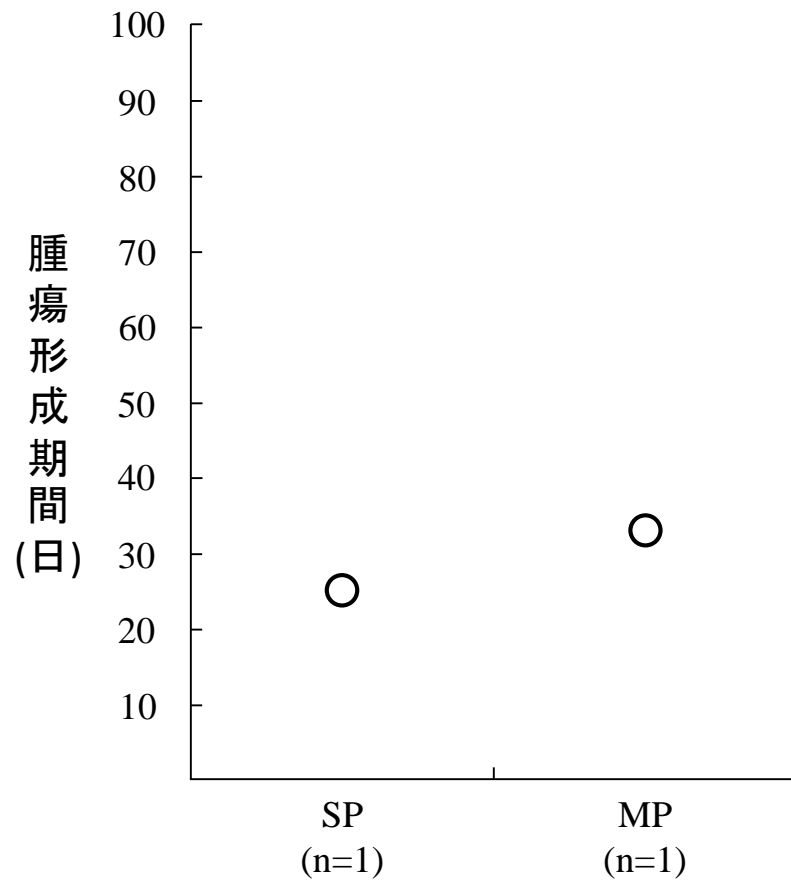


**Fig. 1 HEC-50B における SP 細胞および MP 細胞の自己複製能および分化能解析**

(A) に示す HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞を 3 週間培養し、再度フローサイトメトリー解析を行い、自己複製能および分化能を解析した。(B) SP 細胞からは SP 細胞の維持と共に、MP 細胞への分化が認められた。(C) MP 細胞から SP 細胞の出現は認められなかった。

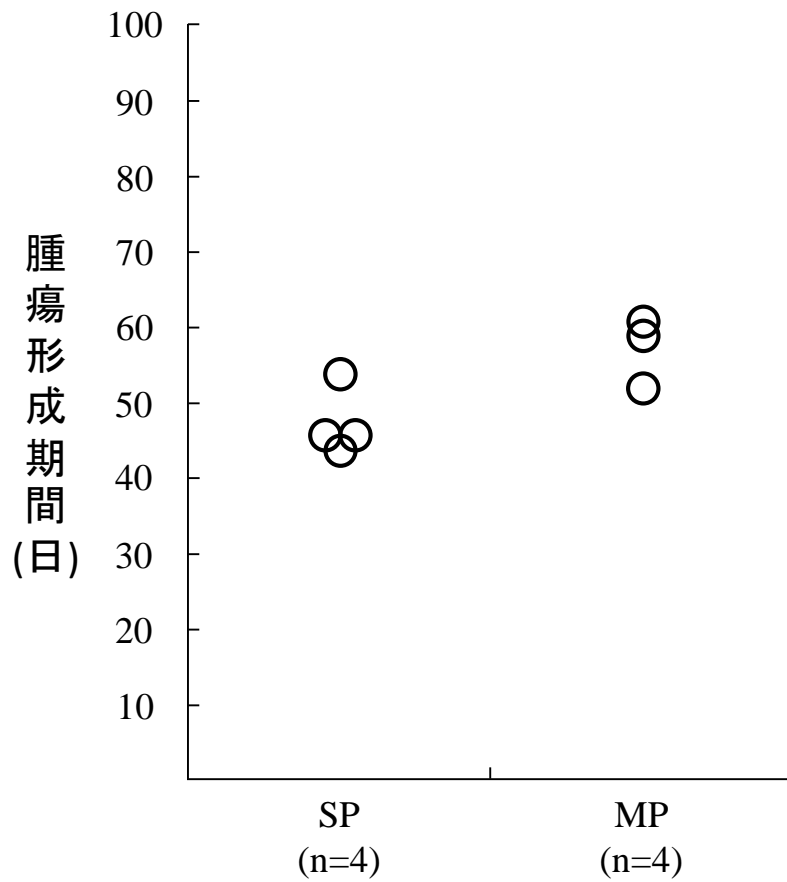
Table 1. HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞の造腫瘍能解析

移植細胞数	SP 細胞		MP 細胞	
	腫瘍形成数 / 移植箇所	腫瘍形成率	腫瘍形成数 / 移植箇所	腫瘍形成率
$1 \times 10^5$	1 / 1	100%	1 / 1	100%
$1 \times 10^4$	4 / 4	100%	3 / 4	75%
$1 \times 10^3$	4 / 4	100%	1 / 4	25%
$1 \times 10^2$	2 / 4	50%	0 / 4	0%



**Fig. 2 HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞の腫瘍形成期間**

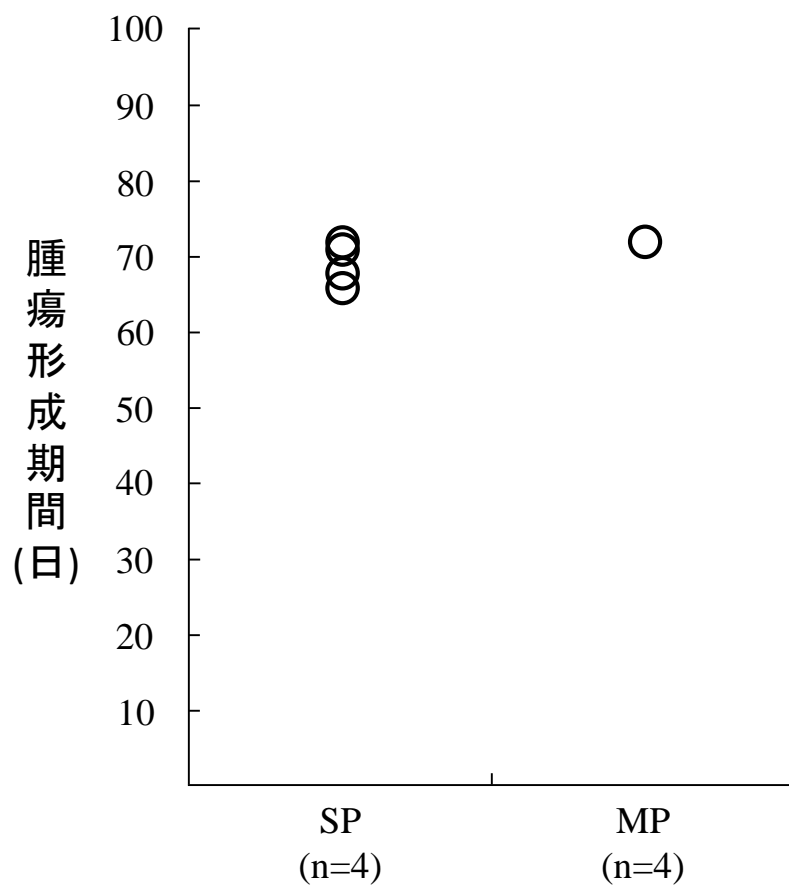
HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞をそれぞれ  $1 \times 10^5$  個ずつ移植したところ、SP 細胞は MP 細胞と比較して早く腫瘍形成が認められた (一つの○は一ヶ所の腫瘍形成を示す)。



**Fig. 3 HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞の腫瘍形成期間**

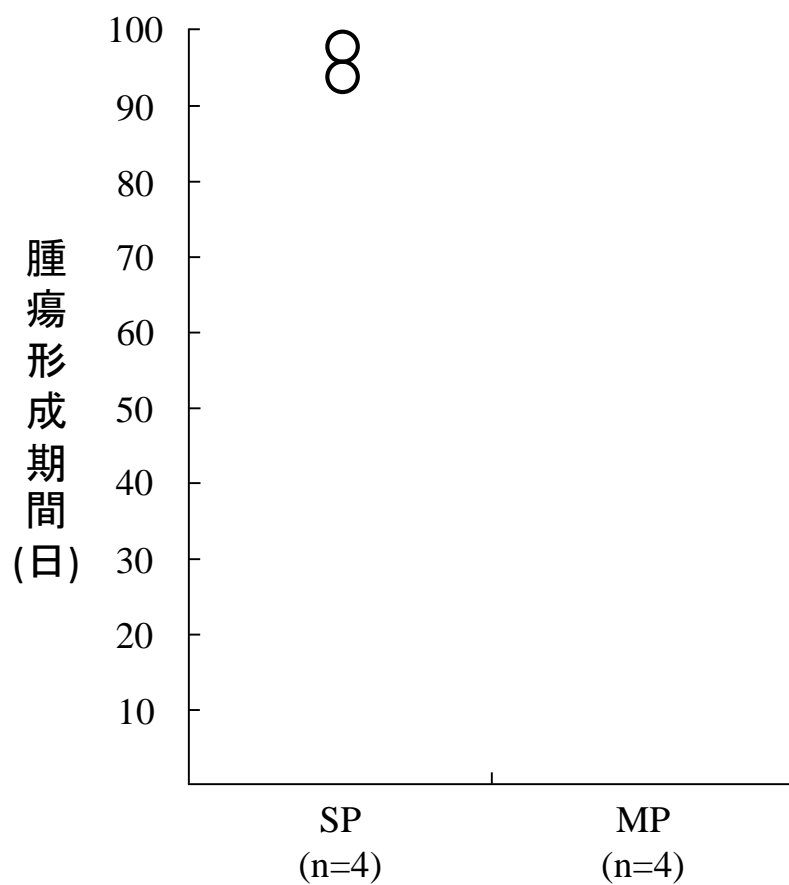
HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞をそれぞれ  $1 \times 10^4$  個ずつ移植したところ、SP 細胞は MP 細胞と比較して早く腫瘍形成が認められた (一つの○は一ヶ所の腫瘍形成を示す)。





**Fig. 4 HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞の腫瘍形成期間**

HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞をそれぞれ  $1 \times 10^3$  個ずつ移植したところ、SP 細胞は MP 細胞と比較して早く腫瘍形成が認められた (一つの○は一ヶ所の腫瘍形成を示す)。



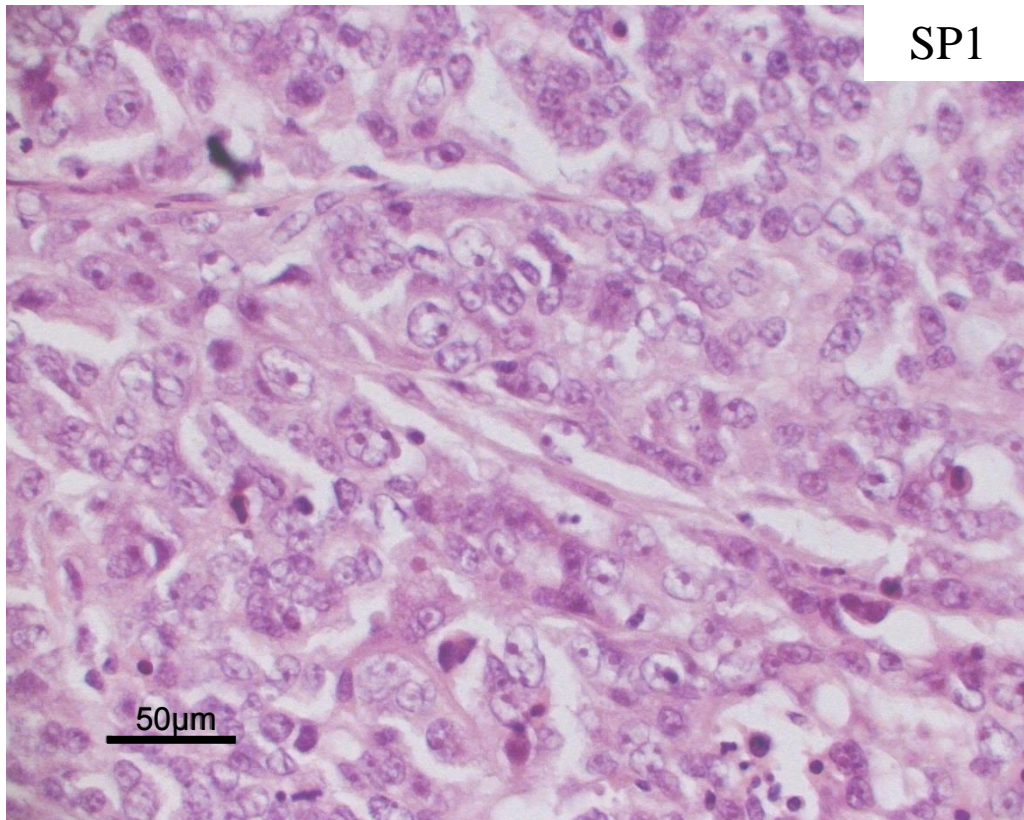
**Fig. 5 HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞の腫瘍形成期間**

HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞をそれぞれ  $1 \times 10^2$  個ずつ移植したところ、SP 細胞のみに腫瘍形成が認められた (一つの○は一ヶ所の腫瘍形成を示す)。

**Table 2. HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞が形成した腫瘍の大きさ**

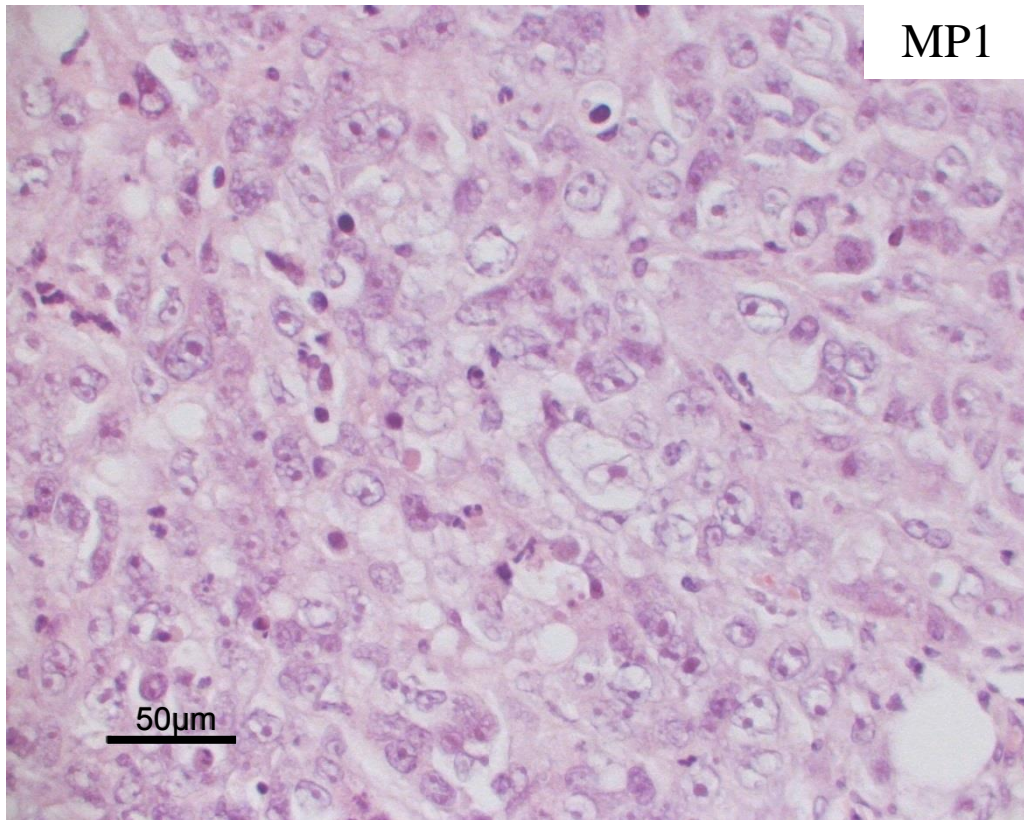
移植細胞数	腫瘍径 (短径 mm × 長径 mm)							
	SP1	SP2	SP3	SP4	MP1	MP2	MP3	MP4
$1 \times 10^5$	15 × 22	-	-	-	12 × 12	-	-	-
$1 \times 10^4$	8 × 13	10 × 13	12 × 19	13 × 18	7 × 11	6 × 7	7 × 8	×
$1 \times 10^3$	6 × 13	6 × 10	7 × 9	6 × 6	3 × 4	×	×	×
$1 \times 10^2$	8 × 9	19 × 20	×	×	×	×	×	×

(-): 移植なし (×): 腫瘍形成なし



**Fig. 6 HEC-50B より分取した  $1 \times 10^5$  個の SP 細胞が形成した腫瘍の組織像 (HE 染色)**

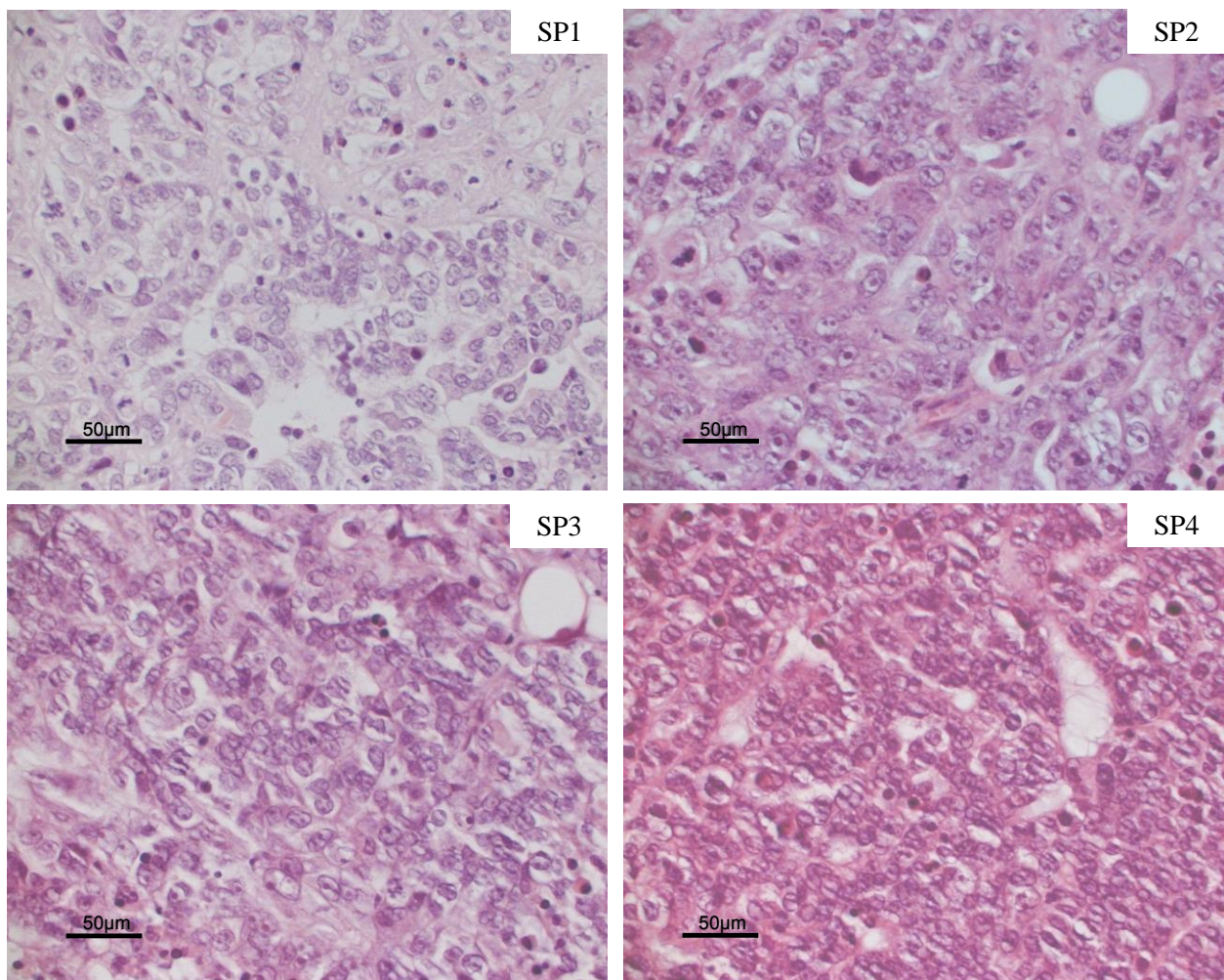
形成した腫瘍の組織型は、充実性増殖の占める割合が腺癌成分の 50% 以上を占めており、細胞異型の高度な Grade 3 の低分化型類内膜腺癌であった。(対物 20 倍)



**Fig. 7 HEC-50B より分取した  $1 \times 10^5$  個の MP 細胞が形成した腫瘍の組織像 (HE 染色)**

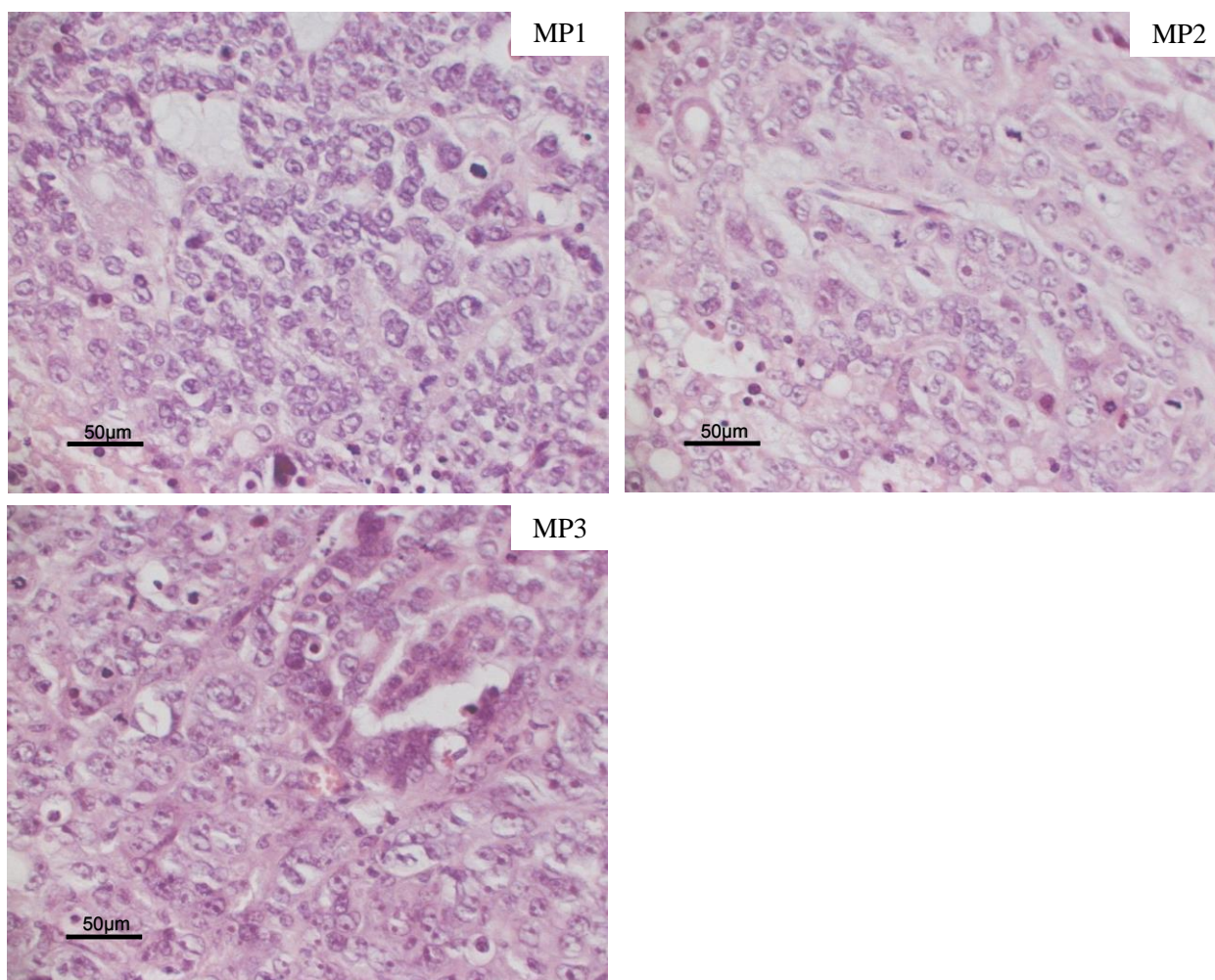
形成した腫瘍の組織型は、充実性増殖の占める割合が腺癌成分の 50% 以上を占めており、細胞異型の高度な Grade 3 の低分化型類内膜腺癌であった。(対物 20 倍)





**Fig. 8 HEC-50B より分取した  $1 \times 10^4$  個の SP 細胞が形成した腫瘍の組織像 (HE 染色)**

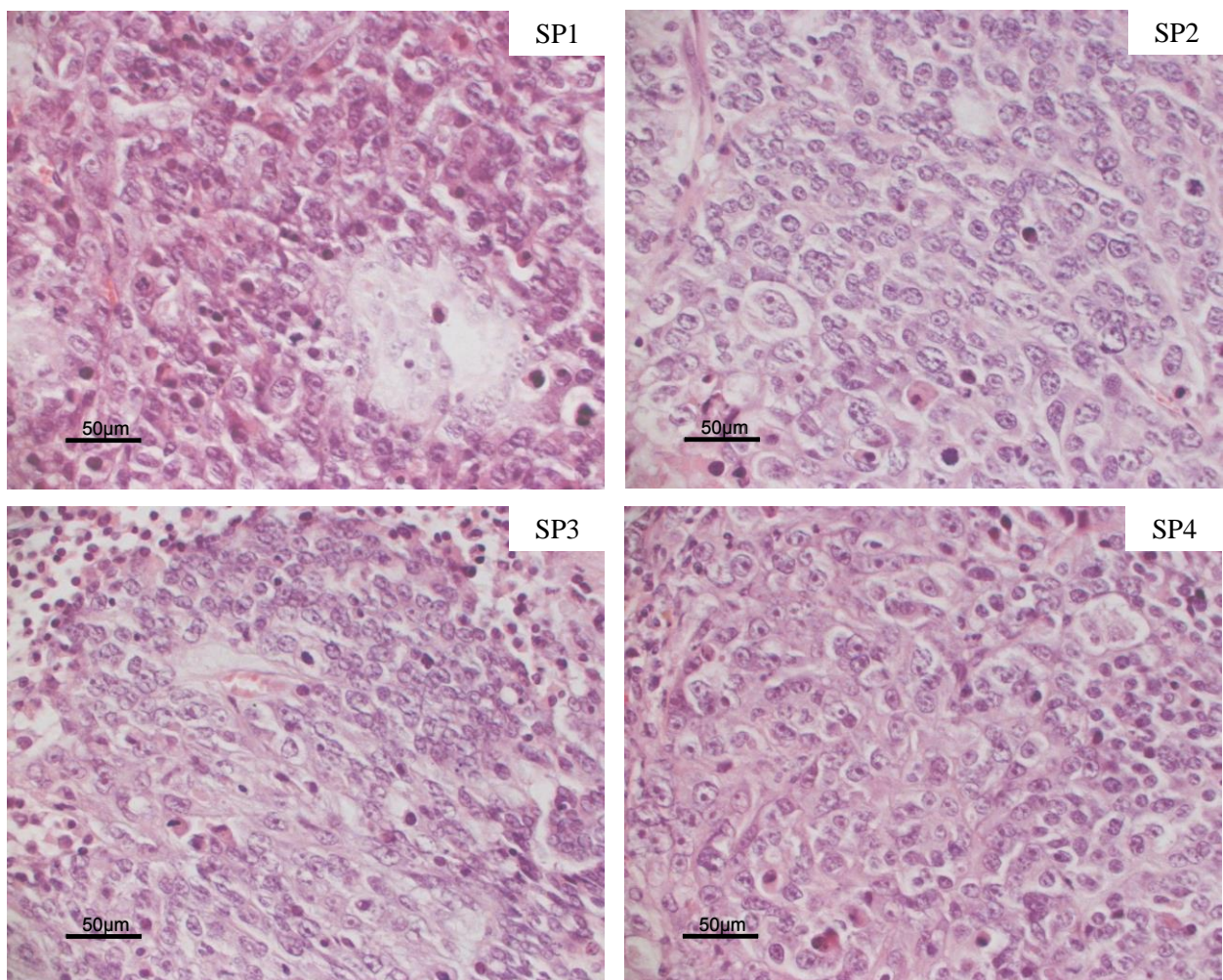
形成した腫瘍の組織型は、充実性増殖の占める割合が腺癌成分の 50% 以上を占めており、細胞異型の高度な Grade 3 の低分化型類内膜腺癌であった。(対物 20 倍)



**Fig. 9 HEC-50B より分取した  $1 \times 10^4$  個の MP 細胞が形成した腫瘍の組織像 (HE 染色)**

形成した腫瘍の組織型は、充実性増殖の占める割合が腺癌成分の 50% 以上を占めており、細胞異型の高度な Grade 3 の低分化型類内膜腺癌であった。(対物 20 倍)

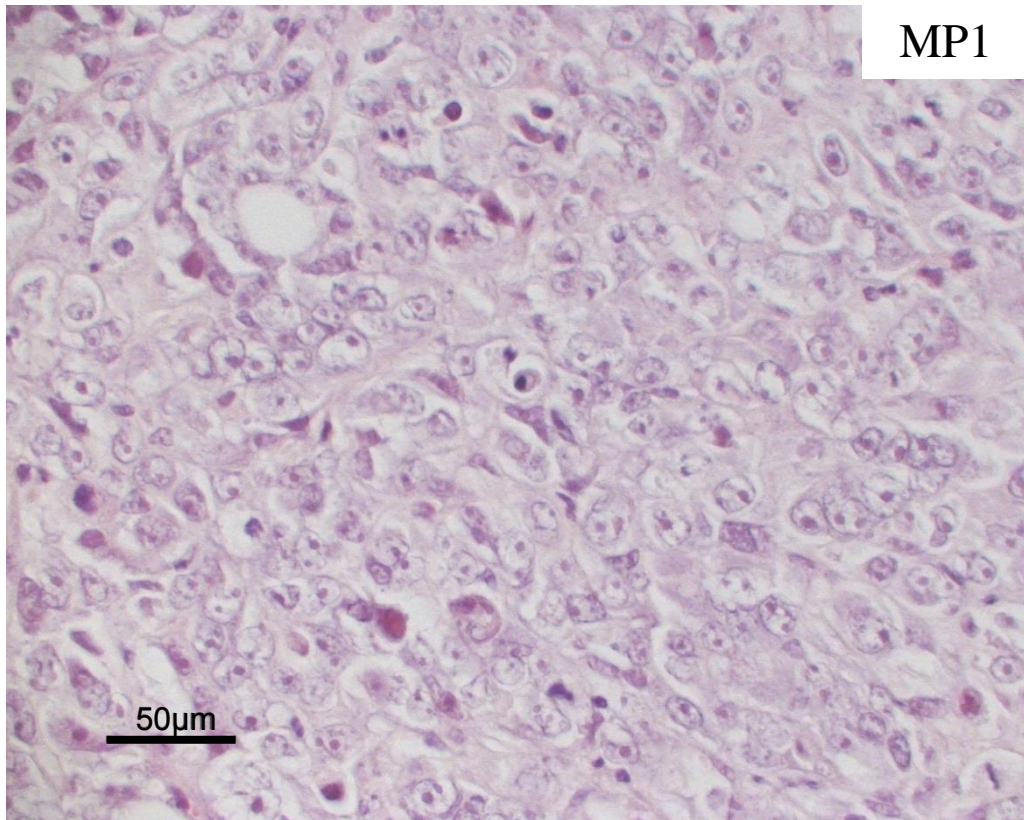




**Fig. 10 HEC-50B より分取した  $1 \times 10^3$  個の SP 細胞が形成した腫瘍の組織像 (HE 染色)**

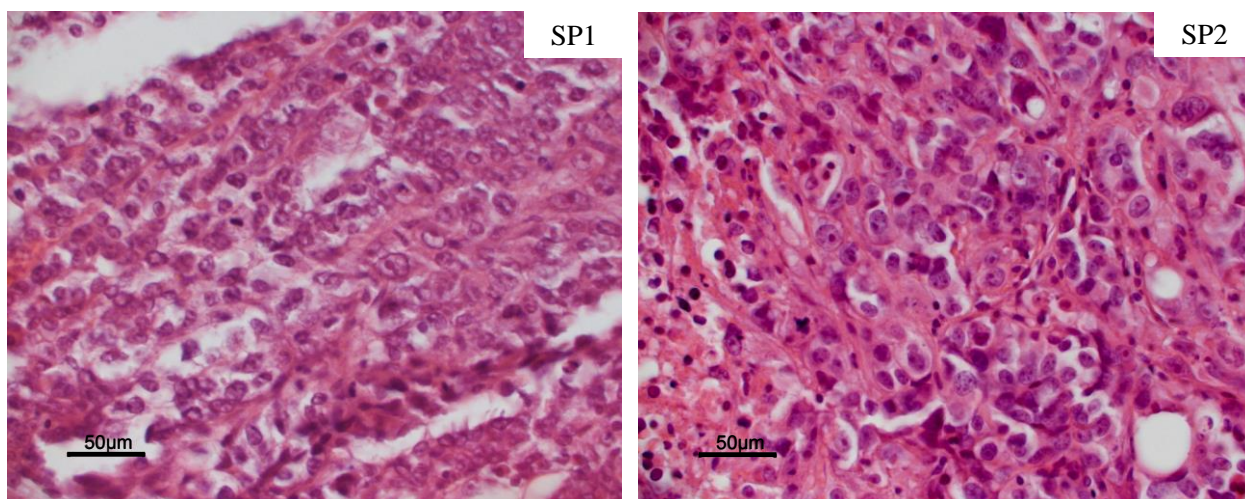
形成した腫瘍の組織型は、充実性増殖の占める割合が腺癌成分の 50% 以上を占めており、細胞異型の高度な Grade 3 の低分化型類内膜腺癌であった。(対物 20 倍)





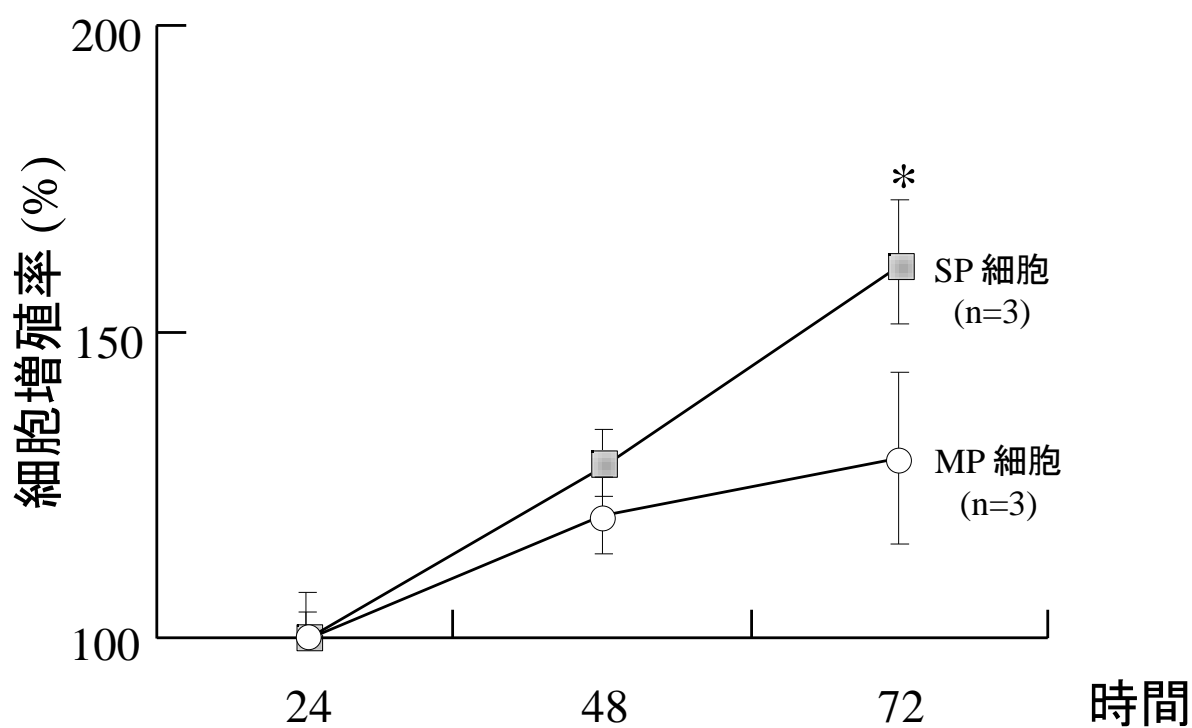
**Fig. 11 HEC-50B より分取した  $1 \times 10^3$  個の MP 細胞が形成した腫瘍の組織像 (HE 染色)**

形成した腫瘍の組織型は、充実性増殖の占める割合が腺癌成分の 50% 以上を占めており、細胞異型の高度な Grade 3 の低分化型類内膜腺癌であった。(対物 20 倍)



**Fig. 12 HEC-50B より分取した  $1 \times 10^2$  個の SP 細胞が形成した腫瘍の組織像 (HE 染色)**

形成した腫瘍の組織型は、充実性増殖の占める割合が腺癌成分の 50% 以上を占めており、細胞異型の高度な Grade 3 の低分化型類内膜腺癌であった。(対物 20 倍)



**Fig. 13 HEC-50B における SP 細胞および MP 細胞の増殖能解析**

分取した SP 細胞および MP 細胞を播種後 24、48、72 時間に Cell Counting Kit-8 投与し、増殖能を解析した。播種後 72 時間において、SP 細胞は MP 細胞と比較して有意に高い増殖能を示した。値は平均値 ± 標準偏差である。Mann-Whitney  $U$ -test ( $*p < 0.05$ )

#### 4-4 考察

癌幹細胞は、白血病、脳腫瘍、乳癌、肺癌、前立腺癌といった様々な悪性腫瘍の SP 細胞中に存在することが報告されている<sup>9-13)</sup>。第 2 章において、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて HEC-50B から SP 細胞を分取することが可能であることを実証した。癌幹細胞は正常幹細胞と同様に、自己複製能や分化能により癌組織の発生・維持に関与している<sup>6,9,14,15)</sup>。

本研究において、自己複製能および分化能解析として HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞を分取後、3 週間培養し、再度フローサイトメトリ解析を行ったところ、SP 細胞のみ自己複製能および分化能が認められた。本研究と一致する結果は、神経膠腫細胞株から分取された SP 細胞において確認されている<sup>2)</sup>。さらに、HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞を NOD/SCID マウスに移植し、SP 細胞が極少数の細胞でも腫瘍を形成することを確認した。加えて、SP 細胞において MP 細胞と比較して早く腫瘍形成を確認することができた。SP 細胞は、様々な癌細胞株から分離されており、免疫不全マウスに移植した場合、MP 細胞と比較して高い造腫瘍能を有していることが確認されている<sup>10-13,16)</sup>。従って、本研究で紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて HEC-50B から分取した SP 細胞の特性は、既知の癌幹細胞特性と一致するものである。また、肺癌や鼻咽頭癌の細胞株において SP 細胞は MP 細胞と比較して高い増殖能を示すことが報告されており、*in vivo* において高い造腫瘍能を示す癌幹細胞は、*in vitro* において高い増殖

能を示すと考えられている<sup>10,11)</sup>。本研究の結果においても、HEC-50B の SP 細胞は MP 細胞と比較して増殖能は高く、同様の結果を得ることができた。Grade 3 の HEC-50B は悪性度が高く、*in vivo* における doubling time は 30 時間と極めて早く高い造腫瘍能を示すことから、HEC-50B の癌幹細胞は *in vitro* においても高い増殖能を示したと考えられる<sup>17)</sup>。

以上のことから、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて HEC-50B より分取した SP 細胞は、癌幹細胞特性を有する細胞であることが明らかとなった。また、HEC-50B より分取した SP 細胞中には子宮体癌幹細胞が存在することが示唆された。さらに、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて子宮体癌より癌幹細胞を分取することが可能であると考えられる。従って、紫色レーザー搭載型 FACS Aria は、推定の癌幹細胞の小集団を分離するために有用な分取機器であり、癌幹細胞の同定や特徴づけに用いることができると考えられる。加えて、本研究で提示した紫色レーザー搭載型 FACS Aria による癌幹細胞分取法を検討評価することにより、癌幹細胞研究の更なる効率化が期待される。

本研究の一部は以下にて発表済みである。

- Tomiyasu S, Miyamoto T, Mori M, Yaguchi T, Yakushiji H, Ohno S, Miyake Y, Sakaguchi T, Ueda M, Ohno E. Isolation of side population cells from endometrial cancer cells using a violet laser diode. Human Cell 27: 36-42, 2014.
- 富安 聡, 宮本朋幸, 森 康浩, 矢口貴博, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. Characteristic of side population cells sorted by using violet laser. 第 72 回 日本癌学会学術総会 2013.

#### 4-5 引用文献

1. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183: 1797-1806, 1996.
2. Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 781-786, 2004.
3. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445: 106-110, 2007.
4. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445: 111-115, 2007.
5. Takeishi S, Matsumoto A, Onoyama I, Naka K, Hirao A, Nakayama KI. Ablation of Fbxw7 eliminates leukemia-initiating cells by preventing quiescence. *Cancer Cell* 23: 347-361, 2013.
6. Tomiyasu S, Miyamoto T, Mori M, Yaguchi T, Yakushiji H, Ohno S, Miyake Y, Sakaguchi T, Ueda M, Ohno E. Isolation of side population cells from endometrial cancer cells using a violet laser diode. *Human Cell* 27: 36-42, 2014.

7. 富安 聡, 宮本朋幸, 森 康浩, 矢口貴博, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. Characteristic of side population cells sorted by using violet laser. 第 72 回 日本癌学会学術総会要旨集 2013.
8. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111, 2001.
9. Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner MK, Andreeff M, Goodell MA. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood* 98: 1166-1173, 2001.
10. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2<sup>+</sup> and ABCG2<sup>-</sup> cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res* 65: 6207-6219, 2005.
11. Engelmann K, Shen H, Finn OJ. MCF7 side population cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the tumor antigen MUC1. *Cancer Res* 68: 2419-2426, 2008.
12. Shi Y, Fu X, Hua Y, Han Y, Lu Y, Wang J. The side population in human lung cancer cell line NCI-H460 is enriched in stem-like cancer cells. *PLoS One* 7: e33358, 2012.



13. Chen Y, Zhao J, Luo Y, Wang Y, Wei N, Jiang Y. Isolation and identification of cancer stem-like cells from side population of human prostate cancer cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 32: 697-703, 2012.
14. Ross EA, Anderson N, Micklem HS. Serial depletion and regeneration of the murine hematopoietic system. Implications for hematopoietic organization and the study of cellular aging. *J Exp Med* 155: 432-444, 1982.
15. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2<sup>+</sup> and ABCG2<sup>-</sup> cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res* 65: 6207-6219, 2005.
16. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* 66: 1883-1890, 2006.
17. Kuramoto H, Nishida M. *Cell and Molecular Biology of Endometrial Carcinoma*. Springer-Verlag: Tokyo; 2003.

## 第 5 章

### 子宮体癌幹細胞における分子マーカーの探索

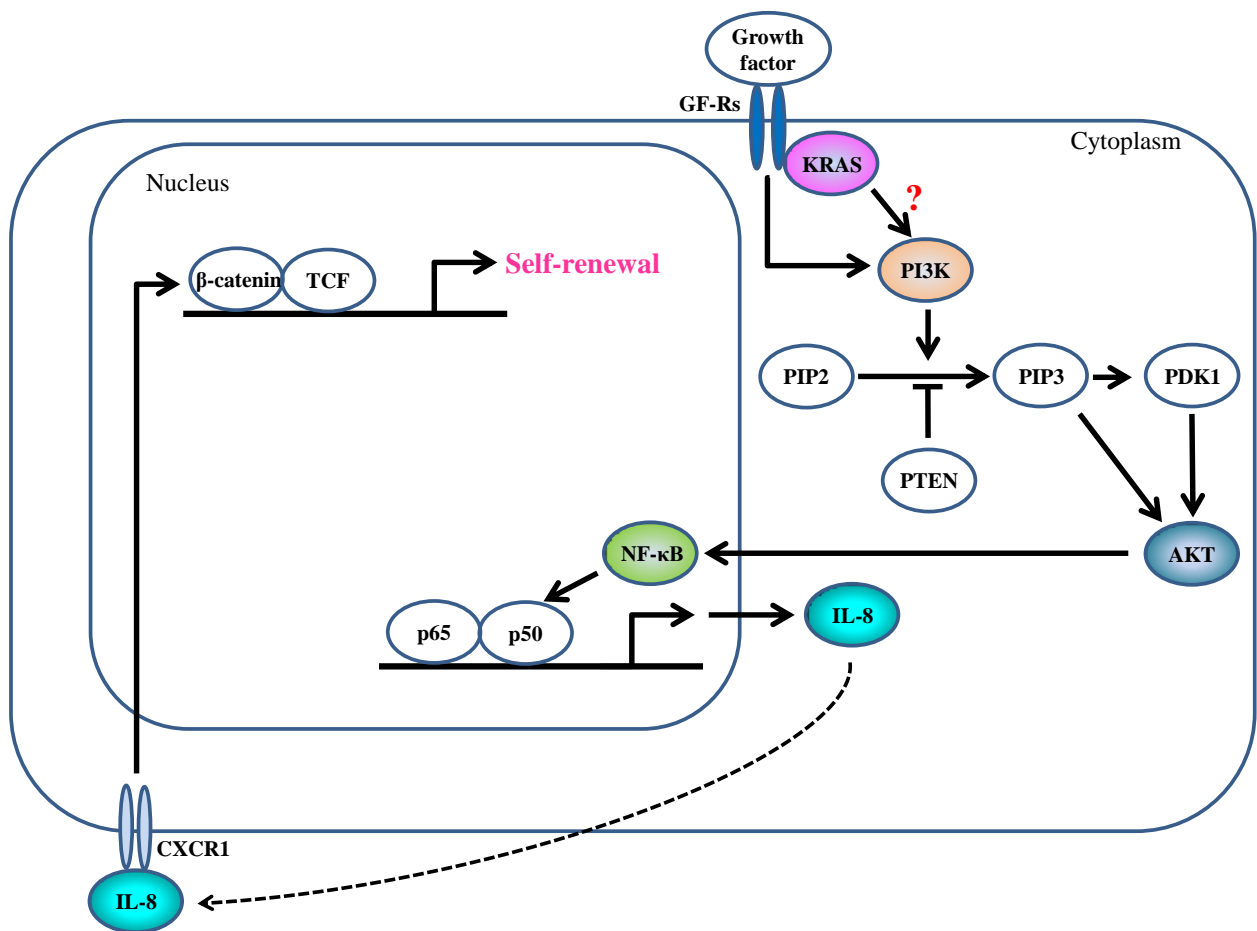
#### 5-1 研究の背景および目的

現在、用いられている癌幹細胞を分取する方法として、細胞の薬物排出能や酵素活性を利用した方法と細胞の表面抗原やその他の抗原により分取する方法がある。細胞の薬物排出能や酵素活性を利用した方法には、本研究で用いてきた SP 細胞分取と aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) 活性により分取する方法がある。SP 細胞分取については、第 2 章に示した通りである<sup>1-5)</sup>。しかし、すべての癌組織に SP 細胞が存在するわけでもなく、また SP 細胞であれば、すべてが癌幹細胞というわけではない<sup>6)</sup>。自己複製能を指標にした際、SP 細胞だけでなく MP 細胞にも自己複製能が示される場合がある<sup>6)</sup>。さらに、同じ種類の癌でも細胞株や患者ごとに SP 細胞および MP 細胞の自己複製能や造腫瘍能が異なっていることも観察されている<sup>6,7)</sup>。従って、SP 細胞は確かに有用な癌幹細胞分取法と言えるが、組織型や症例ごとに例外も多いことを念頭に置く必要がある。

第 2 章および第 4 章において、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いてヒト子宮体部類内膜腺癌細胞株より分取した SP 細胞中に癌幹細胞が存在することを証明してきた<sup>1)</sup>。しかし、Hoechst のみを指標にし、癌幹細胞を分取する場合、どうしても非癌幹細胞の混入が避けられない。また、Hoechst を指

標にし、癌幹細胞を検出することは、臨床の現場で多く用いられている細胞診標本や組織標本上では困難であることから SP 細胞に特異的に発現する分子を特定する必要があると考えられる。

そこで、子宮体癌の発生に関与することが知られている KRAS に着目した<sup>8,9)</sup>。KRAS の下流には、phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI3K) - v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT) シグナル伝達経路がある。子宮体癌と同様のホルモン依存性腫瘍である乳癌の癌幹細胞において、このシグナル伝達経路が活性化しており、nuclear factor-kappaB (NF-κB) を介して自己複製能を維持していることが報告されている (Fig. 1)<sup>10)</sup>。このことから、KRAS の発現が PI3K-AKT-NF-κB シグナル伝達経路の活性化に寄与し、癌幹細胞の維持に関与していると考えられる。本研究では、子宮体癌幹細胞を選択的に標識する分子マーカーを同定することを目的とし、SP 細胞に特異的に発現する分子を検索した。検索対象分子として KRAS を取り上げ、mRNA および蛋白発現解析により、子宮体癌幹細胞分子マーカーとして有用か否か考察したので報告する。



**Fig. 1 KRAS と PI3K-AKT-NF-κB シグナル伝達経路の関係**

Growth factor により活性化した phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) は v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT) の活性化を介して、その下流の NF-κB を活性化する。Nuclear factor-kappaB (NF-κB) が活性化することで、interleukin 8 (IL-8) の産生が誘導され、自己複製能が維持される<sup>10)</sup>。KRAS は PI3K の上流にあり、growth factor により KRAS がリン酸化されると、そこに PI3K が結合する。しかし、KRAS の活性化が、PI3K-AKT-NF-κB シグナル伝達経路を介して自己複製能の維持に関与しているかは不明である。

## 5-2 研究の方法

細胞株は第 4 章に準ずる。

細胞培養は第 2 章に準ずる。

フローサイトメトリー解析および SP 細胞・MP 細胞の分取は、第 2 章のフローサイトメトリー解析による SP 細胞および MP 細胞の検出に準ずる。

### RNA の抽出および real-time PCR

HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞を 72 時間培養後、TRIZOL Reagent (Invitrogen, USA) を用いて RNA を抽出した。その後 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Switzerland) を用いて cDNA を合成し、LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche Diagnostics, Switzerland) を用いて *KRAS* および *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* の mRNA 発現量を測定した。*GAPDH* は内部標準として細胞数の補正に用い、各 mRNA 発現量を相対的に定量化した。その際用いた primer 配列を table 1 に示す。

## 免疫細胞化学的解析

HEC-50B より分取後、72 時間培養した SP 細胞および MP 細胞と継代培養した HEC-50B を 95% エタノールにて固定し、マリノールを用いて転写標本を作製した。作製した SP 細胞および MP 細胞の標本には高分子ポリマー法による染色を施し免疫細胞化学的に解析した。また、継代培養した HEC-50B の標本には高分子ポリマー法による染色を施し子宮体癌幹細胞分子マーカーとしての有用性を検討した。標本をエタノール下降系列で親水後、内因性ペルオキシダーゼ活性の除去を目的として 3% 過酸化水素 (Kanto chemical, CO., INC., Japan) を室温にて 15 分間反応させた。流水水洗後、抗原賦活化を目的として 0.01M 水酸化ナトリウム加クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中でオートクレーブを用いて 121°C、10 分間加熱処理した。室温にて冷却し、水洗後、PBS で洗浄 (5 分, 3 回) した。非特異的反応阻止を目的として 5% ウシ血清アルブミン (BSA, Nacalai tesque, INC., Japan) を含む PBS を室温にて 30 分間反応させた。一次抗体にはマウスモノクローナル抗 KRAS 抗体 (clone 9.13, 1:250, Invitrogen, USA) を、4°C にて一晩反応させた。抗体の希釈には 1% BSA を用いた。PBS で洗浄 (5 分, 3 回) 後、HISTOFINE simple stain MAX-PO (MULTI) (Nichirei, Japan) を室温にて 30 分反応させた。発色基質には 0.05% 3,3-diaminobenzidine (Tokyo chemical industry CO., LTD., Japan) を含む 0.6% 過酸化水素加 0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) を用い、室温にて反応させた。流水水洗後、

Mayer's Hematoxylin (MUTO PURE CHEMICALS CO., LTD., Japan) で核染色を施し、脱水・透徹後封入した。対物 40 倍で観察した標本上の全ての細胞を対象にし、細胞質陽性細胞率を labeling index (LI; %) として算出した。

統計学的解析は第 4 章に準ずる。

**Table 1. Real-time PCR に用いた primer 配列**

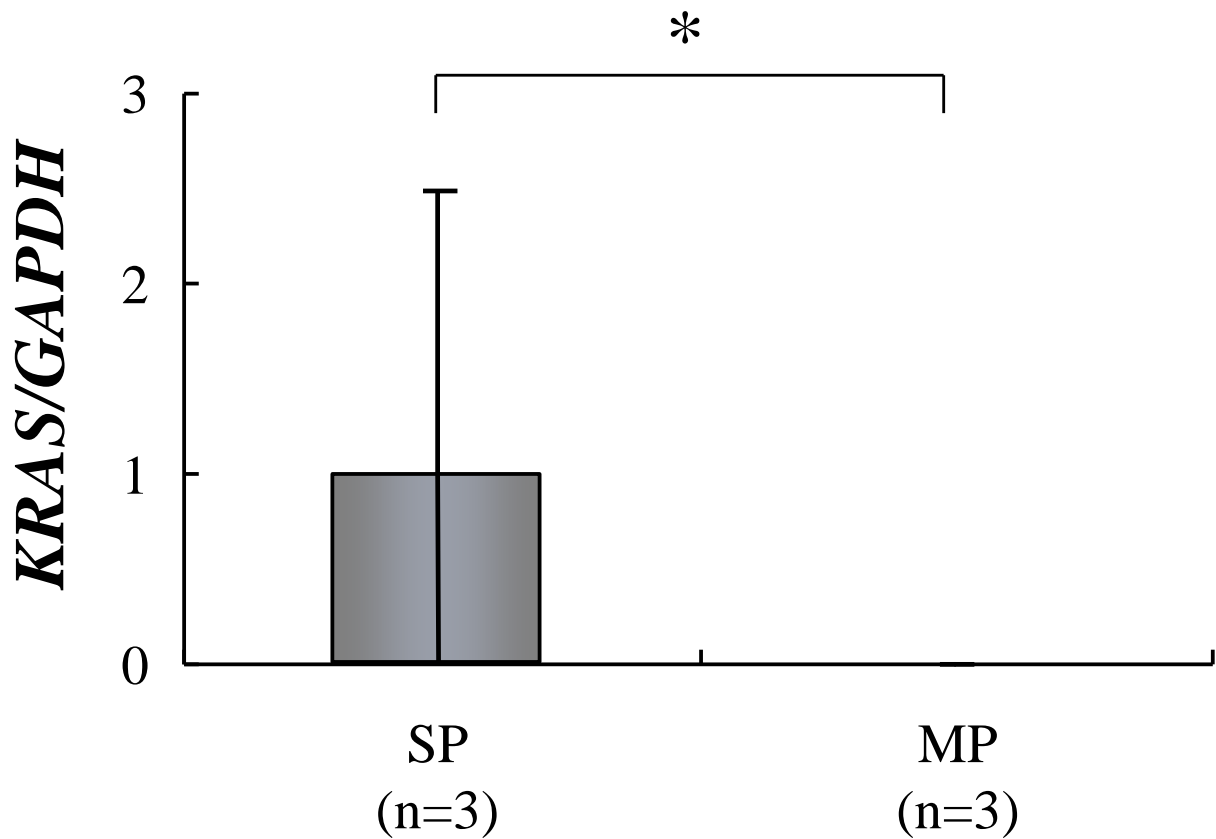
Identification		Sequence	Amplification Length (bp)
<i>KRAS</i>	Fw	5'-gat tcc tac agg aag caa gt-3'	176
	Rv	5'-taa tgg tga ata tct tc-3'	
<i>GAPDH</i>	Fw	5'-tga acg gga agc tca ctg g-3'	307
	Rv	5'-tcc acc acc ctg ttg ctg ta-3'	



### 5-3 研究結果

#### 子宮体癌幹細胞における分子マーカー発現解析

HEC-50B から分取した SP 細胞および MP 細胞の *KRAS* mRNA 発現を解析した。Fig. 2 に示すように SP 細胞の *KRAS* mRNA 発現は MP 細胞と比較して有意に高値を示した ( $p = 0.0495$ )。続いて、*KRAS* 蛋白発現を免疫細胞化学的に解析した。その結果、*KRAS* LI は、SP 細胞では 75%、MP 細胞では 15% であり、SP 細胞における *KRAS* 蛋白発現は mRNA 発現同様に MP 細胞と比較して有意に高値を示した ( $p = 0.0495$ , Fig. 3,4)。以上の結果を基に、継代培養した HEC-50B における *KRAS* の蛋白発現を免疫細胞化学的に確認したところ一部に *KRAS* 蛋白発現が認められた (Fig. 5)。

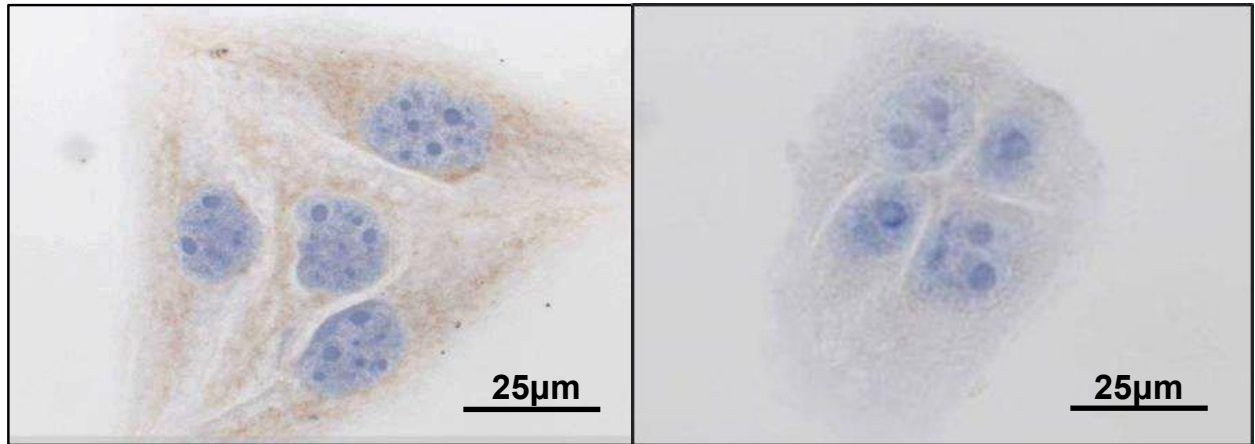


**Fig. 2 HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞における *KRAS* mRNA 発現解析**

HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞における *KRAS* mRNA 発現量を real-time PCR を用いて定量した。*KRAS* mRNA 発現は SP 細胞において MP 細胞と比較して有意に高値を示した。値は平均値±標準偏差である。Mann-Whitney *U*-test (\* $p < 0.05$ )

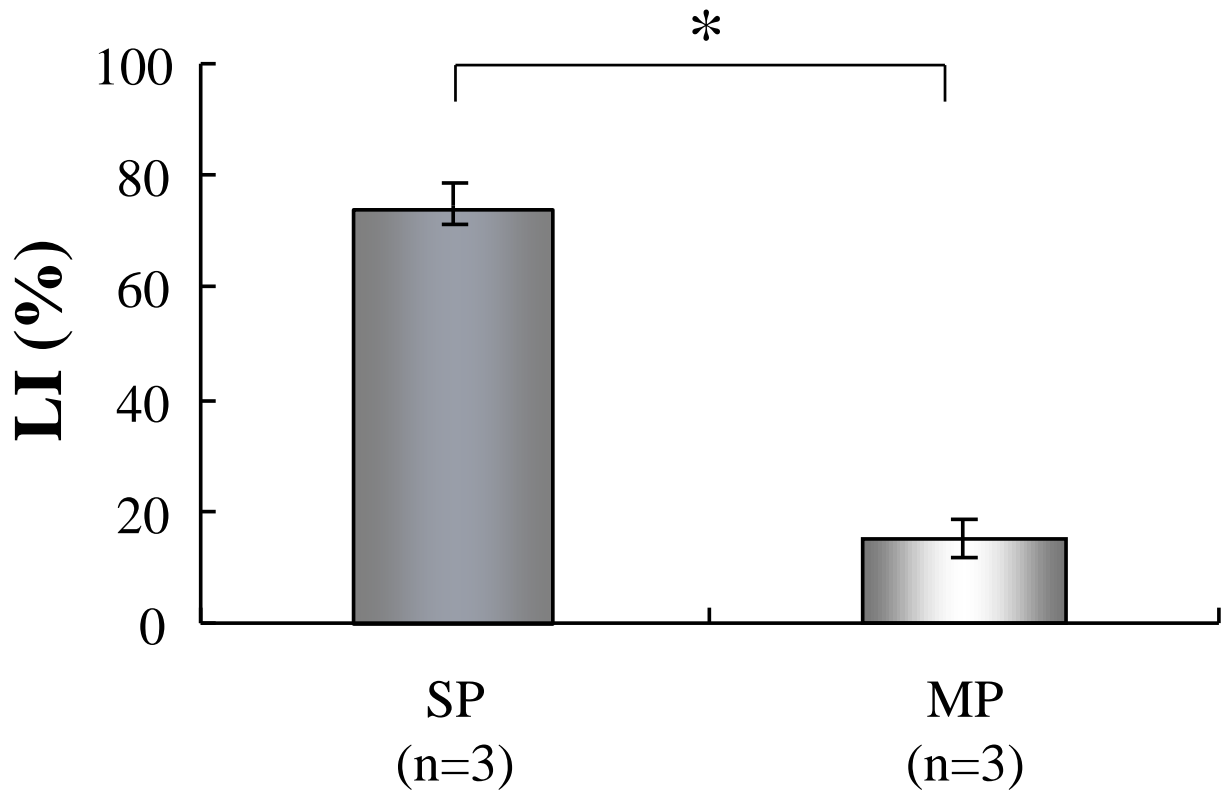
SP 細胞

MP 細胞



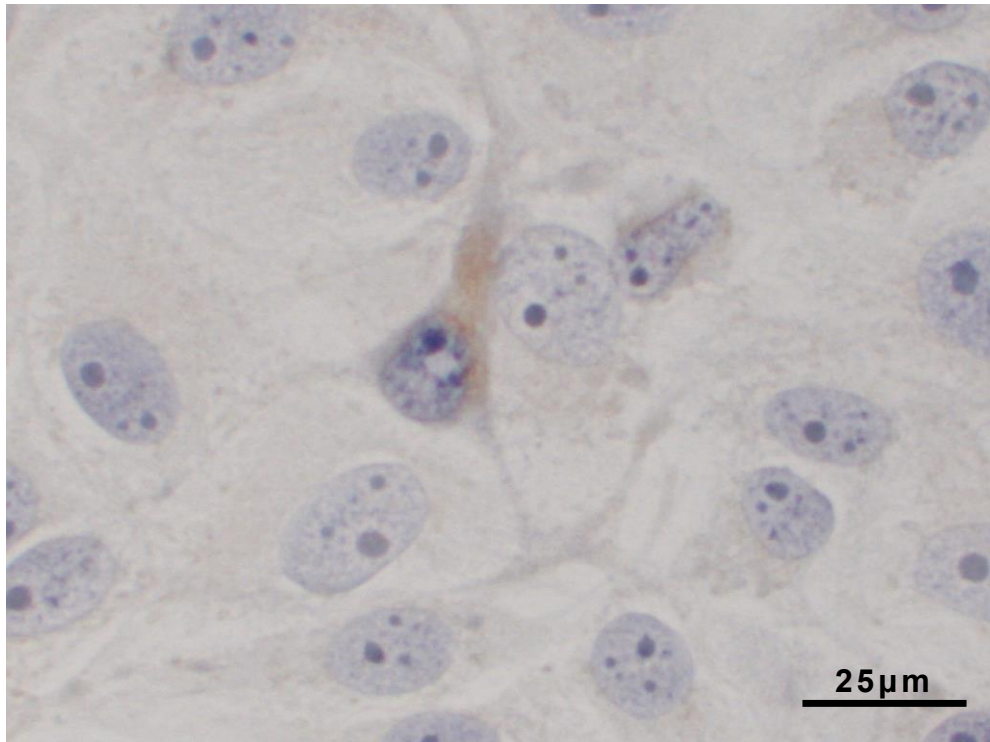
**Fig. 3 HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞における KRAS 蛋白発現解析**

HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞における KRAS 蛋白発現を免疫細胞化学的に解析した。その結果、SP 細胞において KRAS 蛋白の高発現が認められた。(対物 40 倍)



**Fig. 4 HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞における KRAS 蛋白発現解析**

HEC-50B より分取した SP 細胞および MP 細胞における KRAS 蛋白発現を免疫細胞化学的に解析した。対物 40 倍で観察した標本上の全ての細胞を対象にし、細胞質陽性細胞率を labeling index (LI; %) として算出した。その結果、KRAS 蛋白発現は SP 細胞において MP 細胞と比較して有意に高値を示した。値は平均値 ± 標準偏差である。Mann-Whitney *U*-test (\**p* < 0.05)



**Fig. 5 継代培養した HEC-50B における KRAS 蛋白発現**

継代培養した HEC-50B における KRAS 蛋白発現を免疫細胞化学的に解析した。その結果、継代培養した HEC-50B の一部に KRAS 陽性細胞が認められた。(対物 40 倍)

#### 5-4 考察

近年の癌幹細胞研究では、*in vitro* において、腫瘍発生に関わる遺伝子を用いて正常細胞に導入することにより、人工癌幹細胞の作製が成されている<sup>11,12)</sup>。*Transformation related protein 53 (Trp53)* の発現を一時的に抑制したマウス卵巣上皮細胞に *C-myc* および *v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (Kras)* を導入することで卵巣癌幹細胞が作製できたという報告がある<sup>13)</sup>。この報告より、ヒトの癌幹細胞の発生・維持においても *C-MYC* および *KRAS* が関与していることが考えられる。*KRAS* は、細胞の増殖・分化に関与する低分子 GTP 結合蛋白であり、子宮体癌において変異率の高い癌遺伝子としても報告されているが、癌幹細胞分子マーカーとしての報告はない<sup>8,9,14)</sup>。

本研究では子宮体癌の発生に関与する *KRAS* に着目し、子宮体癌幹細胞に特異的に発現する分子の検索を行った。その結果、*KRAS* の mRNA 発現および蛋白発現共に *SP* 細胞において *MP* 細胞と比較して有意に高値を示した。従って、子宮体癌においても *KRAS* が子宮体癌幹細胞の発生・維持に関与していることが示唆された。また、継代培養した *HEC-50B* における *KRAS* の免疫細胞化学的解析を行った結果、極少数の細胞が *KRAS* 陽性を示した。この *KRAS* 陽性細胞が、本研究で紫色レーザー搭載型 *FACSAria* により検出してきた *SP* 細胞であり、子宮体癌幹細胞であると考えられる。これらの結果より、子宮体癌において *KRAS* が癌幹細胞分子マーカー

に成り得ることが示唆された。また、**KRAS** の発現レベルが子宮体癌幹細胞の発生・維持に重要な役割を果たしていることが考えられる。

**KRAS** の下流には、**PI3K-AKT-NF- $\kappa$ B** シグナル伝達経路が存在する。このシグナル伝達経路は、乳癌幹細胞において活性化しており、**NF- $\kappa$ B** が活性化することで、interleukin 8 (**IL-8**) の産生が誘導され、自己複製能の維持に関与していることが報告されている<sup>10)</sup>。これらのことから **PI3K-AKT-NF- $\kappa$ B** シグナルが癌幹細胞の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。子宮体癌において **KRAS** により **PI3K-AKT-NF- $\kappa$ B** シグナルが活性化することで、癌幹細胞の自己複製能が維持されているのであれば、**KRAS** が新たな治療標的分子にも成り得ると考えられる。今後、子宮体癌幹細胞における **KRAS** 発現と **PI3K-AKT-NF- $\kappa$ B** シグナル伝達経路の関係性を明らかにすることで、新規治療法の開発に繋がることが期待される。

本研究の一部は以下にて発表済みである。

- Tomiyasu S, Miyamoto T, Mori M, Yaguchi T, Yakushiji H, Ohno S, Miyake Y, Sakaguchi T, Ueda M, Ohno E. Isolation of side population cells from endometrial cancer cells using a violet laser diode. *Human Cell* 27: 36-42, 2014.
- 富安 聡, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 福留信幸, 坂口卓也, 大野英治. 子宮内膜癌における癌幹細胞の生物学的特性およびマーカーの検討. 第 51 回 日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 2010.
- 富安 聡, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. 子宮内膜癌幹細胞における発現分子および形態の経時的解析. 第 53 回 日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 2012.
- 富安 聡, 宮本朋幸, 森 康浩, 矢口貴博, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. Characteristic of side population cells sorted by using violet laser. 第 72 回 日本癌学会学術総会 2013.



## 5-5 引用文献

1. Tomiyasu S, Miyamoto T, Mori M, Yaguchi T, Yakushiji H, Ohno S, Miyake Y, Sakaguchi T, Ueda M, Ohno E. Isolation of side population cells from endometrial cancer cells using a violet laser diode. *Human Cell* 27: 36-42, 2014.
2. 富安 聡, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. 子宮内膜癌における癌幹細胞の生物学的特性およびマーカーの検討. 第 51 回 日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 要旨集 299, 2010.
3. 富安 聡, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. 子宮内膜癌幹細胞における発現分子および形態の経時的解析. 第 53 回 日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 要旨集 399, 2012.
4. 富安 聡, 宮本朋幸, 森 康浩, 矢口貴博, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. Characteristic of side population cells sorted by using violet laser. 第 72 回 日本癌学会学術総会要旨集 2013.
5. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel

- U, Goodell MA, Brenner MK. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14228-14233, 2004.
6. Broadley KW, Hunn MK, Farrand KJ, Price KM, Grasso C, Miller RJ, Hermans IF, McConnell MJ. Side population is not necessary or sufficient for a cancer stem cell phenotype in glioblastoma multiforme. *Stem Cells* 29: 452-461, 2011.
  7. Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 781-786, 2004.
  8. Enomoto T, Inoue M, Perantoni AO, Terakawa N, Tanizawa O, Rice JM. K-ras activation in neoplasms of human reproductive tract. *Cancer Res* 50: 6139-6145, 1990.
  9. Enomoto T, Inoue M, Perantoni AO, Buzard GS, Miki H, Tanizawa O, Rice JM. K-ras activation in premalignant and malignant epithelial lesions of the human uterus. *Cancer Res* 51: 5308-5314, 1991.
  10. Hinohara K, Kobayashi S, Kanauchi H, Shimizu S, Nishioka K, Tsuji E, Tada K, Umezawa K, Mori M, Ogawa T, Inoue J, Tojo A, Gotoh N.

- ErbB receptor tyrosine kinase/NF- $\kappa$ B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 6584-6589, 2012.
11. Kondo T. Mouse induced glioma-initiating cell models and therapeutic targets. *Anticancer Agents Med Chem* 10: 471-480, 2010.
  12. Shimizu T, Ishikawa T, Sugihara E, Kuninaka S, Miyamoto T, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Tsunoda T, Miya F, Morioka H, Nakayama R, Kobayashi E, Toyama Y, Kawai A, Ichikawa H, Hasegawa T, Okada S, Ito T, Ikeda Y, Suda T, Saya H. c-MYC overexpression with loss of Ink4a/Arf transforms bone marrow stromal cells into osteosarcoma accompanied by loss of adipogenesis. *Oncogene* 29: 5687-5699, 2010.
  13. Motohara T, Masuko S, Ishimoto T, Yae T, Onishi N, Muraguchi T, Hirao A, Matsuzaki Y, Tashiro H, Katabuchi H, Saya H, Nagano O. Transient depletion of p53 followed by transduction of c-Myc and K-Ras converts ovarian stem-like cells into tumor-initiating cells. *Carcinogenesis* 32: 1597-1606, 2011.
  14. Haigis KM, Kendall KR, Wang Y, Cheung A, Haigis MC, Glickman JN, Niwa-Kawakita M, Sweet-Cordero A, Sebolt-Leopold J, Shannon KM,

Settleman J, Giovannini M, Jacks T. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat Genet* 40: 600-608, 2008.

## 第 6 章

### 結論

本研究では、紫外線レーザー搭載型セルソーターを用いた場合と同様に、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて SP 細胞を分取できることが示された。また、ヒト子宮体部類内膜腺癌細胞株より分取した SP 細胞は、自己複製能および分化能を有すると共に、MP 細胞と比較して高い造腫瘍能を有することから、SP 細胞中に子宮体癌幹細胞が存在することが証明された。さらに、悪性度の高いヒト子宮体部類内膜腺癌細胞株において、SP 細胞は KRAS 陽性細胞を優勢に含むことから、癌幹細胞は KRAS を発現し、癌の発生・維持に関与していると考えられる。加えて、KRAS は高悪性度の子宮体癌において癌幹細胞分子マーカーとして診断に有用であることが示された。また、紫色レーザー搭載型 FACS Aria は紫外線レーザー搭載型セルソーターの欠点を克服しており、この技術を用いた癌幹細胞分取の報告は、本研究が最初である。従って、本研究で提示した紫色レーザー搭載型 FACS Aria による癌幹細胞分取法を検討評価することにより、癌幹細胞研究の更なる効率化が期待される。

## 業績リスト

### 学術論文

- Tomiyasu S, Miyamoto T, Mori M, Yaguchi T, Yakushiji H, Ohno S, Miyake Y, Sakaguchi T, Ueda M, Ohno E. Isolation of side population cells from endometrial cancer cells using a violet laser diode. *Human Cell* 27: 36-42, 2014.
- 宮本朋幸, 遠藤 南, 富安 聡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. LBC における細胞出現率の定量的解析. 日本臨床細胞学会岡山県支部会誌, 日本臨床細胞学会岡山県支部出版, 2013. (in press)

### 学会発表

- 富安 聡, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 福留信幸, 坂口卓也, 荒武八起, 大野英治. 子宮内膜癌における癌幹細胞の生物学的特性およびマーカーの検討. 第 51 回 日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 2010.
- 富安 聡, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. 子宮内膜癌幹細胞における発現分子および形態の経時的解析. 第 53 回 日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 2012.

- 富安 聡，森 康浩，宮本朋幸，薬師寺宏匡，大野節代，三宅康之，坂口卓也，大野英治．子宮体癌における side population 細胞の特性解析．第 30 回 日本ヒト細胞学会学術集会 2012.
- 富安 聡，森 康浩，宮本朋幸，薬師寺宏匡，大野節代，三宅康之，坂口卓也，大野英治．Sorting of cancer stem cells using FACSAria equipped with violet laser. 第 71 回 日本癌学会学術総会 2012.
- 宮本朋幸，富安 聡，森 康浩，薬師寺宏匡，大野節代，三宅康之，坂口卓也，大野英治．Time course of stem cellular features of endometrial adenocarcinoma cancer stem cells. 第 71 回 日本癌学会学術総会 2012.
- 富安 聡，森 康浩，宮本朋幸，薬師寺宏匡，大野節代，三宅康之，坂口卓也，大野英治．子宮体癌における癌幹細胞の生物学的特性解析．第 54 回 日本臨床細胞学会総会（春期大会）2013.
- 富安 聡，宮本朋幸，森 康浩，矢口貴博，薬師寺宏匡，大野節代，三宅康之，坂口卓也，大野英治．Violet レーザーにより分取した side population 細胞の特性解析．第 8 回 日本臨床検査学教育学会学術大会 2013.
- 富安 聡，宮本朋幸，森 康浩，矢口貴博，薬師寺宏匡，大野節代，

三宅康之，坂口卓也，大野英治. Characteristic of side population cells sorted by using violet laser. 第 72 回 日本癌学会学術総会 2013.



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導とご鞭撻を頂きました倉敷芸術科学  
大学大学院 産業科学技術研究科 機能物質化学専攻 分子細胞病理学  
系および同大学生命医科学科の先生方、並びに副査の先生方に心から感謝  
申し上げます。