

## 総括研究報告書（和文）

幹細胞を標的にした子宮内膜症の病態解明と新しい薬剤評価システム・治療薬の開発

慶應義塾大学医学部産婦人科学 准教授 丸山 哲夫

子宮内膜症は良性疾患ではあるものの、幹細胞の存在の可能性や EMT（上皮間葉転換）ポテンシャルなども含めて浸潤能や転移能を有する点で悪性腫瘍との類似点・共通点が多くみられる（Verma R, et al., *Reproduction*, 2004; Maruyama T, *Endometriosis: Pathogenesis and Treatment*. 2014）。最近のトピックとして、悪性所見の無い深部内膜症に癌化を惹起するドライバー遺伝子の変異が高率に存在することが明らかになった（Anglesio MS, et al., *N Engl J Med*, 2017）。このように、がん生物学の観点からのアプローチが子宮内膜症研究において重要である。この点を踏まえて、丸山哲夫准教授（慶應義塾大学医学部産婦人科）、梶谷 宇特定准教授（京都大学大学院医学研究科 AK プロジェクト）、升田博隆専任講師（慶應義塾大学医学部産婦人科）は研究を進めた。

平成 28 年度において、ヒト高分化型腺癌由来腺上皮細胞である Ishikawa 細胞で幹細胞特性を持つ side population (SP) phenotype (DNA 結合色素である Hoechst33342 の排泄能力が高い)を持つ集団が少数ながらも検出されたが、細胞数が少ないことまたは安定的に細胞を単離できないことから、別の候補細胞を検証した。候補として子宮内膜癌細胞株である HHUA 細胞、HEC6 細胞、不死化正常子宮内膜間質細胞 KC02-44D hTERT 細胞 THESC 細胞、正常子宮内膜腺細胞 Hemo-1 細胞を用いた。HHUA 細胞と HEC6 細胞からのみ SP 細胞画分が検出された。特に HHUA 細胞は子宮内膜癌細胞由来でありながら、機能的なエストロゲン受容体やプロゲステロン受容体を有し、また *in vitro* 培養系において正常内膜腺管と同様の腺管構造を生成する能力を有するなど、正常内膜細胞に近いポテンシャルを有することが知られている（Ishiwata I, et al., *Gynecol Oncol*, 1984; Tanaka T and Umeski N, *J Reprod Immunol*, 2000）。HHUA から単離された HHUA-SP 細胞画分は増殖能力が高く、他細胞の既報で SP 画分に発現が認められている MDR1 の発現が HHUA-SP 細胞画分でのみ発現していることも明らかとなった。さらに免疫不全マウスへ移植すると有意に HHUA-SP 細胞の腫瘍で重量が重く、さらにその腫瘍組織においても MDR1 の発現が認められた。以後、安定的に検出できる HHUA 細胞を用いて、候補薬剤の選定を行った。

まず正常の細胞に影響を及ぼさない候補薬剤の至適濃度を決定するため、不死化正常子宮内膜間質細胞 THESC および細胞増殖解析を用いて候補薬剤の使用濃度を決定した。次に SP 画分を有する細胞株に対し候補薬剤を添加し増殖抑制効果を調べたところ、本邦未承認薬 D を含む 6 種類の薬剤で増殖が抑制された。さらにそれらを含む 7 種類の候補薬剤が SP 細胞画分の細胞数を有意に減少させた。候補薬剤の薬効について文献を調べると、増殖抑制あるいはアポトーシス誘導が示唆されていた。このことから上記の候補薬剤添加によるアポトーシス誘導が認められるかアネキシン V を用いたアポトーシス解析を行ったところ、薬剤 A、薬剤 B、薬剤 C においてアポトーシス誘導傾向が認められた。また試験的にだが、HHUA 細胞に薬剤 A を添加するとスフェロイド形成も抑制した。これらのことから上記 3 種の薬剤において幹細胞画分に対する薬効が期待された。

現在、SP 細胞及び SP 以外の画分を単離し、免疫不全マウスへ移植し腫瘍を形成させた後、薬剤を投与し、その薬効を調べている。HHUA-SP 細胞画分には特徴的な MDR1 の発現が認められる。予備的データにはなるが、SP 腫瘍において MDR1 の発現が認められるが、候補薬剤投与群では MDR1 の発現を減少させる傾向が認められた。さらに増殖マーカーである Ki67 陽性細胞も SP 腫瘍群でのみコントロール群に比較し、候補薬剤投与群で減少していた。また薬剤 A は SP 腫瘍群でのみアポトーシス細胞検出マーカーである TUNEL 陽性細胞数を増加する傾向が認められた。

## 総括研究報告書 (英文)

### **Elucidation of the pathogenesis of endometriosis and development of new drug testing system and novel drugs targeting stem cells**

Tetsuo Maruyama, M.D., Ph.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University School of Medicine

Endometriosis is a benign disease but has several unique cancer-like properties including high potentials of invasion, metastasis, and epithelial-mesenchymal transition (Verma R, et al., *Reproduction*, 2004; Maruyama T, *Endometriosis: Pathogenesis and Treatment*. 2014). Furthermore, a very recent study has shown that lesions in deep infiltrating endometriosis, which are associated with virtually no risk of malignant transformation, harbor somatic cancer driver mutations (Anglesio MS, et al., *N Engl J Med*, 2017). These collectively implicate the importance of cancer biology-based approach in the study of endometriosis.

We isolated side-population (SP) cells, which are known as a stem cell-rich population and have the unique ability to pump out DNA binding dye Hoechst 33342, from Ishikawa human endometrial cancer cell line, but the Ishikawa cells included very few SP cells making it difficult to obtain SP cells stably. We then analyzed the containing rate of SP cell in other human endometrium-related cell lines including HHUA, HEC6, KC02-44D, THESC and Hemo1 and found that only HHUA and HEC6 endometrial cancer cell lines contained SP cell fraction. We demonstrated that HHUA-SP cells had a higher cell growth potential than main population (MP) cells, which are a non-stem cell population, and expressed MDR1, one of the SP and stem cell markers. HHUA-SP cells and HHUA-MP cells were individually inoculated into the subcutaneous tissues of nude mice. HHUA-SP cells and HHUA-MP cells formed tumors, and there is more increase in the weight of tumors derived from HHUA-SP cells compared with that from HHUA-MP cells. Based on the results together with the published data that HHUA cells retain many of intracellular signaling pathways found in normal endometrial epithelial cells (Ishiwata I, et al., *Gynecol Oncol*, 1984; Tanaka T and Umeski N, *J Reprod Immunol*, 2000), we thereafter used HHUA cells for drug screening.

We next performed cell proliferation analysis (MTS assay) in THESC cells, immortalized human endometrial stromal cells, and determined the optimum concentrations of the candidate drugs not to affect the growth of normal endometrial cells. We then tested the cell growth-inhibitory and SP cell-reducing effects of these drugs at the determined concentrations on HHUA cells. Both effects were found in six drugs including drug D. Furthermore, among the six drugs, drugs A, B, and C showed apoptosis-inducing effects on HUA cells as determined by Annexin V staining assay.

We have been investigating the in vivo effects of drugs A, B and C on tumor formation in immunodeficient mice inoculated with HHUA-SP or HHUA-MP cells. Preliminary data showed that MDR1-positive cells together with Ki67-positive cells, i.e., proliferating cells, were decreased in number in HHUA SP-derived tumors, but not HHHUA MP-derived tumors in response to treatment with drugs A, B and C.