

iPS 細胞を使用した HPV18 型子宮頸部腺癌の  
発生機序の解明（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程  
外科系産婦人科学専攻

鎌田 早紀

修了年 2023 年

指導教員 川名 敬

## 1.背景

子宮頸癌は日本国内において年間約 10000 人が罹患、約 2900 人が死亡し、2000 年以降増加の一途をたどっている [1]。子宮頸癌は HPV(Human Papillomavirus)の感染が原因の 90%以上を占め、高リスクで癌へと移行する HPV16 型、HPV18 型は子宮頸癌の治療や予防において極めて重要である。HPV18 型は子宮頸癌の HPV 型別の原因として約 25%を占めているが、その悪性度は約 40%を占める HPV16 型よりも高いという報告が散見される [2, 3]。また、HPV18 型子宮頸癌は HPV16 型と比し腺癌が多く、放射線療法へも抵抗性があるが、なぜ HPV18 型では腺癌が高頻度に発生するかという事に関しては極めて限定的な知見しか得られていない [4]。子宮頸部の SCJ (Squamo-columnar Junction)にリザーブ細胞と呼ばれる幹細胞の性質を持った細胞が存在し、扁平上皮細胞もしくは円柱上皮細胞に分化する。このリザーブ細胞に HPV 感染が起きることで子宮頸癌が引き起こされるため、子宮頸部腺癌の発生機序を解明するためにリザーブ細胞が重要と考えた。未分化能や幹細胞能を持つ iPS(induced pluripotent stem)細胞から子宮頸部リザーブ細胞様に分化させた細胞(iRC :induced reserve cell-like 細胞)」を樹立する事に既に成功している [5]。

## 2.目的

子宮頸癌の自然発生の機転となる組織幹細胞を iPS 細胞由来の子宮頸部リザーブ細胞様(iRC) 細胞で *in vitro*、*in vivo* 実験系で再現することで、HPV18 型による発癌過程における幹細胞特性 (Stemness) の維持のメカニズムを解明し、その原因遺伝子発現を探索することで、HPV18 型もしくは子宮頸部腺癌の個別化医療の基礎的研究を行うことを目的とした。

### 3.材料と方法

#### 3-1. 細胞株

iRC 細胞に HPV16 もしくは 18 E6/E7 をレンチウイルスによるベクターを用いて遺伝子挿入し、iRC+ベクター(iRC control), iRC+HPV16 E6/E7(iRC16), iRC+HPV18 E6/E7(iRC18)の 3 種類の細胞を作成した。更に、患者子宮検体のリザーブ細胞から細胞単離し、継代した HCK (Human cervical keratinocyte) 細胞に同様の方法で HPV E6/E7 を遺伝子挿入した細胞を使用した。[6]

#### 3-2. iRC 細胞 RNAseq

iRC control、iRC16、iRC18 の細胞の RNA 抽出を行い、RNAseq を行った。

### 3-3. in vivo による腫瘍形成モデルの検討

すべての動物実験は日本大学動物実験運営内規に則り、また遺伝子組み換えについても内規に従った。5.0×10<sup>6</sup>個/1頭の iRC16、iRC18、iRC control をマトリゲル 500 μL に混合し、NOD-scid マウスの頸部～背中に注入。3-4 か月間観察とした。腫瘍形成してからは1週間に1度ノギスを用いて腫瘍径と体積を測定した。直径 2cm に達したところで安楽死とし、腫瘍を摘出した。iRC16、iRC18 細胞について、腫瘍形成スピードに差があるか検討した。

### 3-4. HE 染色・免疫染色

パラフィン包埋ブロックを作成し、HE 染色は病理学の評価に使用した。p63、KRT5、KRT8、KRT10、KRT18、ALDH1A1 の抗体を使用し免疫染色を行った。腫瘍内の構造については、写真統合行い面積比を計算した。

### 3-5. iRC18 腫瘍検体による MD(micro dissection)解析

iRC18-5、iRC18-6 の腫瘍で①腺系腫瘍 A1、②腺系腫瘍 A2、③腺系腫瘍 B、④未分化をそれぞれ1つの円直径 100 μm で 3-4 つプロットした。早稲田大学にて微小組織打ち抜き装置を用いて検体から打ち抜き、RNA 抽出、解析を行った[7, 8]。

### 3-6. iRC18 腫瘍検体による scRNA(single cell RNA sequence)解析

パラフィン包埋ブロックと近い部分を scRNA 検体として理科学研究所に提出した。遺伝子解析は国立遺伝学研究所にて解析した。

### 3-7. 統計解析

R を用いて統計解析をおこなった。

## 4. 結果

### 4-1. 細胞 RNAseq による iRC18 高発現の遺伝子、パスウェイの抽出

細胞 RNAseq で iRC18 高発現している KRT7、KRT8、KRT18 は TCGA での HPV18 型腺癌で高発現していた低ケラチン群と一致していた。[9]

KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)パスウェイ解析は、「ECM receptor interaction」が iRC18 で高発現していた。

### 4-2. 腫瘍形成能の評価：iPS 細胞から誘導した iRC 細胞をマウスに注入すると

腫瘍が形成される

iRC16 は 10 頭中 8 頭に、iRC18 は 10 頭中 10 頭に、iRC control は 5 頭中 3 頭

に腫瘍形成した。HCK 細胞グループも同様にマトリゲルに混合し、マウスに注入したが、腫瘍形成は起こらなかった。

#### 4-3. HE 染色による腫瘍組織像の評価：iRC 細胞グループでは形成した腫瘍に腺構造が認められた

HE 染色では、iRC グループでそれぞれ腺構造を含んだ組織が認められた。HPV 関連の子宮頸腺癌腸型に類似している腺組織、HPV 感染組織で認められるフロント形成の様な組織も認めた。免疫染色をすると、E-カドヘリン、低分子ケラチン陽性の腺系腫瘍 A と陰性の腺系腫瘍 B が存在しており、異なる蛋白発現をしていた。iRC control、iRC16、iRC18 腫瘍内の腺構造の面積を測定すると、iRC control と比較して iRC18 は 9 倍多く腺系腫瘍 A、B を誘導した( $p=0.04$ ) が、iRC16 と iRC18 間の比較では統計的な有意差は認めなかった。

#### 4-4. 腫瘍形成スピードの評価

腫瘍体積  $2000\text{mm}^2$  に達した平均日数は、iRC16 は 16.5 週、iRC18 は 13.6 週で iRC18 は iRC16 と比べて明らかに( $p=0.005$ )腫瘍形成スピードが早かった。

#### 4-5. CSC マーカーの評価：iRC18 は CSC(cancer stem cell)マーカー陽性の腺構

## 造を有する

腺系腫瘍 A は CSC マーカーで、TCGA でも HPV18 型腺癌に高発現している ALDH1A1 に強陽性であった。リザーブ細胞マーカーである p63 も発現していた。

## 4-6. iRC18 腫瘍の MD 解析：MD 解析では腺系腫瘍 A, B, 未分化組織は分離良好であった

MD で抽出した 3 つの構造はそれぞれ特異的な遺伝子発現が認められ、PCA(principal component analysis)では分離良好であった。腺系腫瘍 A は TCGA での HPV18 型腺癌に特徴的な遺伝子発現パターンに類似していた。腺系腫瘍 B は Wnt 経路の関連遺伝子が高発現していた。

## 4-7. iRC18 腫瘍の scRNAseq 解析

iRC18 全体の Umap では 22 のクラスターに分類され、HPV18 E6/E7 陽性細胞がクラスター内に認められた。クラスター16番は KRT8、KRT18、ALDH1A1 陽性で腺系腫瘍 A に一致する遺伝子発現であった。Fold change 上位の遺伝子は、細胞 RNAseq や MD 解析では抽出されていない遺伝子であった。

## 5.考察

本研究結果から HPV18 型子宮頸部腺癌に対する重要な知見が得られた。まず iRC細胞を使用することの利点の1つは、純粋に HPV16 E6/E7 と HPV18 E6/E7 を比較できることであった。細胞 RNAseq では腺の単層構造を形作る低分子ケラチン(KRT8、KRT18)が iRC18 で上昇しており、HPV18 がリザーブ細胞の円柱上皮、腺への分化を誘導したと考えられた。次に *in vivo* による検討に進み、腫瘍を形成させることに成功した。細胞や既報であるオルガノイドよりも生体に近い状態での遺伝子発現を実験可能という点で新規性があった。また既報では健常女性の子宮頸部のリザーブ細胞に E6,E7 遺伝子を導入しマウスに注入して腫瘍化するかの試みがなされているが、E6,E7 遺伝子のみでは腫瘍化は認めなかった。患者から作成したリザーブ細胞株が継代や作成時に分化し、幹細胞性を適切に模倣できていない事が理由として考えられた。iPS 細胞の性質を生かすことで、より正確に幹細胞性を模倣できることは、腺系腫瘍の形成を研究することにおいて大変重要な点と考えられた。腫瘍形成スピードの iRC16、iRC18 の比較では、腫瘍形成までの期間が iRC18 で有意に早かった。これは、iRC18 細胞で ECM receptor interaction が高発現していることが寄与している可能性が考えられた。腫瘍内の組織像では、2 種類の腺系腫瘍(A、B)、未分化組織が混合していた。TCGA と比較すると腺系腫瘍 A に HPV18 型腺癌の特徴遺伝子が発

現しており、腺系腫瘍 A は子宮頸部腺癌モデルとして適している組織と考えられた。さらに腺系腫瘍 A は癌幹細胞マーカーの ALDH1A1 陽性であり、治療効果遺伝子となることを示唆した。[10]。

scRNAseq では、皮下腫瘍は 22 個のクラスターに分離され、クラスターで高発現している上位遺伝子は、細胞の RNAseq や MD 解析とは異なっており、新たな遺伝子群の動きを捉えられたと考えられた。*In vivo* の実験系の確立により、腫瘍の組織や遺伝子発現を解析することで、HPV 型子宮頸部腺癌の発生機序や治療標的についての新たな知見を得ることができた。

## 6.今後の展望

HPV18 型子宮腺癌に対する個別化治療が本研究の目的であるが、薬剤選択までは至っていないため、目的遺伝子の抽出、パスウェイ抽出の後には阻害薬での実験を組むことが今後の展望となる。また、本研究では HPV E6/E7 のみの細胞であることやエストロゲンが存在しない状況での実験であることが Limitation として考えられるため、これらを満たした実験系を今後の課題とする。

## 7.まとめ

子宮頸部にある組織幹細胞を模倣した iPS 細胞由来の iRC 細胞に HPV を導入したことによって、HPV18 型子宮頸部腺癌の *in vivo* 実験系を確立し、腺系腫瘍を腺管レベル、単一細胞レベルで遺伝子発現を紐解くことによって子宮頸部腺癌の治療の標的遺伝子を探索できる系ができた。子宮頸癌の新たな治療開発の一端に貢献することが予測される。

## 引用文献

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A: **Cancer statistics, 2022**. *CA Cancer J Clin* 2022, **72**(1):7-33.
2. Burger RA, Monk BJ, Kurosaki T, Anton-Culver H, Vasilev SA, Berman ML, Wilczynski SP: **Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer**. *J Natl Cancer Inst* 1996, **88**(19):1361-1368.
3. Schwartz SM, Daling JR, Shera KA, Madeleine MM, McKnight B, Galloway DA, Porter PL, McDougall JK: **Human papillomavirus and prognosis of invasive cervical cancer: a population-based study**. *J Clin Oncol* 2001, **19**(7):1906-1915.
4. Seoud M, Tjalma WA, Ronsse V: **Cervical adenocarcinoma: moving towards better prevention**. *Vaccine* 2011, **29**(49):9148-9158.
5. Sato M, Kawana K, Adachi K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, Nishida H, Inoue T, Taguchi A, Ogishima J *et al*: **Regeneration of cervical reserve cell-like cells from human induced pluripotent stem cells (iPSCs): A new approach to finding targets for cervical cancer stem cell treatment**. *Oncotarget* 2017, **8**(25):40935-40945.
6. Narisawa-Saito M, Yoshimatsu Y, Ohno S, Yugawa T, Egawa N, Fujita M, Hirohashi S, Kiyono T: **An in vitro multistep carcinogenesis model for human cervical cancer**. *Cancer Res* 2008, **68**(14):5699-5705.
7. Yamazaki M, Hosokawa M, Arikawa K, Takahashi K, Sakanashi C, Yoda T, Matsunaga H, Takeyama H: **Effective microtissue RNA extraction coupled with Smart-seq2 for reproducible and robust spatial transcriptome analysis**. *Sci Rep* 2020, **10**(1):7083.
8. Yoda T, Hosokawa M, Takahashi K, Sakanashi C, Takeyama H, Kambara H: **Site-specific**

**gene expression analysis using an automated tissue micro-dissection punching system.** *Sci Rep* 2017, **7**(1):4325.

9. Cancer Genome Atlas Research N, Albert Einstein College of M, Analytical Biological S, Barretos Cancer H, Baylor College of M, Beckman Research Institute of City of H, Buck Institute for Research on A, Canada's Michael Smith Genome Sciences C, Harvard Medical S, Helen FGCC *et al*: **Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer.** *Nature* 2017, **543**(7645):378-384.
10. Chumduri C, Gurumurthy RK, Berger H, Dietrich O, Kumar N, Koster S, Brinkmann V, Hoffmann K, Drabkina M, Arampatzi P *et al*: **Opposing Wnt signals regulate cervical squamocolumnar homeostasis and emergence of metaplasia.** *Nat Cell Biol* 2021, **23**(2):184-197.