

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15598

研究課題名(和文)腫瘍内不均一性に基づいた抗がん剤耐性機構の打破

研究課題名(英文)Elucidating the mechanism of resistance to chemotherapy in gynecologic cancer based on intratumor heterogeneity

研究代表者

榎本 隆之(Enomoto, Takayuki)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：90283754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：対象を婦人科悪性腫瘍とし、臨床検体からスフェロイド培養を実施し、合計卵巣癌5例、子宮体癌4例、子宮頸癌1例、子宮癌肉腫1例のスフェロイド樹立に成功した。次に幹細胞形質に関与するSex-determining region Y-box 2 (SOX2) 遺伝子に注目し、子宮体癌細胞株を用いてSOX2の機能解析を行った。SOX2発現は子宮体癌細胞株の細胞増殖に強く関与しており、細胞周期調節に影響していた。SOX2発現は類内膜癌の悪性度及び予後と関連し、SOX2高発現 + p21低発現群では、統計学的に有意に予後不良であり、SOX2とp21が子宮体癌の予後分子マーカーになりうることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated total 11 spheroid cultures derived from gynecologic cancers. Before genomic analyses for spheroid cultures, we focused on Sex-determining region Y-box 2 (SOX2), which is an essential factor involved in the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells, to clarify the significance of SOX2 expression in endometrial cancer. SOX2 overexpression regulated the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A), and SOX2 specifically bound to p21 promoter DNA in endometrial cancer cell lines expressing SOX2. Expressions of SOX2 in endometrial cancer patients were significantly correlated with histological grade and poor prognosis. Moreover, low p21 together with high SOX2 expressions in advanced endometrial cancer patients were associated with the most unfavorable outcomes of patients. These results indicated that simultaneous measurement of SOX2 and p21 expression in endometrial cancer patients may be a useful biomarker for patient prognosis.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：intratumor heterogeneity cancer genome spheroid

1. 研究開始当初の背景

近年、多くの腫瘍で全エクソシーケンスやコピー数解析が行われるようになり、高悪性度漿液性卵巣癌では、TP53 変異や CCNE 増幅などの分子生物学的特徴が明らかにされた (TCGA, Nature 2011)。一方、同一患者において原発巣、浸潤/転移巣を含めた複数箇所から採取された検体 (マルチサンプリング) の網羅的遺伝子変異解析の結果、同一症例でありながらも遺伝子変異プロファイルは検体間で一部異なることが報告されている (Bashashati *et al.*, *J Pathol* 2013)。癌幹細胞や癌関連正常細胞は、癌組織内の不均一性に寄与するだけでなく、発癌、癌細胞の浸潤/転移、化学療法感受性といった癌の表現型に強く影響を与える因子であり、申請者らは、癌幹細胞や間質細胞の存在が予後と強い相関があることを明らかにしている (Yoshihara *et al.*, *Nat Commun* 2013)。また慢性リンパ球性白血病においてサブクローナルドライバー遺伝子変異の存在が予後と関連することが報告され (Landau *et al.*, *Cell* 2013)、ゲノム異常の腫瘍内不均一性を検討することにより、癌の病態解明につながる事が期待されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腫瘍内不均一性を考慮し、癌組織臨床検体から癌幹細胞、癌細胞、間質細胞を抽出し、個々の細胞の分子生物学的特徴を明らかにすることである。次に各細胞を特徴付ける遺伝子異常を同定し、その機能を解析することで、抗がん剤耐性メカニズムを解明することを目的とする

3. 研究の方法

(1) 臨床検体の層別化

新潟大学産婦人科において同意の得られた婦人科悪性腫瘍患者より提供された手術検体をスフェロイド培養用、Laser Capture Microdissection (LCM) 用に分割した。スフェロイド培養用の癌組織を collagenase / hyaluronidase にて酵素処理後、遠心分離法により卵巣癌細胞を分離し、最適化された培養条件下で、婦人科癌がんスフェロイド細胞の培養を行った (Ishiguro *et al.*, *Cancer Res* 2016)。

(2) 子宮体癌細胞株を用いた癌幹細胞の特性の検討

10種類の子宮体癌細胞株及び SOX2 発現のポジティブコントロールとして1種類のテラトカルシノーマ由来細胞株を準備し、siRNA による SOX2 遺伝子発現制御実験を行った。mRNA およびタンパク質発現変化に加え、細胞増殖・細胞周期・p21 プロモーター領域への結合能・*in vivo* での腫瘍形成能を評価項目とした。

(3) 子宮体癌臨床検体を用いた免疫組織染

色 2006 年から 2013 年までに新潟大学医歯学総合病院で手術を受けた子宮体癌 258 症例のパラフィンブロックを用いて、SOX2・p21・p53・Ki67 に対する抗体で ABC 法による免疫組織染色を行った。

4. 研究成果

(1) 新規スフェロイド細胞の樹立

研究期間内に、新潟大学医歯学総合病院で手術により摘出された婦人科悪性腫瘍検体を用いて、申請者らが開発した手法 (Cancer Res 2016) でスフェロイド細胞の樹立を行った。その結果、卵巣癌 5 例、子宮体癌 4 例、子宮頸癌 1 例、子宮癌肉腫 1 例のスフェロイド樹立に成功した。スフェロイド細胞を免疫不全マウスの皮下に注入し、腫瘍形成能を確認すると同時に、臨床検体と同様の組織像であることを確認した。樹立されたスフェロイドに対し、Lyoplate screening kit を用いて 250 種類以上の細胞表面抗原をスクリーニングし、いくつかの癌幹細胞マーカーの同定に成功している。

(2) 子宮体癌細胞株を用いた SOX2 の機能解析 SOX2 発現は子宮体癌細胞株の種類により、異なる発現パターンを示した。SOX2 は細胞質に比し、核内で強く発現していた (図 1)

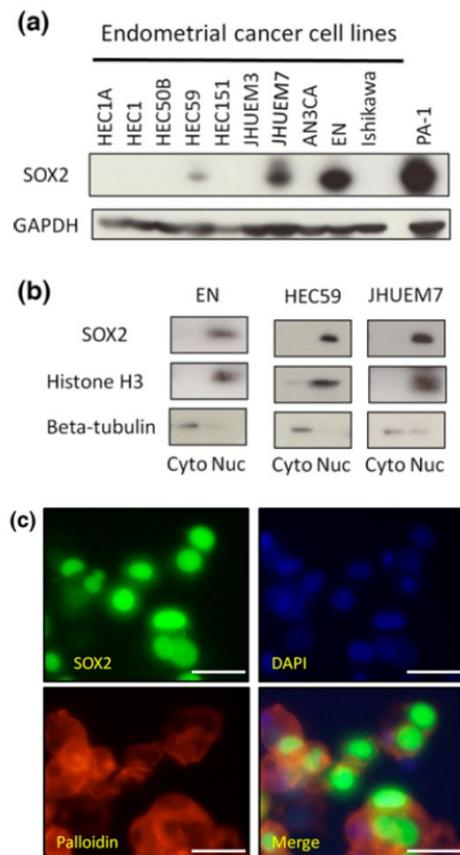


図 1. 子宮体癌細胞株における SOX2 発現

siRNA で SOX2 発現を抑制すると、SOX2 高発現子宮体癌細胞株の細胞増殖能は低下し、SOX2 発現が細胞増殖に強く関与しているこ

とを見出した。SOX2 ノックダウンにより細胞老化を起している所見も確認された。この結果は、SOX2 が p21 のプロモーター領域に結合することで、p21 発現を調整し、細胞周期に影響を与えていることと一致する所見であり、SOX2-p21 の関連が子宮体癌の細胞増殖に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。In vivo 実験系においても、SOX2 ノックダウン細胞株では、コントロール群に比し、腫瘍形成が抑制されることを確認した。

(3) SOX2 の分子マーカーとしての役割

子宮体部類内膜癌 258 症例について免疫組織染色で SOX2 及び p21 発現レベルを調べ、臨床病理学的特徴との関連を検討した。SOX2 陽性率は G1 で 8.9%、G2 で 18.4%、G3 で 64.0% と類内膜癌の悪性度と強い相関を認めた。また進行子宮体部類内膜癌では SOX 高発現群は低発現群に比し、無増悪生存期間・全生存期間ともに有意に短く、予後不良であった。さらに、SOX2 と p21 の発現パターンを組み合わせると、SOX2 高発現 + p21 低発現群では、統計学的に有意に予後不良であり、SOX2 と p21 が子宮体癌の予後分子マーカーになりうることを明らかになった。

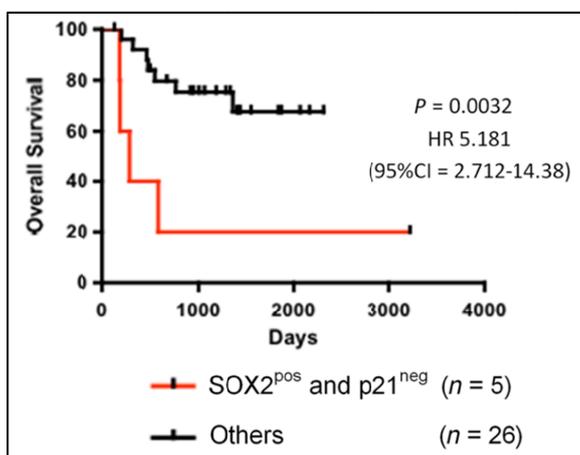


図 2. 進行子宮体癌における SOX2 と p21 発現パターンと予後との関連性

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

¹ Ishiguro, T., Sato, A., Ohata, H., Ikarashi, Y., Takahashi, R., Ochiya, T., Yoshida, M., Tsuda, H., Onda, T., Kato, T., Kasamatsu, T., Enomoto, T., Tanaka, K., Nakagama, H., Okamoto, K.: Establishment and Characterization of an In Vitro Model of Ovarian Cancer Stem-like Cells with an Enhanced Proliferative Capacity. Cancer Res., 査読有, 76 (1) : 150-160, 2016
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0361

² Sugiyama, T., Okamoto, A., Enomoto, T., Hamano, T., Aotani, E., Terao, Y., Suzuki N., Mikami, M., Yaegashi, N., Kato, K., Yoshikawa, H., Yokoyama, Y., Tanabe, H., Nishino, K., Nomura, H., Kim, J.W., Kim, B.G., Pignata, S., Alexandre, J., Green, J., Isonishi, S., Terauchi, F., Fujiwara, K., Aoki, D.: Randomized Phase III Trial of Irinotecan Plus Cisplatin Compared With Paclitaxel Plus Carboplatin As First-Line Chemotherapy for Ovarian Clear Cell Carcinoma: JGOG3017/GCIG Trial. J Clin Oncol., 査読有, 34 (24) : 2881-2887, 2016
DOI: 10.1200/JCO.2016.66.9010

³ Yoshino, K., Hosoi, A., Osuga, K., Enomoto, T., Ueda, Y., Sawada, K., Mabuchi S., Kobayashi, E., Matsuo, K., Kimura, T., : Single-dose intra-arterial neoadjuvant chemotherapy while waiting for radical hysterectomy for stage IB-IIIB cervical cancer. Mol Clin Oncol., 査読有, 4 (6) : 1068-1072, 2016
DOI: 10.3892/mco.2016.846

⁴ Matsuo, K., Cahoon, S.S., Yoshihara, K., Shida, M., Kakuda, M., Adachi, S., Moeini, A., Machida, H., Garcia-Sayre, J., Ueda, Y., Enomoto, T., et al.: Association of Low-Dose Aspirin and Survival of Women With Endometrial Cancer. Obstet Gynecol., 査読有, 128 (1) : 127-137, 2016
DOI: 10.1097/AOG.0000000000001491

⁵ Nakaoka, H., Gurumurthy, A., Hayano, T., Ahmadloo, S., Omer, W.H., Yoshihara, K., Yamamoto, A., Kurose, K., Enomoto, T., Akira, S., Hosomichi, K., Inoue, I.: Allelic Imbalance in Regulation of ANRIL through Chromatin Interaction at 9p21 Endometriosis Risk Locus. PLoS Genet, 査読有, 12 (4) : e1005893, 2016
DOI: 10.1371/journal.pgen.1005893

⁶ Murakami, R., Matsumura, N., Mandai, M., Yoshihara, K., Tanabe, H., Nakai, H., Yamanoi, K., Abiko, K., Yoshioka, Y., Hamanishi, J., Yamaguchi, K., Baba, T., Koshiyama, M., Enomoto, T., Okamoto, A., Murphy, S.K., Mori, S., Mikami, Y., Minamiguchi, S., Konishi, I.: Establishment of a Novel Histopathological Classification of High-Grade Serous Ovarian Carcinoma Correlated with Prognostically Distinct Gene Expression Subtypes. Am J Pathol., 査読有, 185 (5) : 1103-1113, 2016
DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.12.029

7 Hiramatsu, K., Yoshino, K., Serada, S., Yoshihara, K., Hori, Y., Fujimoto, M., Matsuzaki, S., Egawa-Takata, T., Kobayashi E., Ueda, Y., Morii, E., Enomoto, T., Naka T., Kimura, T.,: Similar protein expression profiles of ovarian and endometrial high-grade serous carcinomas., Br J Cancer., 査読有, 114(5):554-561, 2016
DOI:10.1038/bjc.2016.27.

8 Mabuchi, S., Isohashi, F., Yokoi, T., Takemura, M., Yoshino, K., Shiki, Y., Ito K., Enomoto, T., Ogawa, K., Kimura, T.,: A phase II study of postoperative concurrent carboplatin and paclitaxel combined with intensity-modulated pelvic radiotherapy followed by consolidation chemotherapy in surgically treated cervical cancer patients with positive pelvic lymph nodes., Gynecol Oncol., 査読有, 14(2):240-246, 2016
DOI:10.1016/j.ygyno.2016.02.011

9 Matsuo, K., Hasegawa, K., Yoshino, K., Murakami, R., Hisamatsu, T., Stone, RL., Previs, RA., Hansen, JM., Ikeda, Y., Miyara A., Hiramatsu, K., Enomoto, T., Fujiwara, K., Matsumura, N., Konishi, I., Roman, LD., Gabra, H., Fotopoulou, C., Sood, AK.,: Venous thromboembolism, interleukin-6 and survival outcomes in patients with advanced ovarian clear cell carcinoma., Eur J Cancer, 査読有, 51(14):1978-1988, 2016
DOI:10.1016/j.ejca.

10 Matsuo, K., Yoshino, K., Hasegawa, K., Murakami, R., Ikeda, Y., Adachi, S., Hiramatsu, K., Yokoyama, T., Nishimura, M., Sheridan, TB., Enomoto, T., Fujiwara, K., Matsumura, N., Konishi, I., Fotopoulou, C., Roman, LD., Sood, AK.,: Survival outcome of stage I ovarian clear cell carcinoma with lympho-vascular space invasion., Gynecol Oncol., 査読有, 136(2):198-204, 2016
DOI:10.1016/j.ygyno

11 Tamura, R., Yoshihara, K., Yamawaki, K., Suda, K., Ishiguro, T., Adachi, S., Okuda S., Inoue, I., Verhaak, RG., Enomoto, T.,: Novel kinase fusion transcripts found in endometrial cancer., Sci Rep, 査読有, 5:18657, 2015
DOI:10.1038/srep18657.

12 Hiramatsu, K., Serada, S., Kobiyama, K., Nakagawa, S., Morimoto, A., Matsuzaki, S., Ueda, Y., Fujimoto, M., Yoshino, K., Ishii, K., Enomoto, T., Kimura, T., Naka, T.,: CpG ODN potentiates the anti-tumor activity of anti-BST2 antibody., Cancer Science, 査読有, 106(10):474-482, 2015

DOI:10.1111/cas.12738.

13 Hayano, T., Yamada, S., Hosomichi, K., Yoshihara, K., Adachi, S., Kashima, K., Tanaka, K., and Enomoto, T., & Inoue, I.,: Identification of novel exonic mobile element insertions in epithelial ovarian cancers., Human Genome Variation, 2:15030, 2015
DOI:10.1038/hgv.2015.30.

〔学会発表〕(計 10 件)

1 田村亮、吉原弘祐、石黒竜也、榎本隆之、 Identification of therapeutically targetable FGFR-fusion genes in cervical cancer through RNA sequencing, 2017, 4, 14, 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会、広島県立総合体育館 外、(広島県、広島市)

2 田村亮、吉原弘祐、森裕太郎、山脇芳、須田一暎、石黒竜也、榎本隆之、 Identification of therapeutically targetable FGFR-fusion genes in cervical cancer through RNA sequencing, 2017, 4, 2, American Association of Cancer Research Annual Meeting 2017, Walter E Washington Convention Center, Washington DC, USA

3 榎本隆之、特別講演「子宮頸がんについての最近の話題」、2016, 11, 26, 第 4 回新潟市医師会総会 第 51 回新潟市医師会臨床懇話会総会、新潟東映ホテル、(新潟県、新潟市)

4 榎本隆之、教育講演「妊娠と子宮頸がん」、2016, 11, 12, 第 43 回日本産婦人科医会学術集会、万国津梁館、(沖縄県、名護市)

5 榎本隆之、要望講演「婦人科領域における分子標的治療の現況と将来」、2016, 9, 25, 第 42 回日本臨床細胞学会近畿連合会、ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター、(大阪府、大阪市)

6 森裕太郎、山脇芳、石黒竜也、吉原弘祐、榎本隆之、2016, 8, 19, 子宮体がんにおける幹細胞因子 Sox2 発現の意義、第 15 回日本婦人科がん分子標的研究会、ニューオータニイン札幌、(北海道、札幌市)

7 榎本隆之、特別講演「若年女性に対するがん治療と妊孕性温存」、2016, 1, 16, 新潟市産婦人科医会、新潟グランドホテル、(新潟県、新潟市)

8 Takayuki, Enomoto., Invited Lecture 「Clinical environment for Hereditary Gynecologic Cancer in Japan」, 2016, 1, 9, 韓国婦人科腫瘍学会、Samsung Medical Center, Korea, Seoul

⁹ Kosuke, Hiramatsu., Kiyoshi, Yoshino., Satoshi, Serada., Kosuke, Yoshihara., Minoru, Fujimoto., Yutaka, Ueda., Eiichi, Morii., Takayuki, Enomoto., Tetsuji, Naka., Tadashi, Kimura.: A proteomic analysis demonstrates similar expression pattern between ovarian and endometrial high-grade serous carcinoma beyond an organ., 2015, 6, 7, 24th Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynaecology, Borneo Convention Cancer, Malaysia, Kuching

¹⁰ 平松宏祐、檀本隆之、吉原弘祐、上田豊、吉野潔、森井英一、中哲治、木村正、卵巣および子宮体部の high-grade serous carcinoma の類似性の証明、2015, 4, 10, 第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檀本 隆之 (ENOMOTO, Takayuki)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：90283754

(2) 研究分担者

加嶋 克則 (KASHIMA, Katsunori)
新潟大学・医歯学総合病院・特任教授
研究者番号：50345500

関根 正幸 (SEKINE, Masayuki)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：70345502

吉原 弘祐 (YOSHIHARA, Kosuke)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：40547535

石黒 竜也 (ISHIGURO, Tatsuya)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：80625690

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし