

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15611

研究課題名(和文)子宮内膜症の悪性化、浸潤能、治療抵抗性における線維芽細胞の役割

研究課題名(英文)roles of fibroblasts in endometriosis for tumor transformation

研究代表者

北出 真理(KITADE, Mari)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：20266026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症は腫瘍類似性に播種・転移する進行性の疾患であり、時には癌化や不妊のみならず治療抵抗性をきたし難治性になることが知られている。申請研究では、子宮内膜症の病態解析や治療に役立てるために、8例の患者子宮内膜症サンプルを免疫不全マウスに移植した。結果と2例において肉腫様の病変が形成された。今後は、症例数を多くして、再現性の確認および、肉腫様の病変形成の意義の解明が必要である。

研究成果の概要(英文)：Endometriosis is a progressive disease that causes infertility and malignant transformation. In this study, we developed a mouse model for endometriosis by implantation of the affected tissues surgically dissected from totally 8 patients into immunodeficient mice. Sarcoma-like tumors were emerged in two out of eight patients.

研究分野：婦人科

キーワード：子宮内膜症 チョコレート嚢腫 疾患マウスモデル 線維芽細胞 癌化

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は病理学的には良性であるが、異所性に増殖や浸潤を繰り返し、腸管を介した転移例も報告されるなど、腫瘍類似の進展性を持つ。子宮内膜症の病態は卵巣チョコレート嚢胞や腹膜病変、ダグラス窩深部内膜症が主体であるが、時に消化管や泌尿器系臓器、胸腔にまで病巣が及ぶ場合もあり、周囲組織の炎症性変化や高度な線維化を惹起する。卵巣チョコレート嚢胞は卵巣機能低下や癌化のリスクが高く、深部子宮内膜症は強い疼痛の原因となり、治療抵抗性、再発・癌化が問題となるが、その治療効果は限られている。

子宮内膜症モデルマウスの多くは、マウス子宮を他のマウスに移植するアログラフトモデルが主流であり、外科的に切除された患者子宮内膜症病変部を免疫不全マウスに移植したジェノグラフトモデルの報告は極めて少ない。ヌードマウスなどの免疫不全マウスへのヒト組織の移植は、残存した一部の免疫細胞による拒絶が生じることにより、その生着率は低いことが文献的に知られている。これらの問題点を克服するために、申請者らは T、B および NK 免疫細胞を欠損した高度免疫不全 NOD/Shi-scid, IL-2R KO マウス (以下 NOG マウス) を用いることにより、外科的に切除された患者癌組織の生着率を著しく向上することに成功した実績がある。

線維化は炎症を惹起し、癌を含めた多くの疾患の発症母地として知られている。申請者らは、患者乳癌塊より癌微小環境に多数存在する筋線維芽細胞を豊富に含んだ線維芽細胞 carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) を抽出し、この細胞が stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) ケモカインと TGF- $\beta$  の autocrine signaling を獲得し、癌血管新生や癌細胞の増殖を顕著に促進することを明らかにした実績がある<sup>4</sup>。

これらの背景のもとに、申請研究では、子宮内膜症の悪性化における線維芽細胞の役割を分子レベルで明確にするために、外科的に患者より切除された患者子宮内膜症組織と線維芽細胞を NOG マウスに同所移植することにより活動性ヒト子宮内膜症モデルを樹立し、子宮内膜症の浸潤や薬剤耐性などの治療の開発に役立てるという着想に至った。

## 2. 研究の目的

重症の子宮内膜症は、腹腔内で増殖浸潤を繰

り返し、線維化を伴い周囲組織に腫瘍類似性に播種する。また、疼痛を伴った再発を繰り返す。また、不妊および癌化の原因になる。しかしながら、その発症機序に関しては未だ不明である。申請者らは、子宮内膜症病変に多数存在する線維芽細胞が、子宮内膜症の腹膜や卵巣への播種や治療抵抗性に寄与していると予測している。申請研究では、患者子宮内膜症マウスモデルを樹立し、線維芽細胞の役割を明らかにする。加えて、この患者子宮内膜症モデルを使用し、線維芽細胞を治療標的にすることにより、子宮内膜症の治療抵抗性や癌化などの治療の改善に役立てることを目標にする。

## 3. 研究の方法

子宮内膜症の再発や治療抵抗性などの問題点を克服できる社会実現の達成に向けて、申請研究では、子宮内膜症の悪性化における線維芽細胞の役割の解明を目指す。このゴールに向けて、次の目標 ~ を設定して戦略的にアプローチする。申請研究では、患者子宮内膜症マウスモデルを樹立する。また子宮内膜症由来線維芽細胞を抽出する。子宮内膜症悪性化および治療抵抗性における線維芽細胞の役割に関して研究する。以上より、患者子宮内膜症マウスモデルを使用して、線維芽細胞が子宮内膜症の浸潤や治療抵抗性に寄与する遺伝子やシグナルを同定することより、重症子宮内膜症の治療効果の高い治療法の実現化を目指した、架け橋の基礎研究を3ヵ年計画で試行する。

## 4. 研究成果

患者子宮内膜症のモデルマウスを作製するために、現在まで8例の患者より採集した子宮内膜症サンプルを各1~2匹の高度免疫不全 NOD/Shi-scid IL2 gamma null (NOG) mice に移植した。6例の患者より外科的に切除された卵巣チョコレート嚢胞 (遠隔転移した子宮内膜症) 組織 (5 mm<sup>3</sup>) を、マトリゲルやアテロコラーゲンと共にエストロゲンペレットが挿入されたマウスの皮下や腹腔内に移植した。この内1例で移植3か月後に直径1cm程度の腫瘍が皮下に形成された。また違う条件として2例の子宮内膜症組織を collagenase 処理にて single cell suspension の状態にして、Matrigel およびアテロコラーゲンと共に子宮壁に注入した。移植1年1か月後に直径0.5 mmの腫瘍が形成された。結果として、8例中2例で皮下で移植片の増大

がみられた。組織像は2例とも肉腫様の構造を呈していた。免疫組織学検討の結果、E-cadherin陰性、Pan-CK陰性、fibronectin陽性、 $\alpha$ -SMA陽性、Ki-67陽性のsarcomatousの腫瘍であることが示唆された。

予期していた子宮内膜細胞の増殖ではなく、sarcomatousな病変が得られた結果に対する考察は現在検討中である。sarcomatousな病変の進展速度より、癌細胞である可能性が高いが、今後は、ヒト特異的抗体での病変解析、ゲノム変異の解析等が必要である。恐らく、子宮内膜細胞を周囲のニッチとして作用する間葉系細胞が、高度免疫不全状態で何等かの原因で癌細胞化した可能性を推測している。

線維芽細胞の抽出も同時に施行したが、患者間での細胞の増殖が偏り、子宮内膜症やコントロールとなる正常線維芽細胞の樹立が困難であった。今後も継続した培養条件の検討が必要である。

#### 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)

- 論文: Ozaki R, Kuroda K, Ikemoto Y, Ochiai A, Matsumoto A, Kumakiri J, Kitade M, Itakura A, Muter J, Brosens JJ, Takeda S. Reprogramming of the retinoic acid pathway in decidualizing human endometrial stromal cells. *PLoS One*. 2017 ;12(3) (In Press) 査読有
- 論文: Hiroshi Tamura, Hiroshi Kishi, Mari Kitade, Mikiko Asai-Sato, Atsushi Tanaka, akashi Murakami, Takashi Minegishi, Norihiro Sugino. Clinical outcomes of infertility treatment for women with adenomyosis in Japan. *Reprod Med Biol*. 2017 (In Press) 査読有
- 論文: Ozaki R, Kumakiri J, Tinelli A, Grimbizis GF, Kitade M, Takeda S. Evaluation of factors predicting diminished ovarian reserve before and after laparoscopic cystectomy for ovarian endometriomas: a prospective cohort study. *J Ovarian Res*. 2016 ;9(1):37. 査読有
- 論文: Masuda A, Katoh N, Nakabayashi K, Kato K, Sonoda K, Kitade M, Takeda S, Hata K, Tomikawa J. An improved method for isolation of epithelial and stromal cells from the human endometrium. *J Reprod*. 2016 ;62(2):213-8. 査読有
- 論文: Kuroda K, Kitade M, Kumakiri J, et al. Minimum ovarian stimulation involving combined clomiphene citrate and estradiol treatment for in vitro fertilization of Bologna-criteria poor ovarian responders. *J Obstet Gynaecol Res*. 2016;42(2):178-83. 査読有
- Pernilla Roswall, Matteo Bocci, Michael Bartoschek, Hong Li, Glen Kristiansen, Sara Jansson, Sophie Lehn, Jonas Sjölund, Steven Reid, Christer Larsson, Pontus Eriksson, Charlotte Anderberg, Eliane Cortez, Lao H Saal, Christina Orsmark-Pietras, Eugenia Cordero, B Kristian Haller, Jari Häkkinen, Ingrid JG Burvenich, Elgene Lim, Akira Orimo, Mattias Höglund, Lisa Rydén, Holger Moch, Andrew M Scott, Ulf Eriksson, Kristian Pietras, Microenvironmental control of breast cancer subtype elicited by paracrine platelet derived growth factor-CC signaling., *Nat. Med*. 2018 Mar 12. doi: 10.1038/nm.4494
- Tomokatsu Omoto, Joo-ri Kim-Kaneyama, Xiao-Feng Lei, Akira Orimo, Koji Ohnishi, Kosuke Yoshihara, Aya Miyauchi, Shuo Li, Lin Gao, Takahiro Umemoto, Junichi Tanaka, Kenta Nakahara, Motohiro Takeya, Fumio Ishida, Shin-ei Kudo, Shogo Haraguchi, Takuro Miyazaki and Akira Miyazaki., The impact of stromal Hic-5 on the tumorigenesis of colorectal cancer through lysyl oxidase induction and stromal remodeling. *Oncogene*, 2017, Dec 15. doi: 10.1038/s41388-017-0033-y
- Nakaoka HJ, Tanei Z, Hara T, Weng JS, Kanamori A, Hayashi T, Sato H, Orimo A, Otsuji K, Tada K, Morikawa T, Sasaki T, Fukayama M, Seiki M, Murakami Y, Sakamoto T. Mint3-mediated L1CAM expression in fibroblasts promotes cancer cell proliferation via integrin

- 5 1 and tumour growth. *Oncogenesis*. 2017, 6(5):e334
9. Namba Y, Togo S, Tulafu M, Kadoya K, Nagahama KY, Taka H, Kaga N, **Orimo A**, Liu X, Takahashi K. Combination of glycopyrronium and indacaterol inhibits carbachol-induced ERK5 signal in fibrotic processes. *Respir Res*. 2017, 18, 46.
  10. Escudero-Esparza A., Bartoschek M., Gialeli C., Okroj M., Owen S., Jirström K., **Orimo A.**, Jiang WG., Pietras K., Blom AM., (2016) Complement inhibitor CSMD1 acts as tumor suppressor in human breast cancer. *Oncotarget*, 2016, 7, 76920-76933
  11. Mezawa, Y. and **Orimo A\***, The roles of tumor- and metastasis-promoting carcinoma-associated fibroblasts in human carcinomas. *Cell and tissue research*, (2016), *Cell Tissue Res*, 365, 675-89.doi: 10.1007/s00441-016-2471-1.
  12. Englund E, Bartoschek M, Reitsma B, Jacobsson L, Escudero-Esparza A, **Orimo A**, Leandersson K, Hagerling C, Aspberg A, Storm P, Okroj M, Mulder H, Jirström K, Pietras K, Blom AM. (2016) Cartilage oligomeric matrix protein contributes to the development and metastasis of breast cancer. *Oncogene*. 235, 5585-5596 doi: 10.1038/onc.2016.98
  13. Holmquist E., Reitsma B., King B., Escudero-Esparza Sioned Owen A., **Orimo A.**, Okroj M., Anagnostaki L., Jiang W., Jirström K., Blom A., The human complement inhibitor Sushi Domain-Containing Protein 4 (SUSD4) expression in tumor cells and CD8+ T cells is associated with better prognosis of breast cancer patients. *BMC Cancer*, (2015) 19, 737.
- [学会発表](計10件)
1. 招請講演：**Kitade M.** Optimal Management in DIE Surgical Management and Pathological Findings for DIE and CRE (Colorectal Endometriosis). International Annual Conference on The Asia-Pacific Association for Gynecologic Endoscopy and Minimally Invasive Therapy (APAGE), 2015.
  2. 招待講演：ワークショップ講演 乳癌内線維芽細胞と癌浸潤・転移 **折茂 彰**、伊藤 恭彦、目澤 義弘、Kaidiliavi Sulidan、Nadila Wali、竹田 省、奥村 康、竹田 和由、樋野 興夫、浜田 道昭、松村 優子 第27回日本癌病態治療研究会 6月1日2018年 千葉
  3. 講演：患者大腸癌由来 PDX およびオルガノイドを使用した転移モデルの樹立 水越幸輔,岡澤 裕,小山 侑,大久保 捷奇, Kaidiliavi Sulidan, 伊藤恭彦, 小見山博光, 小島 豊, 五藤倫敏, 垣生園子, 樋野興夫, **折茂 彰**, 坂本一博 第28回 日本消化器癌発生学会総会 2017年11月17日(金) ~ 18日(土) 熊本
  4. English oral presentation: CAFs boost mammary cancer invasion and metastasis via formation of the epithelial and mesenchymal tumor cell cluster. **Akira Orimo**, Yasuhiko Ito, Yoshihiro Mezawa, Kaidiliavi Sulidan, Nadila Wali1, Okio Hino, Kazuyoshi Takeda, Michiaki Hamada, Yuko Matsumura 第76回日本癌学会学術総会 9月28-30日2017年横浜
  5. 講演：中間型上皮間葉移行による患者大腸癌細胞クラスターの転移への寄与 岡澤 裕, 水越幸輔, 大久保 捷奇, Kaidiliavi Sulidan, 小山 侑, 小島 豊, 五藤倫敏, **折茂 彰**, 坂本一博 第72回日本消化器外科学会総会 7月20日~22日2017年 金沢
  6. 招待講演：**折茂 彰** [2PS13-5] 癌内線維芽細胞による癌悪性化機構 [2PS13] シンポジウム：生体现象における上皮-間葉細胞間相互作用 2016年12月1日(木) 13:00 ~ 15:15 オーガナイザー：斉藤 正夫(山梨大学)、Guojun Sheng(熊本大学・IRCMS) 第39回日本分子生物学会年会 横浜
  7. English oral presentation, **Akira Orimo**, Nadila Wali, Yasuhiko Ito, Okio Hino, Kazuyoshi Takeda, Michiaki Hamada, Yuko Matsumura, CAFs boost mammary cancer metastasis via increasing the cell-cell adhesion 第75回日本癌学会学術総会 10月8日2016年横浜
  8. 招待講演；水越幸輔、岡澤裕、波江野洋、大久保捷奇、小見山博光、佐伯春

美、大辻奈穂美、伊藤恭彦、小島豊、  
五藤倫敏、垣生園子、樋野興夫、坂本  
一博、**折茂 彰**

部分的上皮間葉移行を呈した患者由来大腸癌細胞クラスターの転移への寄与 第31回発癌病理研究会 長野 8月25日 2016年

9. 招待講演 ; Carcinoma-associated fibroblasts confer adherent epithelial cell traits in breast cancer cells to promote metastasis **Akira Orimo**. シンポジウム **がんの浸潤・転移メカニズムの解明と治療標的** 第75回日本癌学会学術総会 名古屋、10月8日 2015年
10. Poster presentation, Carcinoma-associated fibroblasts raise highly metastatic human breast cancer cells via an autocrine signaling loop mediated by CEACAM5 and CEACAM6-Src., Yuko Matsumura<sup>1,2)</sup>, Yasuhiko Ito<sup>1)</sup>, Nadila Wali<sup>1)</sup>, Takumi Ito<sup>1)</sup>, Kaoru Mogushi<sup>4)</sup>, Yasuhisa Terao<sup>2)</sup>, Satoru Takeda<sup>2)</sup>, Ko Okumura<sup>3)</sup>, Kazuyoshi Takeda<sup>3)</sup>, Okio Hino<sup>1)</sup>, and **Akira Orimo**<sup>1)</sup> 第75回日本癌学会学術総会 名古屋、10月9日 2015年

〔図書〕(計2件)

1. 総説：**北出真理**. 【子宮内膜症の薬物療法】若年女性の子宮内膜症治療 手術療法も含めて. 最新女性医療 2015; 2(2):66-73 査読なし
2. 総説：**北出 真理**, 熊切 順, 菊地 盤, 黒田 恵司 地主 誠, 青木 洋一, 尾崎 理恵, 竹田 省. 子宮内膜症に対する手術療法と薬物療法のコンビネーション ライフステージを考慮した治療方針 . 日本エンドメトリオーシス会誌 2014 ; 35 : 98 査読なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

北出真理・順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号：20266026

(2)研究分担者

折茂 彰・順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70275866