

令和元年6月28日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11165

研究課題名(和文) GPIアンカー型蛋白質(CD24)のラフト形成と化学療法抵抗性のメカニズム解析

研究課題名(英文) Analysis of lipid raft via CD24 and drug resistance in gynecologic cancer

研究代表者

田中 良道(Tanaka, Yoshimichi)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：10625502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：婦人科悪性腫瘍(卵巣癌、子宮内膜癌)において、GPIアンカー型タンパク質であるCD24が上皮間葉系転換や化学療法抵抗性、予後と強く相関していることを見出した。また子宮内膜癌においてCD24は細胞膜上でlipid raftを形成し、pMETをリクルートすることで細胞内へシグナルを伝達し、PI3K/Akt経路、MAPK経路を活性化させている。また薬剤耐性関連因子であるABCトランスポーターの発現を上昇させ化学療法抵抗性を獲得していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

婦人科悪性腫瘍(卵巣癌、子宮内膜癌)において、細胞膜上に存在するGPIアンカー型タンパク質であるCD24の発現上昇が上皮間葉系転換や化学療法抵抗性、予後と強く相関していることを見出した。またCD24がいかんして化学療法抵抗性を獲得しているかを解明した。本経路を阻害することができれば化学療法抵抗性を解除し、治療成績の向上へとつなげることが可能となる。今までとは異なる機序での治療につながることから本研究結果は有意なものであると考える。

研究成果の概要(英文)：CD24 has been reported to be a marker for a poor prognosis in several tumors, and we herein examined the functions of CD24 in human endometrioid adenocarcinoma cell lines and evaluated how it contributes to cancer drug resistance. We demonstrated that CD24 was responsible for the recruitment of phosphorylated Met to the lipid raft domain of the cell membrane, resulting in amplification of the Met signaling cascade, ultimately leading endometrial cancer cells to express higher levels of ATP-binding cassette (ABC) transporters. Our findings suggest that CD24-mediated amplification of the Met cascade may contribute to the drug resistance of endometrial cancer. Moreover, the expression of CD24 was an independent predictor of survival in patients with ovarian cancer. Our findings suggest that CD24 induced the EMT phenomenon in ovarian cancer, and that CD24 amplified cell growth-related intracellular signaling via the PI3K/Akt and MAPK pathways by affecting the EMT signal pathways.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：CD24 EMT lipid raft 化学療法抵抗性 卵巣癌 子宮内膜癌 MET

## 様式 F - 19 - 2

### 1. 研究開始当初の背景

婦人科癌の中でも白金製剤抵抗性卵巣癌や type2 子宮内膜癌（類内膜腺癌 G3 や漿液性腺癌、明細胞腺癌など）は予後が著しく悪いが、その原因として癌の浸潤・転移能の高さや化学療法抵抗性がある。我々は従来より婦人科癌の浸潤・転移の制御や化学療法抵抗性癌の治療に向けた研究に注目してきた。卵巣癌において、生存シグナルである ERK 経路と Akt 経路およびその下流の転写因子 Nuclear Factor B (NF B) が白金製剤の耐性に関わる重要な分子であることを明らかにし、さらに Akt の活性化が重要な予後因子であることを臨床病理学的にも確かめ、白金製剤の耐性化に関与する Akt および ERK 両経路をブロックすると、卵巣癌の白金製剤への耐性が解除され感受性が高まることにより転移病巣や再発病巣での治療効果が上がることを明らかにしてきた。さらに近年癌細胞の浸潤・転移過程において上皮間葉形態転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) が注目されているが、この EMT 現象が子宮内膜癌において重要な予後因子となる事を報告した。また EMT を起こす細胞は強い自己複製能と腫瘍形成能を有し薬剤に耐性を示すことが明らかとなりつつあるが、我々は EMT の有用な表面マーカーとして、乳癌、膵臓癌で癌幹細胞のマーカーとしても注目されている CD24 に着目してきた。CD24 は分子量 35-45kDa のグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカー型シアロ糖タンパクで、細胞表面に存在しさまざまな癌種で過剰発現が予後悪化因子であると報告されている。我々は子宮内膜癌において CD24 高発現が組織型や分化度、予後と有意に相関する事や、EMT を介した浸潤・転移と相関していることを明らかにした。しかしながら CD24 発現と化学療法抵抗性や癌幹細胞との関連を示唆する報告はみられるもののその機序は全く不明である。GPI アンカー型蛋白質は細胞膜の外側に存在するため、このような蛋白質がどのような役割を担っているのかは長らく不明であった。近年の研究から GPI アンカー型蛋白質にリガンドが結合するとオンデマンドで細胞膜上に lipid raft が形成され、この raft に細胞質内のシグナル分子がリクルートされる事が徐々に明らかとなってきた。そこで GPI アンカー型蛋白質である CD24 の lipid raft 形成と、そこでリクルートされる細胞内シグナル分子を同定できれば化学療法抵抗性のメカニズムの一旦を解明できると考え本研究を計画した。

### 2. 研究の目的

婦人科悪性腫瘍において、GPI アンカー型蛋白質の一つである CD24 発現が癌の浸潤・転移や EMT(上皮間葉転換)現象、化学療法抵抗性と強く相関していることを報告してきた。しかし GPI アンカー型蛋白質はラフト形成を通してシグナルを細胞内へ伝達している事が徐々に明らかとなっているもののその機序は未だに不明である。そこで GPI アンカー型蛋白質(CD24)のラフト形成とそこでリクルートされる細胞内シグナル分子を同定し化学療法抵抗性のメカニズムの一旦を明らかにする事を本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 子宮内膜癌細胞株 HEC1A、HEC108 を用いて CD24 を指標に MACS 法を用いて CD24 陽性細胞と CD24 陰性細胞を分離後、それぞれの細胞から RNA または蛋白を抽出し、薬剤耐性関連蛋白質 (MDR、MRP、BCRP) の発現を mRNA レベルは Quantitative PCR、蛋白発現は Western Blotting 法にて解析した。

(2) (1) で分離した CD24 陽性細胞と CD24 陰性細胞における HGF/MET 経路、PI3K/Akt 経路、MAPK 経路の活性化の差を検討するためそれぞれの細胞から蛋白を抽出し、pMET、pAkt、pERK の蛋白発現を Western Blotting 法にて解析した。

(3) Lipid raft の解析方法としてシヨ糖濃度勾配遠心法 (sucrose gradient assay) を使用した。CD24 発現ベクターを作成し Lipofectamine 法を用いて子宮内膜癌細胞株(HEC1A、HEC108) に CD24 強制発現細胞と空ベクター導入細胞を準備する。10cm ディッシュで培養後細胞を採取し、250 mmol/L のシヨ糖を含む buffer と混合しインキュベートする。その後 Lysate 1ml を超遠心用チューブの中で 67.5%シヨ糖を溶かした STE buffer と混合し、その上に 20%から 5%までのシヨ糖を加え、4、100,000×g で 16 時間の超遠心を行う。遠心後、上清から 1ml ずつ採取し、得られた各フラクションを Laemmli sample buffer に容解し、95 で 5 分間熱処理を行いウェスタンブロットング用のサンプルとする。1 次抗体として pMET、CD24 を反応させ各フラクションでの発現量を検出する。Lipid raft 内における CD24 と pMET のリクルートメントについての評価を行った。

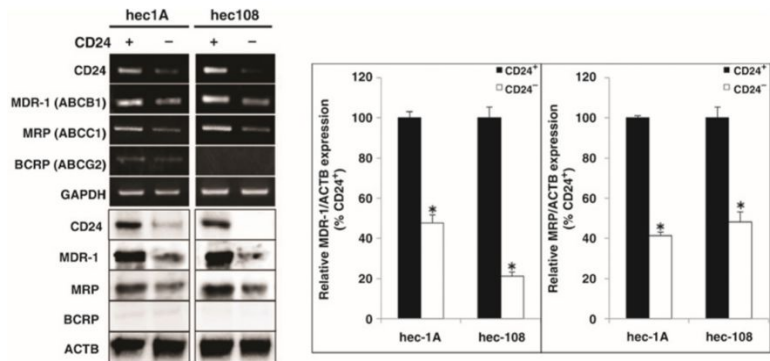
(4) 卵巣癌 174 例のパラフィン切片から組織マイクロアレイ標本を作製し、CD24 発現を検出すべく免疫染色を施行した。各症例の CD24 発現と臨床病理学的因子や予後との関連性の解析を行った。

(5) 卵巣癌細胞株 (Caov-3) を用いて CD24 強制発現細胞を作成後、細胞から RNA を抽出し、EMT 関連因子 (E-cadherin、Snail) の mRNA レベルを Quantitative PCR で解析した。また CD24 強制発現細胞の形態を control と比較観察した。

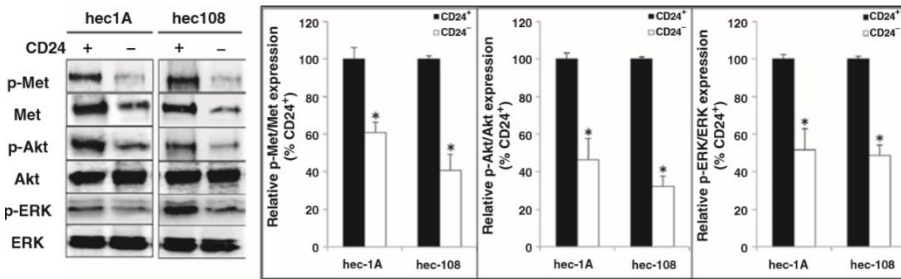
(6) 卵巣癌細胞株 (Caov-3) を用いて CD24 強制発現細胞を作成し、EMT 誘導因子である TGF- $\alpha$  を添加し、PI3K/Akt 経路、MAPK 経路の活性化を空ベクター導入細胞と比較検討した。それぞれの細胞から蛋白を抽出し、pAkt、pERK の発現を Western Blotting 法にて解析した。

#### 4. 研究成果

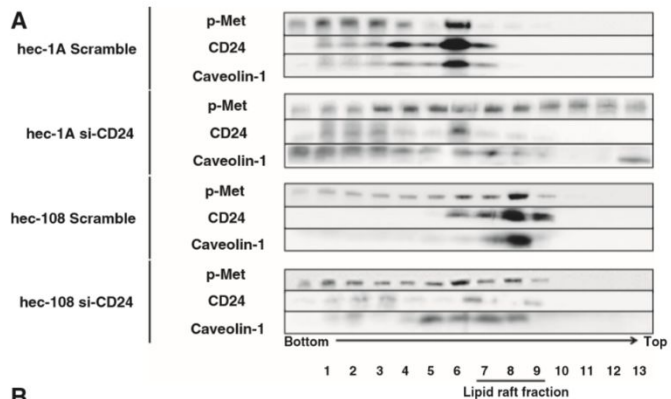
(1) 子宮内膜癌細胞株 HEC1A、HEC108 において、CD24 陽性細胞では陰性細胞と比較して、薬剤耐性関連蛋白質 (MDR、MRP、BCRP) の発現が mRNA レベル、蛋白レベルいずれにおいても高かった。このことから CD24 陽性細胞は陰性細胞と比して化学療法抵抗性であることが示唆された。



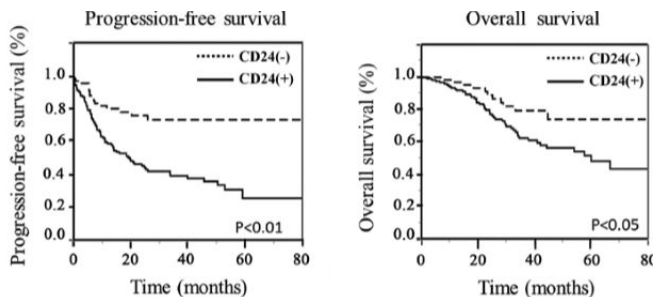
(2) 子宮内膜癌細胞株 HEC1A、HEC108 において、CD24 陽性細胞では陰性細胞と比較して、pMET、pAkt、pERK の発現が蛋白レベルで高かった。このことから CD24 陽性細胞は陰性細胞と比して増殖、生存シグナルが活性化していることが示唆された。



(3) Lipid raft 分画において、CD24 が pMET をリクルートしていることが示唆された。上記 (1) (2) の結果と合わせ、CD24 が pMET をリクルートし、PI3K/Akt 経路、MAPK 経路の活性化、また薬剤耐性関連因子の高発現を誘導していることが示唆された。

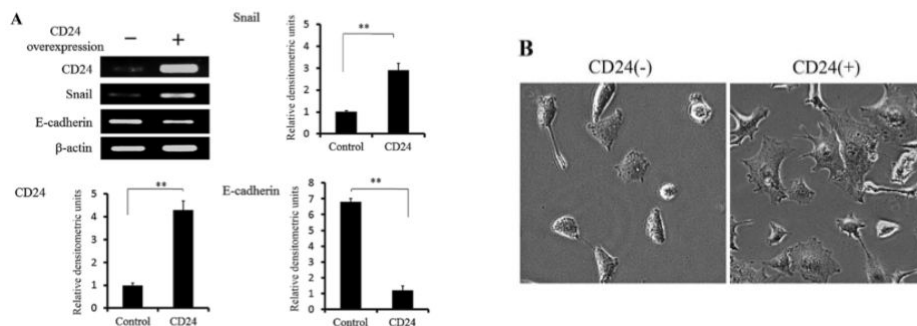


(4) 卵巣癌における CD24 の高発現は、組織型、進行期、腹膜播種、リンパ節転移、無増悪生存期間、全生存期間と相関関係を示した。

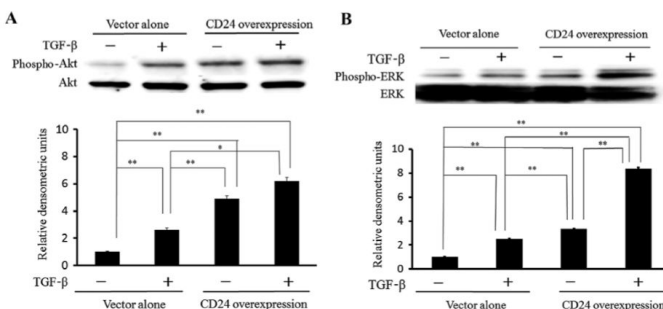


Variables	CD24		P-value
	Negative	Positive	
Age, years			0.18
<50	18 (37.5)	30 (62.5)	
≥50	34 (27.0)	92 (73.0)	
Histology			<0.01
Serous adenocarcinoma	6 (12.5)	42 (87.5)	
Mucinous adenocarcinoma	13 (61.9)	8 (38.1)	
Clear cell adenocarcinoma	12 (37.5)	20 (62.5)	
Endometrioid adenocarcinoma	13 (40.6)	19 (59.4)	
SSPCs	4 (15.4)	22 (84.6)	
Others	4 (26.6)	11 (73.4)	
Stage			<0.001
I	26 (46.4)	30 (53.6)	
II	3 (21.4)	11 (78.6)	
III	19 (22.3)	66 (77.7)	
IV	4 (21.0)	15 (79.0)	
Peritoneal cytology			0.75
Positive	38 (29.2)	92 (70.8)	
Negative	14 (31.8)	30 (68.1)	
Dissemination			<0.01
Positive	20 (21.3)	74 (78.7)	
Negative	32 (40.0)	48 (60.0)	
Lymph node metastasis			<0.01
Positive	4 (12.1)	29 (87.9)	
Negative	35 (39.3)	54 (60.7)	
Recurrence			<0.01
Positive	18 (19.1)	76 (80.9)	
Negative	34 (42.5)	46 (57.5)	
Died or survived			0.02
Died	11 (18.6)	48 (81.4)	
Survived	41 (35.7)	74 (64.3)	

(5) 卵巣癌細胞株 (Caov-3) に CD24 を強制発現させると、EMT 関連因子である Snail の発現の亢進、E-cadherin の減弱がみられた。また形態学的には紡錘形細胞の出現頻度が増加した。



(6) 卵巣癌細胞株 (Caov-3) に CD24 を強制発現させ、EMT 誘導因子である TGF- $\beta$  を添加すると Akt のリン酸化、ERK のリン酸化がみられたが、これは空ベクター導入細胞と比較すると有意に亢進していた。



## 5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

### [雑誌論文](計3件)

Kogata Y, Tanaka T, Ono YJ, Hayashi M, Terai Y, Ohmichi M. Foretinib (GSK1363089) induces p53-dependent apoptosis in endometrial cancer. 査読有、9、2017、22769-22784 doi: 10.18632/oncotarget.25232.

Tanaka T, Terai Y, Ashihara K, Fujiwara S, Tanaka Y, Sasaki H, Tsunetoh S, Ohmichi M. The efficacy of the cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor in endometrial cancer. PLoS One. 査読有、12、2017、e0177019 doi: 10.1371/journal.pone.0177019.

Nakamura K, Terai Y, Tanabe A, Ono YJ, Hayashi M, Maeda K, Fujiwara S, Ashihara K, Nakamura M, Tanaka Y, Tanaka T, Tsunetoh S, Sasaki H, Ohmichi M. CD24 expression is a marker for predicting clinical outcome and regulates the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer via both the Akt and ERK pathways. Oncol Rep. 査読有、37、2017、3189-3200 doi: 10.3892/or.2017.5583.

### [学会発表](計8件)

田中良道、分娩後1年以内の子宮頸部円錐切除症例の後方視的解析、日本産婦人科学会、2018

田中良道、当院における腹腔鏡下広汎子宮全摘出術と開腹広汎子宮全摘出術の検討、日本婦人科内視鏡学会、2018

田中良道、An association between the progression of cervical precursor lesion and human papilloma virus genotype. IGCS、2018

田中良道、子宮頸部初期病変のHPV型と病変進展リスクについて、日本婦人科腫瘍学会、2017

田中良道、子宮内膜癌、子宮内膜異型増殖症に対するMPA療法の治療成績、日本産婦人科学会、2017

田中良道、子宮筋腫に対する筋腫核出術を併用した腹腔鏡下単純子宮全摘出術の検討、日本婦人科内視鏡学会、2017

田中良道、子宮頸部初期病変円錐切除後の再発症例の後方視的検討、日本癌治療学会、2016

田中良道、子宮頸部初期病変の細胞診・組織診不一致症例の解析、日本臨床細胞学会、2016

### [図書](計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕  
ホームページ等 該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：林 正美  
ローマ字氏名：(HAYASHI, masami)  
所属研究機関名：大阪医科大学  
部局名：医学部  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：00551748

研究分担者氏名：大道 正英  
ローマ字氏名：(OHMICHII, masahide)  
所属研究機関名：大阪医科大学  
部局名：医学部  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：10283764

研究分担者氏名：恒遠 啓示  
ローマ字氏名：(TSUNETOH, satoshi)  
所属研究機関名：大阪医科大学  
部局名：医学部  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：70388255

研究分担者氏名：田辺 晃子  
ローマ字氏名：(TANABE, akiko)  
所属研究機関名：大阪医科大学  
部局名：医学部  
職名：非常勤講師  
研究者番号（8桁）：70454543

研究分担者氏名：佐々木 浩  
ローマ字氏名：(SASAKI, hiroshi)  
所属研究機関名：大阪医科大学  
部局名：医学部  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：80432491

研究分担者氏名：寺井 義人  
ローマ字氏名：(TERAI, yoshito)  
所属研究機関名：大阪医科大学  
部局名：医学部  
職名：非常勤講師  
研究者番号（8桁）：90278531

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。