

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(A)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18689040
 研究課題名（和文） 上皮間葉転換に基づく細胞膜型ペプチド分解酵素を分子標的とした卵巢癌腹膜転移の抑制
 研究課題名（英文） Inhibition of peritoneal metastasis in ovarian cancer targeting cell-surface peptidases based on the concept of Epithelial-mesenchymal transition (EMT)
 研究代表者
 梶山 広明 (Kajiyama Hiroaki)
 名古屋大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：00345886

研究成果の概要：

上皮性卵巢癌は解剖学的な特性から早期から腹膜転移を起こしやすく、婦人科悪性腫瘍の中でも最も予後不良ながん種である。本研究では解剖学的見地とは別に腹膜転移を起こす仕組みを2種類の細胞膜型ペプチド分解酵素に着目することにより詳細なる検討を行った。これには細胞形態のダイナミックな変化や抗癌剤への耐性も絡んだ緻密なメカニズムが存在していた。さらに、これら2種類の細胞表面ペプチド分解酵素をターゲットとした卵巢癌における薬剤耐性克服と腹膜転移抑制を主眼とする新規治療法開発の可能性が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	13,500,000	4,050,000	17,550,000
2007年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
総計	21,800,000	6,540,000	28,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：卵巢癌，腹膜播種，転移・浸潤，抗癌剤耐性，タキソール，細胞膜型ペプチド分解酵素，上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

卵巢癌は早期診断が困難でかつ腹膜転移を起こしやすいため、婦人科悪性腫瘍の中でもとりわけ予後不良ながん種である。現在、卵巢癌の治療法において、手術療法，化学療法を中心とした集学的治療が行われているが大半の症例で腹膜播種を起こすため長期予後は依然として不良である。手術で病変を除去することが重要なことは言うまでもな

いが、実際には抗がん剤を中心とした化学療法に依存しているのが現状である。この場合、初めは抗がん剤によく奏功した癌でも再発・再燃が起きると徐々に治療抵抗性となることが多い。従って腹膜転移を抑制し、さらに抗がん剤の耐性を克服することが卵巢癌の予後改善に重要なテーマである。

2. 研究の目的

これまで我々はこれまでいくつかの細

胞膜型ペプチド分解酵素に着目し、特に卵巣癌の進展に如何に関与しているかについて研究を行ってきた。細胞膜型アミノペプチダーゼは細胞表面というまさに細胞の水際に存在しており、種々の増殖因子やサイトカインを基質とし、それらを細胞外で代謝、分解し細胞に対するそれらの影響を負に制御するといわれている。

またその多くはリンパ球の分化抗原 (CD) の一つであることが同定されており酵素活性とは独立して細胞内シグナル伝達などに関与しているとの報告も存在している。

通常、細胞が浸潤能を獲得するときには上皮細胞形態から線維芽細胞様形態へと変化する上皮・間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) という現象が生じることが知られている。予備研究では興味深いことに、CD26 と CD13 は同じ細胞膜型ペプチド分解酵素でありながら EMT とリンクする細胞形態、細胞骨格、及び浸潤性の獲得の点で全く正反対の機能を有していた。

本研究の目的は EMT の視点から 2 種の細胞膜型ペプチド分解酵素 (CD13/CD26) に焦点をあて卵巣癌の腹膜播種抑制と薬剤感受性増強のメカニズムを探求することである。

3. 研究の方法

本研究は以下の項目を中心に *in vitro* 及び *in vivo* の両系において検討を行った。

- (1) 卵巣癌における CD13/CD26 の発現解析
- (2) 卵巣癌における CD13/CD26 の機能解析
- (3) CD13/CD26 発現パターンによって、卵巣癌細胞は CD13^{high}CD26^{low} 発現タイプか、あるいは CD13^{low}CD26^{high} 発現タイプに大別できることを予備研究で示した。ここから CD13^{high}CD26^{low} 型細胞への CD26 を過剰発現、あるいは CD13 のノックダウンによって生じる細胞機能的変化の検討。さらに互いの発現に与える影響の検討。
- (4) 上記 (3) の系において EMT 誘導性、あるいは EMT 誘導転写因子発現に与える検討。
- (5) 抗がん剤感受性卵巣癌あるいは抗がん剤耐性卵巣癌における CD13/CD26 の発現解析
- (6) 抗がん剤獲得耐性卵巣癌における CD13/CD26 の発現解析
- (7) 上記 (5) (6) において CD13 発現抑制や CD26 再発現が抗がん剤感受性に与える影響。
- (8) さらに CD26 の腹膜進展抑制のメカニズムを基質制御の観点から探求した。すなわち、CD26 の酵素的標的である SDF-1a とその特異的受容体である CXCR4 の果たす卵巣癌細胞の腹膜進展作用についての基礎的検討を行った。

4. 研究成果

これまでに本研究で得られた新しい知見を以下に簡単に示す。

(1) 卵巣癌において CD13 の発現と CD26 の発現は負の相関にあり、CD13^{low}CD26^{high} は低転移性/薬剤感受性、対照的に CD13^{high}CD26^{low} は高転移性/薬剤耐性ときわめて密接にリンクしていた。

(2) 癌が転移を起こす時、すなわち EMT が誘導され “metastatic potential” を獲得するときに CD13^{low}CD26^{high}⇒CD13^{high}CD26^{low} への発現シフトが生じた。この経路を例えば CD13 を阻害剤 bestatin や RNA-i で抑制すると CD26 が誘導され低転移性/薬剤感受性へと傾くという結果を得た。

(3) CD13^{low}CD26^{high}⇒CD13^{high}CD26^{low} の発現変化には上皮間葉転換誘導転写因子 TWIST の誘導を介した系が存在していた。

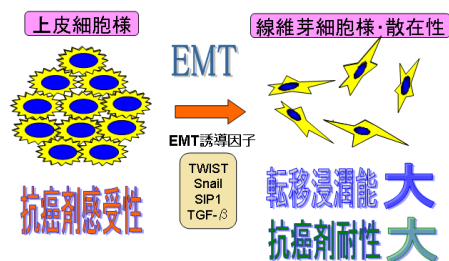
(4) 再発癌のような抗がん剤の獲得耐性癌でも CD13^{low}CD26^{high}⇒CD13^{high}CD26^{low} へと発現シフトしているのが感受性減少の一因であることが判明した。またこれを bestatin によって阻害することが薬剤への再感受性亢進に寄与した。

(5) さらに CD13^{high}CD26^{low} タイプの子宮頸癌細胞株において CD13 の阻害剤の投与が *in vivo* での放射線感受性を亢進させた。

(6) CD26 の基質である SDF-1a は腹膜中皮側に有意に発現していた。またそのレセプターである CXCR4 は卵巣癌細胞と腹膜中皮の両者に発現していた。

(7) CXCR4 の antagonist (AMD3100) の添加によって卵巣癌細胞の遊走能だけでなく腹膜中皮との接着能も有意に減少した。

(8) マウス腹膜播種モデルにおいて antagonist の腹腔内投与が播種形成抑制に寄与した。この結果から CD26 の転移抑制作用の一つが腹膜播種に促進的な役割を担う SDF-1a の分解に伴う不活化の可能性が示唆された。



上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) によって転移浸潤能や抗癌剤耐性は亢進する

以上によって CD26 と CD13 は様々な細胞で EMT に関連しながら密接にリンクしており、

お互いにネガティブなクロストーク機序が存在していることが想定される。以上、卵巣癌細胞における細胞膜型ペプチド分解酵素を通じた知見を一般化すると、卵巣癌細胞におけるEMTが腹膜播種形成能や抗癌剤感受性に互いにリンクしながら多大な影響を及ぼしていると考えられた(図)。

さらに、CD13/CD26バランスを直接的あるいは間接的にbestatinやAMD3100などの薬剤で調整することによって転移抑制や薬剤感受性増強に結びつくという治療応用への方向性を見いだすことができた。

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14件)

以下すべて査読有り

1: 梶山広明 EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) 阻害をターゲットとした卵巣癌の腹膜転移抑制および薬剤耐性克服にむけた New Strategy; 日本産科婦人科学会雑誌 2008 ;60 1629-1640.

2: Kajiyama H (14人中筆頭). Is there any possibility of fertility-sparing surgery in patients with clear-cell carcinoma of the ovary? Gynecol Oncol. 2008 ;111(3):523-6.

3: Tsukamoto H, Shibata K, Kajiyama H (6人中3番目). Aminopeptidase N (APN)/CD13 inhibitor, Ubenimex, enhances radiation sensitivity in human cervical cancer. BMC Cancer. 2008 19;8:74.

4: Umezu T, Shibata K, Kajiyama H (7人中3番目) Taxol resistance among the different histological subtypes of ovarian cancer may be associated with the expression of class III beta-tubulin. Int J Gynecol Pathol.

2008;27(2):207-12.

5: Shibata K, Kajiyama H (8人中2番目) Twist expression in patients with cervical cancer is associated with poor disease outcome. Ann Oncol. 2008;19(1):81-5.

6: Kajiyama H (6人中筆頭) Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. Int J Cancer. 2008;122(1):91-9.

7: Tsukamoto H, Shibata K, Kajiyama H (6人中3番目) Irradiation-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) related to invasive potential in endometrial carcinoma cells. Gynecol Oncol. 2007;107(3):500-4.

8: Kajiyama H (6人中筆頭) Possible involvement of SDF-1alpha/CXCR4-DPP4 axis in TGF-beta1-induced enhancement of migratory potential in human peritoneal mesothelial cells. Cell Tissue Res. 2007;330(2):221-9.

9: Terauchi M, Kajiyama H (7人中2番目) Inhibition of APN/CD13 leads to suppressed progressive potential in ovarian carcinoma cells. BMC Cancer. 2007; 27;7:140.

10: Kajiyama H (7人中筆頭) Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. Int J

Oncol. 2007;31(2):277-83.

11: Tsukamoto H, Shibata K, Kajiyama H (6人中3番目) Uterine smooth muscle cells increase invasive ability of endometrial carcinoma cells through tumor-stromal interaction. Clin Exp Metastasis. 2007;24(6):423-9.

12: Terauchi M, Kajiyama H (13人中2番目) Possible involvement of TWIST in enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. Clin Exp Metastasis. 2007;24(5):329-39.

13: Yamashita M, Kajiyama H (8人中2番目) Involvement of aminopeptidase N in enhanced chemosensitivity to paclitaxel in ovarian carcinoma in vitro and in vivo. Int J Cancer. 2007;120(10):2243-50.

14: Hosono S, Kajiyama H (7人中2番目) Expression of Twist increases the risk for recurrence and for poor survival in epithelial ovarian carcinoma patients. Br J Cancer. 2007;96(2):314-20.

[学会発表] (計 8件)

1: 梶山広明; 卵巣癌の腹膜転移とタキソール耐性における上皮間葉転換 (EMT) の関与～EMT 誘導転写因子 TWIST を分子標的とした新規治療法の開発を目指して～; 第 45 回日本婦人科腫瘍学会学術集会 (2008. 11. 22)

2: 梶山広明; EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) 阻害をターゲットとした卵巣癌の腹膜転移抑制および薬剤耐性克服にむけた New Strategy; 第 60 回日本産科婦人科学会学術集会 (2008. 4. 15)

3: 塚本 裕久; Epithelial-Mesenchymal

Transition (EMT) をターゲットにした子宮癌放射線治療後の転移予防; 第 60 回日本産科婦人科学会学術集会 (2008. 4. 15)

4: 塚本 裕久; Epithelial-Mesenchymal Transition was caused by ionizing radiation in uterine corpus cancer cells. 第 66 回日本癌学会学術総会 (2007. 10. 25)

5: 梶山広明; 卵巣癌の腹膜転移及びパクリタキセル感受性における細胞表面アミノペプチダーゼの関与～APN/CD13 と DPPIV/CD26 の細胞形態におけるネガティブクロストーク機構の可能性～; 第 12 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会シンポジウム (2007. 8. 4)

6: 寺内 幹雄; 卵巣癌における Twist siRNA を用いた腹膜播種抑制効果; 第 42 回日本婦人科腫瘍学会学術集会; (2007. 6. 30)

7: 梶山広明; 卵巣明細胞腺癌における New Paradigm; 第 42 回日本婦人科腫瘍学会学術集会シンポジウム; (2007. 6. 30)

8: 梶山広明; タキソール耐性化卵巣癌細胞では上皮間葉移行 (EMT) を介して運動能と腹膜転移能が亢進している; 第 59 回日本産科婦人科学会学術集会 (2007. 4. 16)

[図書] (計 1 件)

梶山広明; EMT によるがん転移・浸潤と薬剤耐性の相互誘導性; 細胞工学 2008 27(4) 353-358

[その他]

ホームページ等

名古屋大学産婦人科教室

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/obgy/info/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶山 広明 (Kajiyama Hiroaki)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 00345886

(2) 連携研究者

寺内 幹雄 (Terauchi Mikio)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 60378122