

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09231

研究課題名(和文) 子宮体癌細胞の増殖、進展における脂肪細胞の役割とその制御の解明

研究課題名(英文) The role of adipocytes and their regulation in the proliferation and progression of uterine corpus cancer cells

研究代表者

横山 正俊 (Yokoyama, Masatoshi)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：40230669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において我々は、新規培養方法を確立することで、脂肪細胞組織が子宮体癌の増殖、浸潤に関与することを明らかにした。この作用はp38 pathwayを介すると予想される。とくに、脂肪組織がcancer-associated adipocyteとして、子宮体癌の細胞動態を制御している可能性があることをin vitroで示すことが出来た。本研究の進展により、子宮体癌への新たな治療戦略の確立が期待され、個別化医療においても患者検体を用いることで、新規分子標的薬をはじめ、各種薬剤の有効性評価ツールとしての応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮体癌細胞 - 脂肪組織解析モデルを用いて、免疫組織化学、Western blot、real-time RT-PCR、ELISA等を用いて解析し、癌細胞の生存、増殖、遊走、浸潤における皮下、内臓脂肪組織の影響とその相違を解析した。新規培養方法を確立することで、脂肪細胞組織が子宮体癌の増殖、浸潤に関与することを明らかにした。この新規培養法を用いることで子宮体癌への新たな治療戦略の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that adipocyte tissue is involved in the growth and invasion of uterine corpus cancer by establishing a novel culture method. This effect is expected to be mediated by the p38 pathway. In particular, we demonstrated that adipose tissue may regulate the cell dynamics of uterine corpus cancer as a cancer-associated adipocyte in vitro. The present study is expected to lead to the establishment of new therapeutic strategies for uterine corpus cancer and to the application of patient specimens in precision medicine as a tool for evaluating the efficacy of various drugs, including novel molecular target drugs.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：子宮体癌 脂肪細胞 三次元培養

## 1. 研究開始当初の背景

疫学的に肥満と子宮体癌の発症には関連性が示唆されており、脂肪組織自身も **cancer-associated adipocyte** としても働きが注目されている。しかし、脂肪組織が子宮体癌の細胞動態に及ぼす影響は未解明である。本課題では子宮体癌細胞と脂肪組織を混合培養し、形態学的な変化も含めて体癌細胞と脂肪組織の相互作用を分子生物学的に解析した。子宮体癌細胞と脂肪組織の3次元培養を行った結果、脂肪組織は子宮体癌細胞の増殖と間質浸潤を促進した。脂肪組織の調節シグナルのとしては **MAPK** の関与が示唆された。

### 研究成果の意義：

子宮体癌の発生頻度の増加と肥満者数の増加には疫学的には相関があるとされているが、分子細胞生物学的な詳細は明らかにされていない。脂肪組織が子宮体癌に及ぼす分子生物学的影響の解明には、子宮体癌細胞と脂肪組織の相互作用解析モデルが必要である。本研究では、従来、培養が困難であるとされた脂肪組織を組織片培養することで、子宮体癌細胞との混合培養を可能とした。この方法により、脂肪組織が子宮体癌細胞に及ぼす細胞生物学的影響を形態学およびシグナル伝達経路の面から解析することが可能となった。この培養法を基盤とすることで、子宮体癌への新たな治療戦略および新規分子標的療法の有効性評価が可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、脂肪組織が子宮体癌細胞の増殖、アポトーシス、浸潤能へ及ぼす影響の解明と、その調節責任シグナルの同定である。2種類の子宮体癌細胞株とラット由来の脂肪組織片を用い、コラーゲンゲル 3次元培養により細胞間相互作用を再現する。この擬似的体癌組織を用いて分子細胞生物学的解析を実施する。

## 3. 研究の方法

子宮体癌細胞－脂肪組織解析モデル用いて、免疫組織化学、**Western blot**、**real-time RT-PCR**、**ELISA** 等を用いて解析し、癌細胞の生存、増殖、遊走、浸潤における皮下、内臓脂肪組織の影響とその相違を解析した。

1) 材料：①子宮体癌細胞：**HEC265**(原発巣から樹立されたヒト細胞株)、**HEC151**(原発巣から樹立されたヒト細胞株)を用いた。②脂肪組織：**6, 12** 週齢マウス、ラットのヒト皮下、内臓脂肪組織を細切した脂肪組織片を用いた。

2) 培養システム：子宮体癌細胞－脂肪組織解析モデルを用いた。外皿 に、**0.5-1 mm** 径に細切した脂肪組織片 (**0.5 ml**) を **5 ml** の I 型コラーゲンゲル内に包埋し、1日間培養した。同時に、底面がニトロセルロース膜から成る内皿に **1 ml** のコラーゲンゲル層を作製した後、コラーゲンゲルに癌細胞 (**10 万個**) を播種し1日間培養した。その後、内皿を、外皿 に入れ培養した。対照は、癌細胞の単独培養とした。培養 **1, 2, 3** 週で、癌細胞－脂肪組織解析モデルで再現された現象を、

ホルマリン固定標本ならびに細胞から抽出した蛋白、遺伝子と細胞培養液を用いて解析した。

3) 癌細胞の形態、生存、増殖の解析： 癌細胞の形態をヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色、電顕で形態的に評価した。子宮体癌細胞の増殖を Ki67、アポトーシスを cleaved caspase 3 の免疫染色を行い、癌細胞単独群と比較検討した。

4) 癌細胞の情報伝達分子の解析： 本研究では、脂肪組織関連分子として、酸化ストレスシグナル: NF- $\kappa$ B, ERK-1/2, p38、小胞体ストレス分子(アポトーシス促進シグナル: IRE1 $\alpha$ 、JNK の発現を、免疫組織化学、Western blot、real-time RT-PCR で比較検討する。さらに、子宮体癌の重要な情報伝達分子(RAS/MAP kinase pathway, PI3K/AKT pathway, PTEN, cyclin D1, CDK4 の発現を同様に比較検討した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 新たな 3 次元培養法の確立

我々が従来用いていた二重皿培養法は、2 種類の細胞間の相互作用ならびに浸潤性を解析するのに適した方法である。一方、それぞれの細胞種における蛋白質ならびに遺伝子発現を解析するには、足場となるコラーゲンを異なる細胞種で共用しているため、解析が困難である。そこで我々はプラスチック皿とコラーゲンを組み合わせた組織ディスクを作成し、接着させて培養することで、蛋白・遺伝子発現を解析可能な 3 次元培養系を確立した。

##### 2) 脂肪組織は子宮体癌の増殖・浸潤を促進する

3 次元組織培養系を用い解析した結果、脂肪組織との混合培養条件下では、培養 10 日目において、対照群と比較して、子宮体癌細胞の増殖率(Ki67 陽性率)が上昇した。一方、内皮細胞との混合培養条件下では有意差は認められなかった。脂肪組織片を用いた 3 次元組織培養では、培養 10 日目において、子宮体癌細胞は脂肪組織が存在するコラーゲン内に浸潤し、一部では脂肪組織片内への浸潤が認められた(図1)。

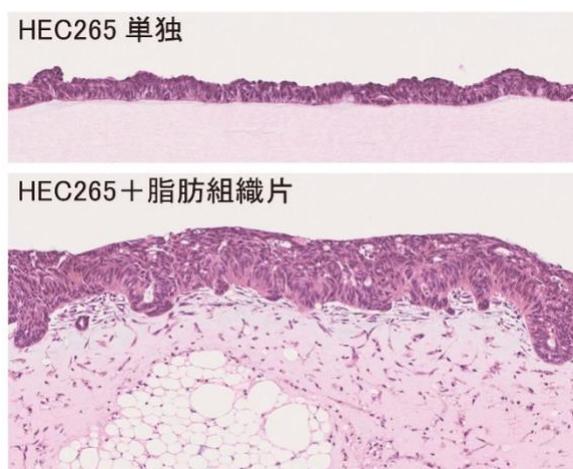


図1：脂肪組織片による子宮体癌の増殖・浸潤能の亢進

### 3) 脂肪組織は子宮体癌の p38 経路を調節する

脂肪組織ないし内皮細胞との混合培養下での MAPK pathway を解析した。

脂肪組織は子宮体癌細胞の p38 のリン酸化を抑制することが明らかとなった(図2)。今回の検討では、NF- $\kappa$ B, ERK-1/2, p38, IRE1 $\alpha$ , JNK ならびに PTEN, cyclin D1, CDK4 に関して、各実験群間において有意差を認めなかった。

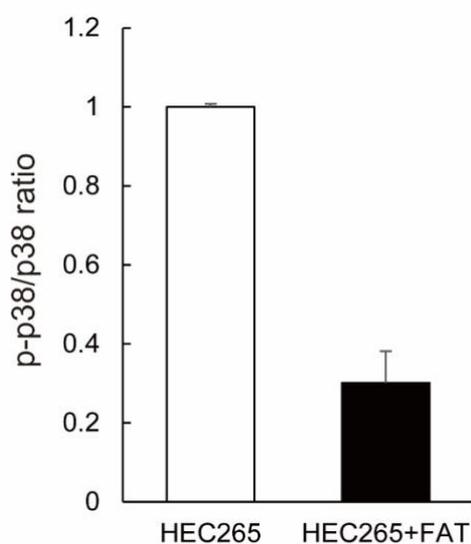


図 2. 脂肪細胞による p38 のリン酸化抑制の検討

以上の結果より、本研究において我々は、新規培養方法を確立することで、脂肪細胞組織が子宮体癌の増殖、浸潤に関与することを明らかにした。この作用は p38 pathway を介すると予想される。とくに、脂肪組織が cancer-associated adipocyte として、子宮体癌の細胞動態を制御している可能性があることを in vitro で示すことが出来た。本研究の進展により、子宮体癌への新たな治療戦略の確立が期待され、個別化医療においても患者検体を用いることで、新規分子標的薬をはじめ、各種薬剤の有効性評価ツールとしての応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	青木 茂久  (Aoki Shigehisa)  (10448441)	佐賀大学・医学部・准教授    (17201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関