

令和 3 年 5 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09252

研究課題名(和文) 血小板の上皮化促進作用に対する子宮体癌の不应性獲得機序の解明とその責任分子の同定

研究課題名(英文) Identification of factors for endometrial cancer to achieve refractory mechanism against epithelialization of platelets derived elements. in endometrial cancer.

研究代表者

明星 須晴(Myoyo, Subaru)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：10543655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜癌の浸潤能、転移能における血小板由来因子の作用について、実験的手法によって検討した。正常子宮内膜細胞に対しHPV-E6/E7/hTERTを導入した不死化モデル、さらにK-rasを導入した癌化モデルを用いて、血小板由来のmicroparticleもしくはchemokineを様々な条件で抽出・作用させ、表現型の変化を観察した。

血小板とモデル細胞の共培養によって接着関連因子であるE-cadherinおよびリン酸化FAKの発現上昇が観察された。その他の、表現型の変化は、実験系の樹立に成功せず、評価できなかった。観察された接着関連因子の発現変化における責任因子の同定には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜癌が、血小板由来因子により、細胞接着関連因子の発現変化が確認された。これは、血小板由来の何らかの因子が、癌細胞同士あるいは間質細胞との接着、血管内皮細胞との接着などに影響を与えていることを示唆している。本研究ではその責任因子や、浸潤や転移への直接的に影響し得る表現型変化を証明できなかったが、それらが同定された暁には、子宮内膜癌の浸潤・転移に関する機構解明、新規治療法の開発に役立つ可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effects of platelet-derived factor on the invasive and metastatic potential of endometrial cancer were investigated by experimental in vitro models. We used HPV-E6/E7/hTERT- and additional Kras-transfected endometrial epithelial cells as immortalized and cancer models, respectively. Platelet-derived microparticles or chemokines were extracted and treated the cells under various conditions, and phenotypic changes were investigated. Co-culture of platelets with model cells resulted in increased expression of the adhesion-related factors E-cadherin and phosphorylated FAK. Other phenotypic changes could not be evaluated due to unsuccessful establishment of the experimental system. We were not able to identify the responsible factors for the observed changes in the expression of adhesion-related factors.

研究分野：子宮内膜癌

キーワード：子宮内膜癌 血小板 上皮化

1. 研究開始当初の背景

本研究申請者らは血小板が黄体形成期の血管内皮細胞 (Furukawa et al., Endocrinology 2007) や胎盤形成期の栄養膜細胞 (Sato et al., Blood 2005) の遊走を促進している可能性を報告してきた。そこで血小板が月経期の子宮内膜再生に関わっている可能性を検討したところ、血小板の液性因子 chemokine が子宮内膜上皮細胞の遠位部からの遊走を誘導し、近位部では逆に血小板の分泌粒子 microparticle が遊走を抑制して上皮化を誘導する可能性を見いだした (Suginami et al. Am J Reprod Immunol, 2016 in press)。一方で癌化誘導細胞株では遊走は促進するが上皮化は誘導しないことが観察された。

子宮内膜癌は子宮内膜間質および筋層に浸潤し、遠隔組織に生着・進展するが、その過程では周辺組織の破壊と修復が起きており、病巣の進展は組織の再構築という側面からも捉えることができる。血小板 microparticle への反応性が正常子宮内膜上皮細胞と子宮内膜癌細胞で異なること、癌病巣内には高頻度に出血を伴うことから、「出血部位に存在する血小板由来の液性因子と microparticle による細胞遊走や組織再構築の誘導作用に対する反応性の異常が子宮内膜癌の進展や病巣形成に関与する」と着想するに至り、これらを作業仮説として本研究を計画した。

2. 研究の目的

月経期のヒト子宮内膜再生において血小板由来の microparticle が上皮細胞の遊走を促進し microparticle が遊走を抑制し上皮化形成を促進すること、一方で子宮内膜癌細胞株では chemokine による遊走促進作用には反応するものの microparticle による遊走抑制と上皮化促進は誘導されないことを見いだした。これらの知見から「血小板由来の chemokine への反応性の亢進が子宮内膜癌の浸潤に関与し microparticle の上皮化促進作用への反応性の低下が子宮内膜癌病巣の進展に関与する」との発想に至った。本研究では正常子宮内膜由来の不死化上皮細胞から遺伝子導入による癌化モデルを用いて、血小板への反応性を指標に、子宮内膜癌の病態の新しい知見を得ることを目的として研究を立案した。

3. 研究の方法

本研究の目的を以下の3点とした。

- 1) 血小板 microparticle の遊走抑制作用と上皮化誘導作用に対する正常子宮内膜上皮由来株と癌化誘導細胞株との反応性の差異と作用責任分子の同定
 - 2) 遺伝子導入による各癌化誘導過程における血小板作用への反応性の変化とその機序の解明
 - 3) 子宮内膜癌の診断や治療法の開発につながる新規プロジェクトの提案
- 血小板の分離や機能解析および遺伝子導入などの培養実験を代表の明星と分担の水本が大学院生小幡、松本と担当し、免疫組織染色および microarray 解析は分担の藤原が担当する。

<平成30年度の計画>

正常子宮内膜上皮細胞から h-TERT 導入して不死化した細胞株 (EM-E6/E7/hTERT) およびこの細胞に K-ras 遺伝子を導入して癌化させた細胞株 (EM-E6/E7/hTERT/K-ras) を用いて実験を施行する。ヒト血小板はボランティア女性の末梢血から Walkowiak らの報告した方法で分離しそのまま共培養に供するか、または collagen type I を coating した dish 上で血小板を単独で培養し、活性化した血小板からの分泌物を含む培養上清を採取して遠沈後に分離した上澄みを血小板の分離培養上清分画 (chemokine 分画) として、また遠沈を RPMI に浮遊させたものを microparticle 分画として以下の実験に供する。

1) 血小板と遠心分離培養上清の作用差異の検討

EM-E6/E7/hTERT および EM-E6/E7/hTERT/K-ras を培養した後、バスケット chamber を用いて調整した血小板と共培養し、培養液を採取洗浄後に WST-1 assay 法にて生細胞数を算定する。敷石状配列への形態の変化を time-lapse camera で観察し、F-actin 染色による cortical actin ring 形成の有無と E-cadherin およびリン酸化 focal adhesion kinase (pFAK) の発現形態を検討する (上図)。さらに血小板の分離培養上清を添加して同様の検討をする。また培養上清は charcoal 処理をして血小板由来脂質因子を除去、または熱処理を加えて peptide chemokine の不活性化を行い、増殖作用の変化を検討する。また細胞株を collagen type I, fibronectin または Matrigel coating dish にまき、血小板との共培養または血小板培養上清を添加し、接着細胞数を算定し、接着能の

変化を評価する。

(明星、水本、小幡、松本)

2) 血小板由来 microparticle 分画の作用の検討

細胞株を血小板または血小板の分離培養上清分画あるいは microparticle 分画の存在下で培養後、flow cytometry 法を用いて integrin 1, 2, 3, 5, 1, 3 さらに機能関連分子である CD9 (Park et al. Mol Hum Reprod 1999), 細胞間接着を増強し細胞内シグナルを伝達する ALCAM (Fujiwara et al. JCEM 2003), および細胞間離開作用を誘導する Eph A1 と ephrin A1 (Fujiwara et al. JCEM 2002; Fujii et al. Hum Reprod 2011) の発現変化を比較し、細胞接着関連分子の発現誘導に対する血小板の作用を検討する。また matrigel invasion assay し Assay 後の培養液を採取 zymography にて matrix metalloprotease (MMP-2, MMP-9) の分泌と活性化を検索する。(明星、水本、小幡、松本)

3) 発現変化する遺伝子群のスクリーニング

1)と2)の実験に際して各細胞株より mRNA を抽出し、microarray 法で発現変化している遺伝子群をスクリーニングし、今後の解析に参考となる情報を得る。(藤原、水本)

<平成 31 年度の計画>

1) 遺伝子導入による癌化過程における血小板作用への反応性の変化とその責任遺伝子群の解析

EM-E6/E7/hTERT 細胞に p-Akt, c-myc, NFkB などの癌遺伝子の導入もしくは PTEN などの癌抑制遺伝子を抑制した細胞を樹立する。樹立した細胞を用いて血小板および関連因子の存在下に培養して前年度の 1)と2)と同様な解析をし、癌化過程における血小板に対する反応性の変化を検討する。また microarray 法で各癌化進行段階の細胞株において発現が変化している遺伝子群をスクリーニングする。(明星、藤原、水本、小幡、松本)

2) 遺伝子導入による癌化過程における細胞間接着制御因子の解析

各細胞株について EphA1-10, ephrinA1-5, EphB1-6, ephrinB1-3, semaphorin-3A-F およびその受容体 neuropilin-1,2, L1-CAM の遺伝子発現変化を検討する。さらに recombinant Eph-ephrin, semaphorin の binding を検討し、counterpart 分子に対する生物学的結合能を確認する。(水本、松本)

3) 子宮体癌病変部での血小板作用への反応性変化の責任候補遺伝子発現の検討

EM-E6/E7/hTERT および各細胞株の血小板に対する反応の違いが確認された分子群について、子宮内膜癌組織から分離した癌細胞を用いて検討を行う。また microarray によって発現変化が観察された遺伝子群について定量 PCR, flow cytometry, western blotting, 細胞免疫染色等で確認を行う。これらにより子宮内膜癌の進展および病巣形成への関連が示唆された分子について、免疫組織染色法や in situ hybridization 法で正常子宮内膜組織、子宮内膜癌病変部での蛋白および遺伝子発現を検討し、さらに血小板分布との関係についても評価する。(明星、藤原、水本、松本)

4) 本研究で得られた新知見の総合的な評価

研究で得られた知見をもとに子宮内膜癌の診断や治療法の開発につながる新規のプロジェクトを創案し、継続的研究として申請することを検討する。(明星、藤原、水本、小幡、松本)

4. 研究成果

子宮内膜癌の浸潤能、転移能における血小板由来因子の作用について、実験的手法によって検討した。正常子宮内膜細胞に対し HPV-E6/E7/hTERT を導入した不死化モデル、さらに K-ras を導入した癌化モデルを用いて、血小板由来の microparticle もしくは chemokine を様々な条件で抽出・作用させ、表現型の変化を観察した。

血小板とモデル細胞の共培養によって接着関連因子である E-cadherin およびリン酸化 FAK の発現上昇が観察された。その他の、表現型の変化は、実験系の樹立に成功せず、評価できなかった。観察された接着関連因子の発現変化における責任因子の同定には至らなかった。

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	水本 泰成 (Yasunari Mizumoto) (00420331)	金沢大学・附属病院・助教 (13301)	
研究分担者	毎田 佳子 (Maida Yoshiko) (20397219)	金沢大学・保健学系・教授 (13301)	
研究分担者	藤原 浩 (Fujiwara Hiroshi) (30252456)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	
研究分担者	中村 充宏 (Nakamura Mitsuhiro) (50377397)	金沢大学・附属病院・講師 (13301)	
研究分担者	岩垂 純平 (Iwadare Junpei) (00740739)	金沢大学・附属病院・助教 (13301)	

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
---------	---------