

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24049

研究課題名(和文) 子宮体癌におけるエストロゲン関連受容体-上皮間葉転換を介した浸潤転移機序の解明

研究課題名(英文) Estrogen-related receptor alpha induces epithelial-mesenchymal transition through cancer-stromal interactions in endometrial cancer

研究代表者

寄木 香織 (Yoriki, Kaori)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70851682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではERR $\alpha$ が癌-間質相互作用を介して癌細胞の浸潤・転移を促進するメカニズムを解明することを目的とした。ERR $\alpha$ を過剰発現または発現抑制した子宮体癌細胞株と子宮内膜間質細胞株を共培養すると、子宮体癌細胞のERR $\alpha$ は癌-間質相互作用を介して、間質細胞のTGF- $\beta$ 1の発現を誘導すること、ERR $\alpha$ は癌-間質相互作用を介して上皮間葉転換(EMT)関連因子の発現を誘導することがわかった。また、細胞の浸潤・遊走実験ではERR $\alpha$ はTGF- $\beta$ 1誘導性のEMTを増強させ、癌細胞の遊走能と浸潤能を促進することが示唆された。ERR $\alpha$ は子宮体癌におけるEMTを阻害するための新たな治療標的となり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮体癌の増殖や発癌にエストロゲンが深く関与するが、本疾患の病態はこれだけでは説明できず、新たな治療戦略確立にはその発癌・進展機構に基づいた分子機構の解明が必要である。エストロゲン関連受容体(ER)は子宮体癌の悪性化や進展維持作用をもつことが知られる。さらにERR $\alpha$ は癌微小環境において癌細胞のエネルギー代謝に関わる遺伝子発現を変化させることにより、低酸素などのストレス環境に適応しており、子宮体癌微小環境の構築に重要な役割を果たしている。本研究でERR $\alpha$ を介した癌細胞の転移・浸潤作用の分子メカニズムを解明できたことは、新たな癌微小環境選択的な子宮体癌治療法の開発への重要な糸口となる。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether ERR $\alpha$  could participate in epithelial-mesenchymal transition (EMT) in endometrial cancer through cancer-stromal interactions. Two endometrial cancer cell lines were co-cultured with endometrial stromal cells (T-HESCs). EMT-associated factors including vimentin, Snail, and ZEB1 were upregulated in cancer cells overexpressing ERR $\alpha$  and that TGF- $\beta$ 1 was induced in T-HESCs. In contrast, ERR $\alpha$  knockdown suppressed EMT-associated factors in cancer cells and TGF- $\beta$ 1 in T-HESCs. ERR $\alpha$  overexpression increased EMT-associated factors after TGF- $\beta$ 1 exposure; however, it decreased E-cadherin at protein level. ERR $\alpha$  knockdown suppressed EMT-associated factors after TGF- $\beta$ 1 exposure, whereas E-cadherin remained unchanged. ERR $\alpha$  knockdown attenuated the stimulation of migration and invasion by TGF- $\beta$ 1. ERR $\alpha$  is a potential target for inhibiting TGF- $\beta$ 1-induced EMT through cancer-stromal interactions in endometrial cancer.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：エストロゲン関連受容体 癌-間質相互作用 上皮間葉転換 子宮体癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

子宮体癌の増殖や発癌にエストロゲンが深く関与するが、本疾患の病態はこれだけでは説明できず、新たな治療戦略確立にはその発癌・進展機構に基づいた分子機構の解明が求められる。そこでわれわれは、エストロゲン受容体と構造が類似しているがエストロゲンのようなりガンドを有さないオーファン核内受容体であるエストロゲン関連受容体 (ERR) が子宮体癌病巣に及ぼす作用について着目してきた。ERR はミトコンドリア生合成などの細胞内代謝機能を制御し、寒冷刺激や低酸素、飢餓状態などにより発現が上昇し、転写因子としてエネルギー代謝に関わるさまざまな遺伝子を活性化する。これまでに、ERR が子宮体癌進行例や予後不良症例の病巣局所に高発現し、癌の増殖・血管新生作用をもつこと、選択的 ERR 抑制剤 (XCT790) に抗腫瘍効果があることを報告し、ERR が子宮体癌の悪性化や進展維持作用をもつことを明らかにしてきた。しかし、ERR が病巣の浸潤・転移に関わる作用機序は未だに不明である。ERR が癌細胞の浸潤・転移促進を制御する分子メカニズムを解明することにより、新たな癌微小環境選択的な治療法を確立することができる。

### 2. 研究の目的

癌の浸潤・転移には癌細胞自体のもつ特性だけではなく、癌細胞周囲の線維芽細胞や炎症細胞、免疫担当細胞、血管内皮細胞などの間質が構成する癌微小環境が深くかかわっている。子宮体癌において ERR が癌-間質相互作用を介して癌細胞の浸潤・転移促進を制御する分子メカニズムを明らかにし、癌微小環境選択的な治療薬の開発への分子基盤を確立させる。

### 3. 研究の方法

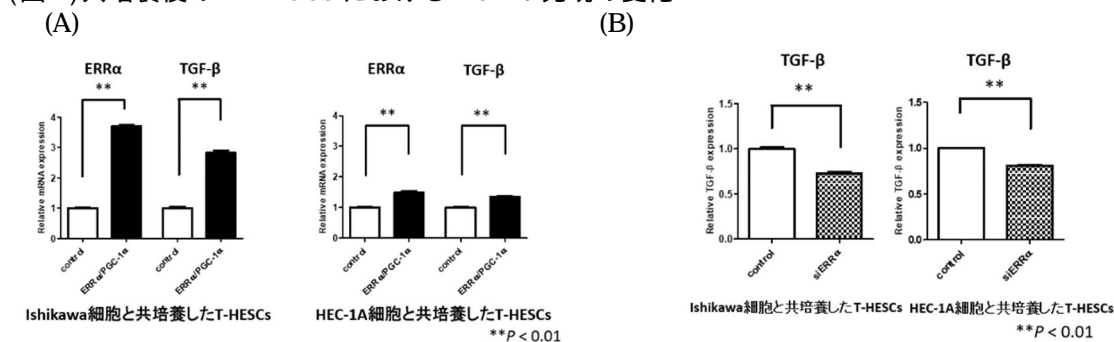
癌-間質相互作用を調べるため、子宮体癌細胞株 (Ishikawa 細胞および HEC-1A 細胞) と子宮内膜間質細胞株 (T-HESCs) を共培養する実験系を用いた。子宮体癌細胞株において ERR プラスミドと ERR の co-activator である PGC-1 プラスミドを一過性導入し ERR を過剰発現させた。また、子宮体癌細胞株に siRNA を導入し、ERR の発現を抑制させた。共培養系での子宮体癌細胞の EMT 関連因子の発現や間質細胞の炎症性サイトカインの発現に対して、子宮体癌細胞株の ERR $\alpha$  の発現変化が及ぼす影響について、定量 PCR や western blotting を用いて検討した。また、癌細胞の運動能や浸潤能に対する影響について、Matrigel invasion chamber system を用いて検討した。

### 4. 研究成果

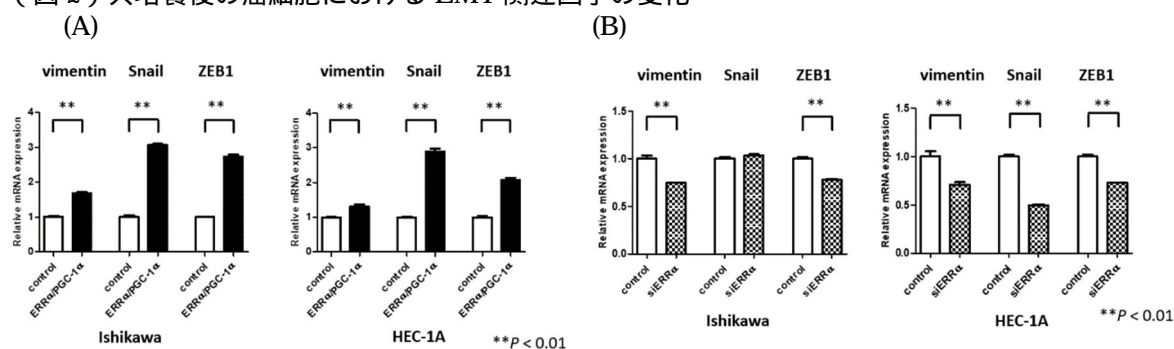
子宮体癌細胞株に対して ERR $\alpha$  を過剰発現させ、癌細胞の ERR $\alpha$  が T-HESCs に及ぼす影響について定量 PCR を用いて評価したところ、ERR $\alpha$ /PGC-1 $\alpha$  を過剰発現させた癌細胞と共培養した T-HESCs において、ERR $\alpha$  の発現や強力な EMT 誘導因子である TGF- $\beta$  が有意に上昇し ( $p < 0.01$ )、他にも炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 の発現が上昇した。次に、子宮体癌細胞株の ERR $\alpha$  の発現を抑制し T-HESCs に及ぼす影響について検討したところ、TGF- $\beta$  の発現が有意に低下した ( $p < 0.01$ ) (図 1)。さらに、共培養後分離した癌細胞における EMT 誘導について検討したところ、ERR $\alpha$ /PGC-1 $\alpha$  の過剰発現下に共培養した癌細胞では、間葉系細胞マーカーである vimentin の発現や EMT 誘導転写因子である Snail や ZEB1 の発現が有意に上昇した ( $p < 0.01$ )。一方、単培養では弱い反応しか観察できなかった。反対に ERR $\alpha$  の発現抑制下では、Ishikawa 細胞の Snail 以外の EMT 関連因子の発現は有意に低下した ( $p < 0.01$ ) (図 2)。そして、wound healing assay を用いて癌細胞の運動能について評価したところ、ERR $\alpha$ /PGC-1 $\alpha$  を過剰発現させた癌細胞では有意に運動能が亢進し (Ishikawa,  $p < 0.05$ ; HEC-1A,  $p < 0.01$ )、T-HESCs との共培養によってさらに運動能が亢進する傾向がみられた。これらの所見から、癌-間質相互作用を介して間質細胞から分泌される TGF- $\beta$  が子宮体癌細胞の EMT を誘導すると考えられた。そこで、子宮体癌細胞における ERR $\alpha$  と TGF- $\beta$  による EMT 誘導効果との関連について検証するため、単培養で癌細胞に TGF- $\beta$  10 ng/mL を添加し、EMT 関連因子の発現を定量 PCR と western blotting を用いて調べた。ERR $\alpha$ /PGC-1 $\alpha$  を過剰発現させた癌細胞では、TGF- $\beta$  を添加時には vimentin、Snail、ZEB1 の発現が有意に上昇し ( $p < 0.01$ )、western blotting でも同様の発現変化と上皮細胞マーカーである E-cadherin 発現の低下を認めた。一方、ERR $\alpha$  抑制下で TGF- $\beta$  を添加すると vimentin、Snail、ZEB1 の発現が低下し、E-cadherin の変化は認めなかった (図 3)。すなわち、子宮体癌細胞において ERR $\alpha$  の発現上昇が TGF- $\beta$  誘導性の EMT を促進することを見出した。一方で ERR $\alpha$  のインバーサゴニストである XCT790 を添加することによる EMT 関連因子の変化は認めず、内因性の ERR $\alpha$  発現が重要であると考えられた。最後に、子宮体癌細胞における ERR $\alpha$  が TGF- $\beta$  誘導性の遊走能および浸潤能に及ぼす影響について Matrigel invasion chamber system を用いて検討した。TGF- $\beta$  の添加は癌細胞の遊走能を有意に促進し ( $p < 0.01$ )、さらに浸潤能も有意に促進した (Ishikawa,  $p < 0.01$ ; HEC-1A,  $p < 0.05$ ) (図 4)。しかし、ERR $\alpha$  の発現を抑制すると TGF- $\beta$  誘導性の遊走能および浸潤能は有意に低下した (Ishikawa,  $p < 0.01$ ; HEC-1A,  $p < 0.05$ )。以上の結果より、(1)子宮体癌細胞

の ERR $\alpha$  の発現上昇は癌-間質相互作用を介して、間質細胞の TGF- $\beta$  と ERR $\alpha$  の発現を誘導すること、(2)子宮体癌細胞において ERR $\alpha$  は癌-間質相互作用を介して、EMT 関連因子の発現を誘導すること、(3)子宮体癌細胞において ERR $\alpha$  は TGF- $\beta$  誘導性の EMT を増強させることにより、癌細胞の遊走能と浸潤能を促進することが示唆された。ERR $\alpha$  は子宮体癌における癌-間質相互作用を介した上皮間葉転換を阻害するための新たな治療標的となり得ると考えられた。

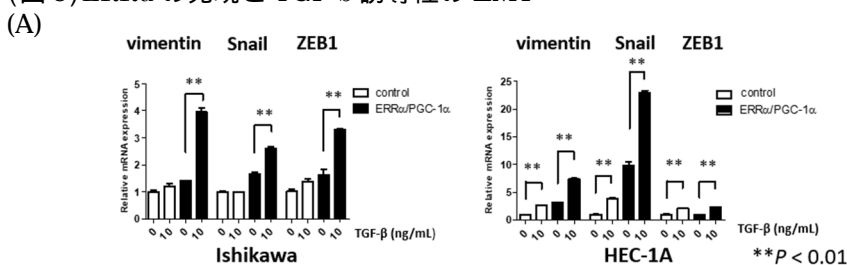
(図 1) 共培養後の T-HESCs における TGF- $\beta$  発現の変化



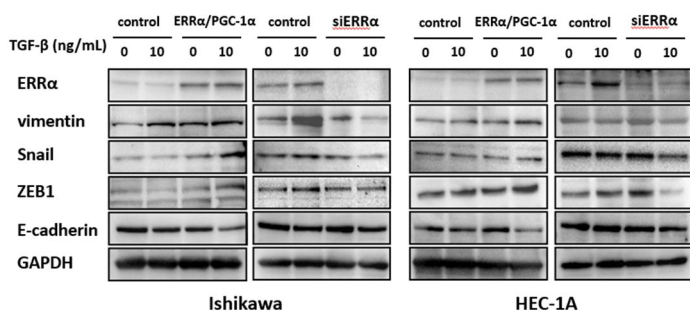
(図 2) 共培養後の癌細胞における EMT 関連因子の変化



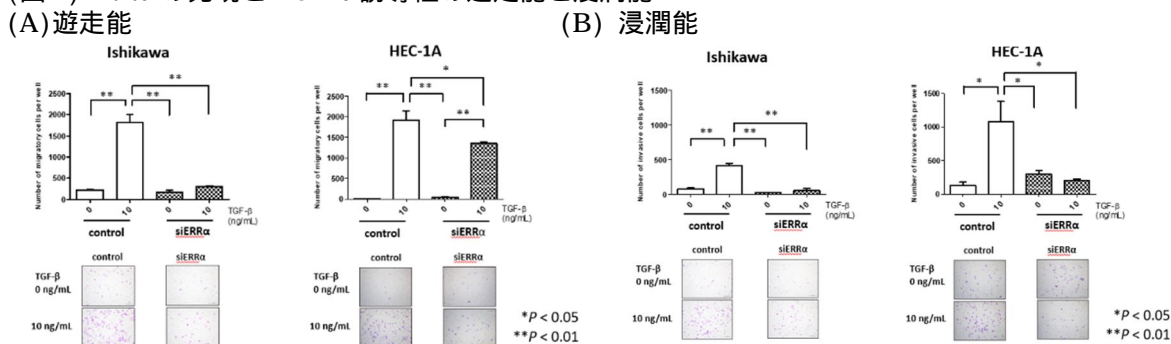
(図 3) ERR $\alpha$  の発現と TGF- $\beta$  誘導性の EMT



(B)



(図 4) ERR $\alpha$  の発現と TGF- $\beta$  誘導性の遊走能と浸潤能



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森 泰輔
2. 発表標題 子宮体癌、子宮内膜症におけるエストロゲン伝達経路制御に基づく新規治療戦略の確立
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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