

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592144

研究課題名（和文）

子宮癌での上皮-間葉転換による免疫抑制環境構築の分子機構解明とその臨床応用

研究課題名（英文） Analysis of immunosuppressive microenvironment associated with Epithelial-Mesenchymal Transition in uterine cancer.

研究代表者

藤田 知信 (FUJITA TOMONOBU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20199334

研究成果の概要（和文）:

子宮癌のEMTに影響を与える候補遺伝子として子宮体癌においてMYE0を選択し、子宮頸癌ではHOXD9を選択した。子宮体癌細胞株でMYE0Vの遺伝子発現を抑制すると、運動能および浸潤能が低下した。EMT関連分子をsiRNAでMYE0Vを発現抑制した細胞株で評価したところ、Snail、Snail2、ZEB1は低下し、fibronectinは上昇した。子宮頸癌細胞株4種でHOXD9を抑制したところ、全ての細胞で増殖が停止したが、EMTマーカーに共通した変化は認められなかった。

研究成果の概要（英文）:

To analyze immunosuppressive tumor microenvironment associated with EMT, novel cancer-associated genes MYE0V and HOXD9 were investigated. After the transfection of MYE0V siRNA into the endometrial cancer cell lines, migration index and invasion index were both significantly lower than that in the control group. mRNA expression of Snail1, Snail2, ZEB1 was significantly reduced, while fibronectin was significantly increased. Silencing of HOXD9 inhibits cell proliferation in 4 of 4 cervical cancer cells, but there were no EMT related gene that was commonly inhibited nor stimulated in 4 cervical cell lines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：癌、子宮体癌、子宮頸癌、EMT

## 1. 研究開始当初の背景

進行・再発子宮癌に対しては、標準的治療に加えて、新しい治療法の開発が期待されている。我々は、子宮体癌および子宮頸癌に対する免疫療法や分子標的治療、あるいは診断法の開発を目指して研究を続けてきた。子宮癌に対する免疫療法の開発に向け、腫瘍抗原の同定を行ってきた。また、我々が並行して進めている悪性黒色腫の免疫療法開発では、多

数の臨床試験の結果から、癌組織では、癌細胞が惹起する多様な機序による免疫抑制的環境の構築のために、患者体内で抗腫瘍免疫応答を誘導しようとする能動免疫法（癌ワクチン）では、十分な抗腫瘍効果が得られないことが判明した。しかし、癌患者の局所的また全身性の免疫抑制状態を解除することで、免疫療法の効果を大幅に改善できる可能性がある。我々は癌細胞の転移に基本的に重要

な EMT が、癌細胞の遊離や浸潤能亢進による転移促進機序だけでなく、強い免疫抑制活性により転移を促進している可能性を見いだした(Cancer Cell in revision)。本研究では、子宮体癌や子宮頸癌においても EMT が免疫抑制環境の構築に関与し、癌の悪性化、浸潤・転移の促進につながる可能性を分子・細胞学的に解明し、その結果に基づいた子宮癌に対する新しい診断法(悪性度、予後など)や治療法(EMT 細胞や発現分子を標的とした分子標的治療法や免疫療法)の可能性を検討する。

## 2. 研究の目的

本研究では子宮癌(体癌・頸癌)において、癌細胞が構築する免疫抑制がん組織環境、特に上皮・間葉転換(EMT)の意義に焦点を当てて、その可能性と分子・細胞機構を解明する。その成果に基づいて、子宮癌に対する新しい診断法(悪性度、予後診断など)や治療法(EMT 細胞や発現分子を標的とした分子標的治療や免疫療法)の開発の可能性を検討する。EMT による免疫抑制機構に関与する分子が同定できた場合、各種臨床病理学的因子との相関解析により、新規診断法のマーカーとなり得る分子を選択し、細胞発現分子は免疫染色法、分泌分子に関しては血清中測定法などの開発を検討する。血清診断法の開発は、癌の悪性度診断だけでなく、患者の免疫抑制状態の評価につながると考えられる。また、分子標的治療の標的候補分子に対して、siRNA 法や特異的阻害剤などを用いて、癌細胞の悪性形質を減弱させる可能性を検討し、免疫療法の標的候補分子に対しては、癌患者血清抗体への反応性による免疫原性を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1)子宮体癌細胞株・頸癌細胞株での EMT 関連遺伝子の発現と運動能・浸潤能の解析

子宮体癌細胞株である Hec-1b、Hec-108、SNG-2、SNG-S、SNG-W、HHUA、H00UA、AN3CA、Ishikawa 株、子宮頸癌細胞株である SKG-1、SKG-2、SKG-3a、SKG-3b、C33A、Hela、Siha 株を用いて、snail1、E-cadherin、vimentin の発現を定量的 PCR 法によって検討した。

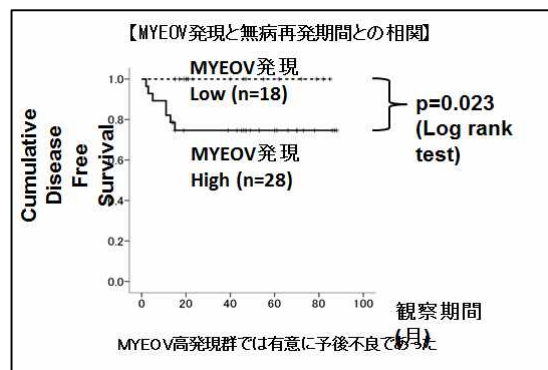
子宮体癌・頸癌細胞株で xCELLigence RTCA DP device (Roche Diagnostic) によって浸潤・転移能を検討した。

snail1 の発現調節に関与する NFκB、ERK、Wnt/b-catenin の発現について western blot 法で検討し、EMT 関連遺伝子の発現との関連を検討した。

### (2)子宮体癌における MYEOV 遺伝子の発現と機能解析

EMT は浸潤・転移能に関与する。そのため、我々は以前、子宮体癌の予後因子として同定

した MYEOV に着目した(図)。



siRNA により MYEOV 遺伝子の発現を子宮体癌細胞株 SNG - および HHUA で抑制し、増殖能と運動能に与える影響を検討した。

siRNA を用いて MYEOV の遺伝子発現を SNG-2 で抑制し、3D-gene chip (Toray) にて約 27000 種の遺伝子の発現変化を検討した。MYEOV 遺伝子を抑制した SNG2 株とコントロール株の Total RNA (0.5 μg) を用いて RNA を増幅し、この増幅 RNA を CyDye によりそれぞれ Cy3 と Cy5 で標識した。各 1 μg を混和して 3D-gene chip でハイブリダイゼーションを行い、スキャナーを用いて数値化して遺伝子発現量を測定した。これにより、EMT 関連分子および浸潤関連遺伝子の発現を検討した。

### (3)子宮頸癌における HOXD9 の発現と浸潤・転移能および EMT 関連遺伝子との関連

HOX family は DNA 結合部位 (Homeobox domain) を有し、遺伝子転写を制御する遺伝子群である。現在 23 種の遺伝子が属し、癌の増殖・浸潤・転移や抗がん剤耐性への関与が報告されている。このうち、HOXD9 は子宮頸癌で発現しているとの報告がある。このため HOXD9 の子宮頸癌での発現と臨床病理学的因子との関連、および細胞増殖に与える影響を検討することとした。

正常子宮頸部組織 10 例および広汎子宮全摘術を施行した lb1 - a 期の子宮頸癌組織 56 例 (扁平上皮癌: 26 例, 腺癌: 25 例, 神経内分泌癌: 5 例) について、HOXD9 遺伝子の発現を定量的 PCR 法で検討した。

子宮頸癌細胞株 SKG-1, SKG-2, SKG-3a, SKG-3b で shRNA によって HOXD9 の発現を抑制し、細胞増殖能に与える影響を検討した。

siRNA による HOXD9 抑制によって EMT 関連遺伝子がどのように変化するか定量的 PCR 法で検討した。

## 4. 研究成果

### (1)子宮体癌細胞株・頸癌細胞株での EMT 関連遺伝子の発現と運動能・浸潤能の解析

子宮体癌細胞株 9 株、子宮頸癌細胞株 8 株について snail1、E-cadherin、vimentin の発現を検討したところ、snail1 の発現は全ての細胞株で認められ、その発現量に大きな差

は認められなかった。一方、E-cadherin と vimentin はその発現に逆相関があり、それぞれの細胞の状態を反映していると考えられた。

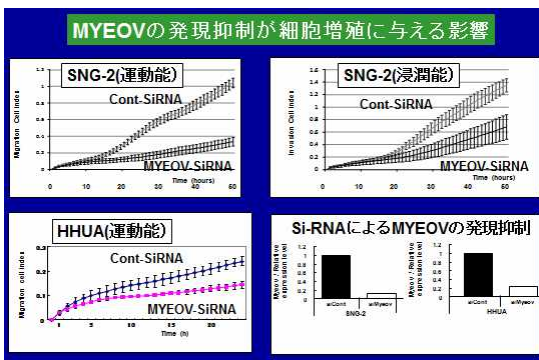
子宮体癌細胞株である Hec-1b、Hec-108、SNG-2、HHUA、H00UA、AN3CA、Ishikawa 株を用いて、xCELLigence DP システムにより、運動能および浸潤能を評価した。その結果、SNG-2 株は浸潤能・運動能をともに有し、当研究に使用することとした。

子宮頸癌細胞株である SKG-1、SKG-2、SKG-3a、SKG-3b、C33A、Hela、Siha 株を検討したところ、運動能は SKG-2 と SKG-3b が有しており浸潤能は SKG-2 が他の細胞株に比べて高かった。

snail1 の発現調節に関与する NFκB、ERK、Wnt/b-catenin などについて検討したところ、E-cadherin の発現と b-catenin の発現に相関が認められ、体癌・頸癌の EMT に GSK-3b の関与が考えられた。また同一患者から細胞の形態だけで分離・樹立した SNG-S と SNG-W について、それぞれ E 状態、M 状態が有意に観察され、細胞株を用いた解析だけでなく、患者検体での解析の重要性が示唆された。

### (2) 子宮体癌における MYEOV 遺伝子の発現と機能解析

遺伝子 MYEOV の発現を子宮体癌細胞株で siRNA により抑制し、増殖能と運動能に与える影響を検討した。siRNA により SNG2 では XX%，HHUA では YY%，MYEOV の発現が抑制された。SNG2 においては proliferation assay, migration assay および invasion assay のいずれにおいても MYEOV を抑制することで増殖能・運動能・浸潤能それぞれが低下した。migration/invasion の assay で 24 時間における値を用いて t 検定で比較すると、それぞれ有意な低下 ( $p=0.001$ ,  $p=0.026$ ) が認められた。HHUA は wild type で浸潤能を有しないため運動能のみ評価したが、HHUA において運動



能)の低下を認めた。これらの結果は MYEOV の機能が運動能・浸潤能と関連することを示している。

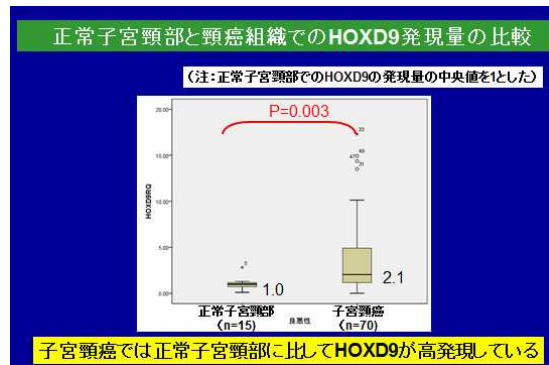
siRNA を用いて MYEOV の遺伝子発現を SNG-2 で抑制し、3D gene chip (Toray) にて

約 27000 種の遺伝子の発現変化を検討した。EMT 関連遺伝子では、Snail、Snail2、ZEB1 は約 50% に発現が低下し、Fibronectin は 4 倍に上昇した。E-cadherin および Vimentin、Twist に変化はなかった。また、浸潤・転移と関連する遺伝子のうち、2 倍以上に発現が増強したものは TGF-βR1 や IL-6 など 6 種で、50% 以下に発現低下していたものは、MYEOV のほか 5 種であった。

siMYEOVにより上昇または低下する浸潤関連遺伝子				
Enterz_ID	symbol	si Control (Normalized-Cy5)	si MYEOV (Normalized-Cy3)	Ratio(Cy3/Cy5)
<b>Down-regulated genes (&lt;0.5)</b>				
26579	MYEOV	22.84	<6.08*	<0.27
9057	SLC7A6	58.88	19.82	0.34
8613	PPAP2B	78.22	29.38	0.38
5054	SERPINE	800.73	309.46	0.39
1839	1	42.57	21.17	0.50
<b>Up-regulated genes (&gt;2.0)</b>				
7046	TGFBR1	8.77	26.87	3.06
4929	NR4A2	131.94	357.99	2.71
182	JAC1	105.72	251.83	2.38
9856	KIAA0319	10.13	22.73	2.24
3202	HOXA5	524.69	1086.52	2.07
3569	IL6	70.89	142.25	2.01

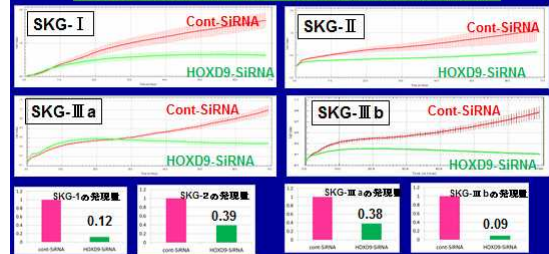
### (3) 子宮頸癌における HOXD9 の発現と浸潤・転移能および EMT 関連遺伝子との関連

子宮頸癌組織では正常頸部組織に比して有意に HOXD9 が高発現していた (中央値比 2.2 倍,  $p=0.003$ )。



子宮頸癌では正常子宮頸部に比して HOXD9 が高発現している

### HOXD9 の発現抑制が細胞増殖に与える影響



子宮頸癌細胞株で HOXD9 の発現を抑制すると、細胞増殖能が顕著に低下した。

si-RNA による HOXD9 抑制による EMT 関連遺伝子の発現を SKG-1, SKG-3, SKG-3a, SKG-3b 株検討したところ、一定の傾向は得られな



った。

子宮頸癌細胞株でHOXD9の抑制によるEMTマーカーの発現変化

	SKG1(41%抑制)		SKG2(88%抑制)		SKG3a(62%抑制)		SKG3b(91%抑制)	
	Nega	shHD9	Nega	shHD9	Nega	shHD9	Nega	shHD9
Ecadherin	1	0.276	1	1.284	1	0.278	1	0.187
Vimentin	1	0.885	1	3.043	1	1.321	1	0.756
Twist	1	3.120	1	1.165	1	0.564	1	3.040
Fibronectin	1	0.147	1	1.330	1	3.412	1	1.194
Snail	1	0.202	1	0.887	1	0.713	1	4.213
Snail2	1	0.647	1	1.316	1	0.851	1	0.606
ZEB1	1	0.958	1	1.420	1	0.761	1	1.063
Collagen4	1	0.710	1	22.211	1	0.737	1	1.775

## 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5件)

Iwata-Kajihara T, Sumimoto H, Kawamura N, Ueda R, Takahashi T, Mizuguchi H, Miyagishi M, Takeda K, Kawakami Y. Enhanced Cancer Immunotherapy Using STAT3-Depleted Dendritic cells with High Th1-Inducing Ability and Resistance to Cancer Cell-Derived Inhibitory Factors. J Immunol. 187,27-36, 2011 査読有  
Yamagami W, Susumu N, Tanaka H, Hirasawa A, Banno K, Suzuki N, Tsuda H, Tsukazaki K, Aoki D Immunofluorescence-detected infiltration of CD4+FOXP3+ regulatory T cells is relevant to the prognosis of patients with endometrial cancer. Int J Gynecol Cancer 21(2011)1628-34 査読有

Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Ueda R, Iwata-Kajihara T, Nishio H, Kawamura N, Kawakami Y. The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies. Int J Hematol. 93(2011)119-131 査読有

Sato S, Hoshino K, Satoh T, Fujita T, Kawakami Y, Fujita T, Kuwana M. RNA Helicase Encoded by Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Is a Major Autoantigen in Patients With Clinically Amyopathic Dermatomyositis Arthritis Rheum 60(2009)2372-2381 査読有

Ogawa Y, Shimmura S, Kawakita T, Yoshida S, Kawakami Y, Tsubota K. Epithelial Mesenchymal Transition in Human Ocular Chronic Graft-Versus-Host Disease. Am J Pathol.175(2009)2372-81 査読有

### 〔学会発表〕(計4件)

西尾浩、谷口智慧、住本秀敏、梅澤一夫、藤田知信、岩田卓、藤井多久磨、青木大輔、河上裕 ヒト卵巣癌におけるNF- $\kappa$ Bの活性化は免疫抑制状態を誘導する第70回日本癌学会総会 2011/10/5 名古屋国際会議場(愛知県)

西尾浩、谷口智慧、藤田知信、杉山重里、岩田卓、守井賢二、青木大輔、河上裕 NF- $\kappa$ B 阻害剤の投与はヒト卵巣癌による免疫抑制病態を改善し、腫瘍の免疫学的排除効果を増強する 第15回日本がん免疫学会総会 2011/6/30 千里ライフサイエンスセンター(大阪府)

Nishio H, Yaguchi T, Fujita T, Umezawa K, Iwata T, Fujii T, Sumimoto H, Aoki D, Kawakami Y Blockade of activated NF- $\kappa$ B in cancer and immune cells may eliminate immunosuppressive state in human ovarian cancer 第69回日本癌学会 2010/9/24 大阪国際会議場(大阪府)

岩田卓、藤田知信、守井賢二、宮崎潤一郎、西尾浩、谷口智慧、藤井琢磨、青木大輔、河上裕 卵巣癌細胞株におけるPDL1の発現とErk1/2カスケードとの関連.第39回日本免疫学会 2009/12/4 大阪国際会議場(大阪府)

### 〔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:

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/admedres/index-jp.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

藤田 知信(FUJITA TOMONOBU)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 20199334

### (2)研究分担者

河上 裕(KAWAKAMI YUTAKA)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号: 50161287

青木 大輔(AOKI DAISUKE)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号: 30167788