

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 6 月 7 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2009～2011
課題番号：	21592148
研究課題名（和文）	子宮内膜癌に対するMPAの分子標的治療薬としての機能解析とその制御の検討
研究課題名（英文）	Analysis of the role of MPA as a molecular-targeted therapy in endometrial cancer.
研究代表者	
	金村 昌徳 (Kanemura Masanori)
	大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：	40298782

研究成果の概要（和文）：子宮内膜癌における MPA の抗腫瘍効果の制御に関係する標的となり得る遺伝子を検討するのが目的であった。MPA の細胞応答はエストラジオール (E2) 感受性で分類される type1 と type2 で逆であったが、興味深いことに E2 の細胞応答は共通していた。そこで膜型 E2 受容体である GPR30 に着目したところ、両細胞株において EGFR を介した cyclin D1 の発現増加から細胞増殖作用を認めた。また、近年着目されている上皮間葉形質転換 (EMT) を検討したところ、病理組織染色、in vitro 検討において snail 増加、E-cadherin 低下、および CD24 陽性腫瘍は悪性度が強く、予後不良因子となりえることが判明したため、将来の分子標的マーカーとしての可能性を見出すことができた。

研究成果の概要（英文）：The aims of our study were to evaluate the role of MPA for the regulation of tumor progression. In type 1 endometrial cancer cell line, MPA did not activate both ERK and Akt, However, ERK and Akt were phosphorylated by MPA in type 2 cell line. Interestingly, estradiol (E2) activated ERK and Akt in both cell lines. Therefore, GPR30, a membrane receptor for E2, might be a key molecule for tumor progression in both type 1 and type 2 endometrial cancers. The activation of GPR30 was associated to tumor proliferation via up regulation of cyclin D1. Furthermore, epithelial- mesenchymal-transition (EMT) is recently identified as an important step in the invasion and metastasis of cancer. Our data indicate that reduced E-cadherin and nuclear expression of Snail and Slug have a prognostic impact in endometrial cancer. Therefore, to clarify and control of EMT signaling is a promising molecular targeting therapy in endometrial cancer.

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	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

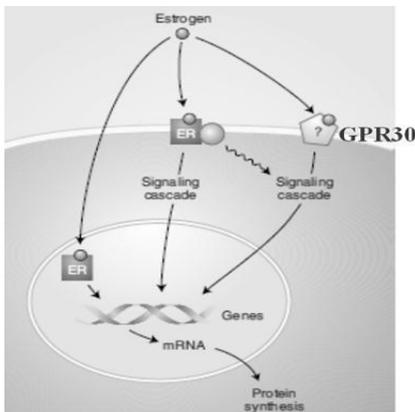
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮内膜癌、GPR30、上皮間葉形質転換、snail, slug, E-cadherin, CD24

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌に対する治療法は現在まで主治療としての手術療法、さらに補助療法として放射線療法や化学療法が一般的であるが、近年若年者の子宮内膜癌の増加に伴い、妊孕能温存が求められる症例が増加してきている。子宮内膜癌は発生の過程からエストロゲン依存性の **type1**、非依存性の **type2** に分類され、**type2** は一般に予後不良な経過をたどる。**type1**、**type2** のそれぞれの発生、進展過程についてはいまだに解明されていない。子宮温存を希望する症例の増加に伴い、治療薬の1つである **medroxyprogesterone acet(MPA)**大量療法が選択されているが、その効果は **type1** では約70%の奏功率を認めるものの約40%が再発し、**type2** ではMPAの効果についてははっきりしていないのが現状である。そこで、MPAの標的遺伝子を解明し、それを制御できれば、効果をより高めることが出来、将来の妊娠機能を残す子宮内膜癌の治療戦略につながると考えた。

E2 非感受性である **type2** の内膜癌でもしばしば **E2** に反応することを経験する。近年膜型 **E2** 受容体である **GPR30** が内膜癌患者における予後不良因子であることが報告されているが、内膜癌増殖におよぼすメカニズムは未だ不明である。



また近年急速に解明されつつある各種癌の浸潤・転移に必要な **EMT** であるが、内膜癌における **EMT** マーカーはまだ明らかとなっていない。

2. 研究の目的

子宮内膜癌におけるMPAの抗腫瘍効果の解析を **E2** の感受性で分類される **type1** と **type2** 細胞株を使用し、その制御に関係する標的となり得る遺伝子を解析する。および、**EMT** マーカーの同定し、癌の増殖・転移メカニズムを精査し、新たな内膜癌治療戦略としての標的分子同定も目的とした。

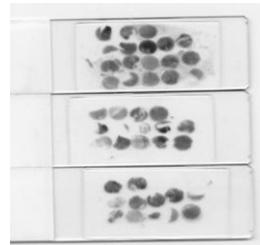
3. 研究の方法

(1) **type1** のモデルとして **Ishikawa** 株を、

type2 のモデルとして **Hec108** を用いた。**E2**、**MPA** を添加し、Akt ERk の細胞内シグナルが活性化されるか否かを **Western blotting** 法で検討した。

(2) **E2** 受容体には古典的 **Estradiol Receptor (ER)** と膜型受容体 **GPR30** が存在する。**ER** を発現していない **type2** の細胞株における **E2** の作用機序を検討するために、細胞増殖能を **MTSassay** で検討し、細胞内シグナルは **GPR30** 選択的アゴニストである **G1** を添加して **Western blotting** 法にて、**cyclin D1** 発現への関与を **ChIP assay** にて検討した。

(3) **snail** 増加と **E-cadherin** 減少は他種癌で **EMT** のマーカーとして利用されている。子宮内膜癌における **EMT** 現象が、どの程度発生し



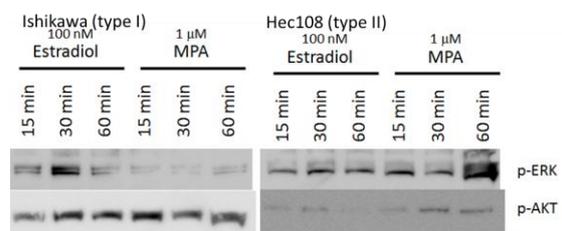
ており、臨床予後に影響しているかどうかを当院で治療した354症例の病理組織標本を用い、組織マイクロアレイを作成したのち、免疫染色を行ない、筋層浸潤、リンパ節転移、無病生存期間、全生存期間への影響についての比較を行った。

(4) 大腸癌、卵巣癌、子宮頸癌における予後不良因子として着目されている表現マーカーに **CD24** があるが、子宮内膜癌においても予後に関与するか否かを、当院で治療した354例の病理組織標本を用いて免疫染色を行ない、予後との関連を検討した。また、(3)で検討した **EMT** マーカーの発現との関連も検討した。

(5) **type2** のモデルとして **Hec108** 細胞株を用い、**CD24+** と **CD24-** を **MACS** でソーティングし、細胞の増殖能、薬剤耐性能、**mRNA** 発現の違いを検討し、子宮内膜癌治療の新たな標的分子として **CD24** が有用か否かを検討した。

4. 研究成果

(1) **Ishikawa (type1)** は **E2** 添加により **ERK** も

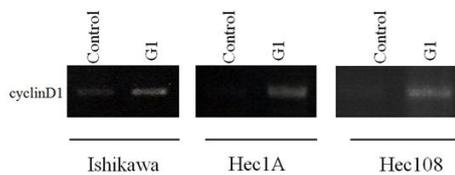


Akt もリン酸化された。一方 **Hec108 (type2)** は **E2** 添加により **ERK** はリン酸化されたが **Akt** は変化なかった。また、**MPA** で **ERK** がリン酸化された。**Type1** のみならず、**type2** の子宮内膜癌でも **E2** による細胞内シグナルの活性化を認めることが判明した。

(2) **type2** 内膜癌 (**ER** を発現していないことは基礎検討で確認している) における **E2** の反応

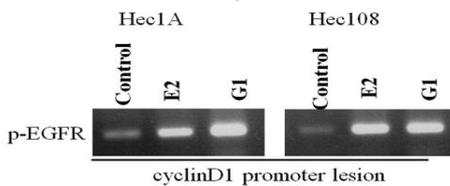
を解析するため、膜型 E2 受容体 GPR30 の洗滌的アゴニストである G1 を添加したところ、cyclin D1 の mRNA が増加した。これは type1, type2 とともに共通して認められた。

Expression of cyclin D1

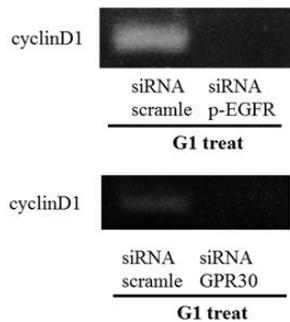


卵巣癌で報告されている、EGFR と GPR30 が結合体を形成し、cyclin D1 の promoter 領域に結合し、転写因子として働くことを検討するために、ChIP assay にて検討したところ、E2 および G1 添加で cyclin D1 の promoter 領域に EGFR が結合することを確認した。

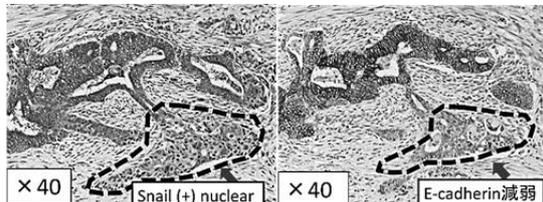
ChIP on cyclin D1



そして EGFR の siRNA および GPR30 の siRNA でそれぞれノックダウンすると cyclin D1 promoter 領域への結合が消失したことより、EGFR, GPR30 特異的結合であることが確認できた。

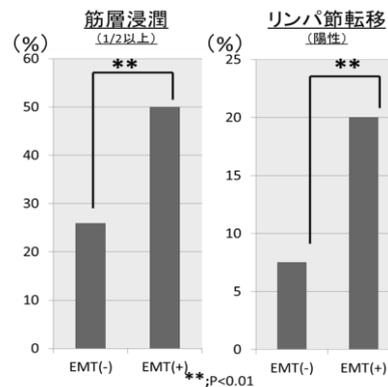
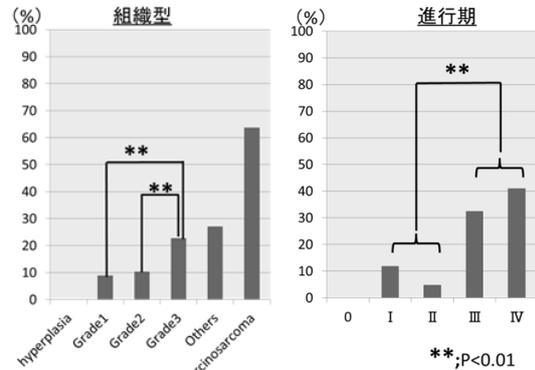


(3) 354 例の病理組織標本を Snail E-cadherin に対する抗体で免疫染色したところ、腫瘍の浸潤の先端では Snail の各染色が強発現しており、同部位は E-cadherin 発現の減弱を認めた。つまり、腫瘍浸潤の先端では EMT が起きていることが示唆された。

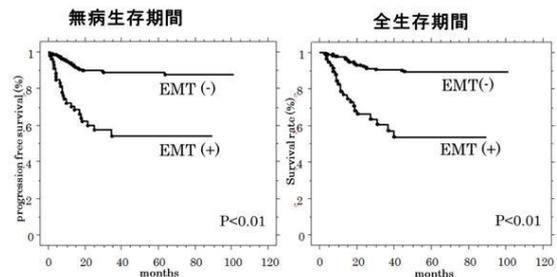


そこで、Snail+/E-cadherin-を EMT 陽性、Snail-/E-cadherin+を EMT 陰性として、組織型、進行期、筋層浸潤の有無、リンパ節転移の有無について原病巣の EMT 現象が臨床上的どのような影響を与えているのか検討した。Hyperplasia では EMT 陽性例は無く、Grade1 から 3 まで上昇するに従い陽性率は上昇した。特に carcinosarcoma では 60%の症例で EMT 陽

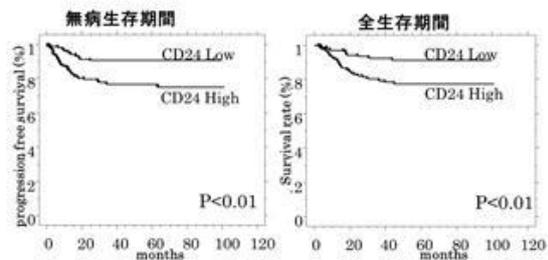
性であった。進行期による検討では I, II 期と比較し、III, IV 期で有意に EMT 陽性例が多かった。筋層浸潤およびリンパ節転移例も EMT 陽性例で高率であった。



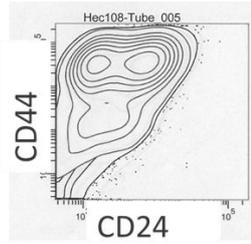
そこで、EMT+/EMT-で臨床的予後を検討したところ、無病生存期間も全生存期間も EMT+症例で有意に予後不良であった。



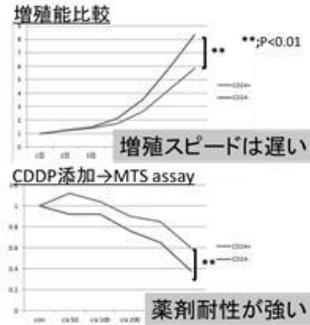
(4) CD24 抗体を用い、病理組織標本を免疫染色し、臨床的予後の検討を行なったところ、CD24 強発現 (CD24 high) 症例は CD24 弱発現 (CD24 low) 症例より有意に予後不良であることが分かった。



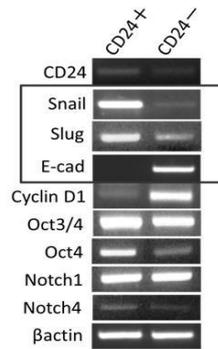
(5) type2 モデルとしての Hec108 細胞株を CD24 発現の有無でソーティングしたところ、2 峰性を示した。



そこで MACS で CD24+ と CD24- を分離し、増殖能を検討したところ、CD24+ 細胞は増殖スピードは遅いが薬剤耐性があることが判明した。



さらに CD24+ と CD24- の mRNA 発現レベルを EMT 関連遺伝子に着目して検討したところ、CD24+ 細胞では Snail, Slug の発現増加、E-cadherin の発現減少を認めた。つまり、CD24+ は EMT 化している細胞集団であることが示唆された。



この基礎検討を踏まえて、病理組織標本の CD24 染色強度と EMT マーカーの染色強度を比較したところ、CD24 強発現の部位は Snail 増強、E-cadherin 減弱を来していることが判明した。

Variables	CD24		P-value
	Low (%)	High (%)	
Snail			<0.01
Positive	13 (21.7)	47 (78.3)	
Negative	146 (49.7)	148 (50.3)	
E-cadherin			<0.01
Reduced	27 (19.1)	114 (80.9)	
Preserved	132 (62.0)	81 (38.0)	

以上より、子宮内膜癌における浸潤・転移を制御する標的分子として、EMT 化と強い関連を持つ CD24 が有力な候補としてあげられることが示唆された。現在、さらに基礎検討を重ね、drug delivery system の開発に着手し

たところである。

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 0 件)

現在作成し、投稿中

[学会発表] (計 6 件)

① 佐々木浩、金村昌徳、大道正英
「エストロゲン受容体 GPR30 の子宮内膜癌における制御機構の解明」
第 63 回日本産婦人科学会学術講演会
平成 23 年 8 月 29-31 日
大阪

② 田中良道、金村昌徳、大道正英
「子宮体癌において EMT(上皮間葉転換)は予後因子となりえるか」
第 63 回日本産婦人科学会学術講演会
平成 23 年 8 月 29-31 日
大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金村 昌徳 (Kanemura Masanori)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：40298782

(2) 研究分担者

大道 正英 (Ohmichi Masahide)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：10283764

寺井 義人 (Terai Yoshito)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：90278531

田辺 晃子 (Tanabe Akiko)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：70454543

佐々木 浩 (Sasaki Hiroshi)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：80432491