

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 1 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：	21592149
研究課題名（和文）	癌幹細胞をターゲットとした卵巣癌の白金製剤耐性機構の解明とその制御
研究課題名（英文）	Basic research of cancer stem cell for therapeutic target in cisplatin-resistant ovarian cancer.
研究代表者	
	田辺 晃子 (Tanabe Akiko)
	大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：	70454543

研究成果の概要（和文）：白金製剤耐性の再発卵巣癌では、癌細胞の集塊として作られる腫瘍の中に抗癌剤に耐性を示し、増殖能が強い細胞の存在が示唆されることからcancer stem cells (CSCs) と呼ばれる癌幹細胞が注目されている。我々はシスプラチンが卵巣癌細胞株に対し上皮間葉形質転換(EMT)化を引き起こし、一方トポテカンはその抑制することを明らかにした。

さらに、近年上皮性卵巣癌の予後不良因子として報告されている膜型のエストロゲン受容体であるGPR30に着目したところ、EMT 特異的表現型や増殖能の亢進、抗癌剤耐性化に強く関与していることが分かった。また、病理組織標本を用い免疫染色で検討すると、GPR30発現とEGFR発現を組み合わせたことにより有意に予後不良因子となることが判明したため現在論文作成中である。

研究成果の概要（英文）：Epithelial-mesenchymal-transition (EMT) is recently identified as a important step in the invasion, metastasis, and chemo-resistance of cancer. We investigated whether topotecan increase the efficacy of cisplatin in *in vitro* and *in vivo* ovarian cancer models. Topotecan significantly inhibited the cisplatin-induced Akt activation, and regulated EMT-related factors in cisplatin-resistant ovarian cancer cell line. Furthermore, G protein-coupled receptor 30 is a 7-transmembrane estrogen receptor that functions alongside traditional estrogen receptors to regulate cellular responses to estrogen. In our studies suggested that GPR30 expression is linked to EMT phenotype, aggressive proliferation, and multiple drug resistance. Immunohistochemical examination revealed that expression of both GPR30 and EGFR contributes lower survival rates in epithelial ovarian 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	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

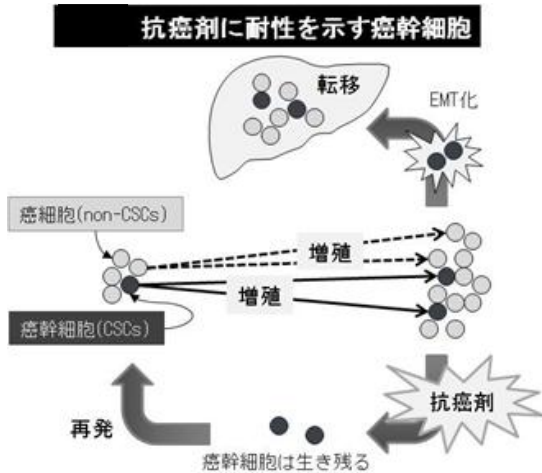
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・婦人科腫瘍学

キーワード：上皮性卵巣癌、抗癌剤耐性、Akt-mTOR-HIF, VEGF, EMT, GPR30, EGFR

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は生存率が最も低い婦人科癌である。その理由として、当初抗がん剤に感受性を示していてもしだいに耐性を示す場合が多いことが考えられる。卵巣癌治療における白金製剤耐性化解除のメカニズムを解明することと、卵巣癌の特徴的な進展様式である腹膜播種転移のメカニズムを解明し制御することが可能となれば、難治性卵巣癌の新たな治療戦略と成り得る。

1) 近年、癌細胞における cancer stem cells (CSCs) : 癌幹細胞が注目されている(下図)。



そして、これら CSCs は、non CSCs と比較して、細胞の増殖能や浸潤能が高いことが知られており、癌の浸潤転移に大きな役割を持っている可能性がある。また一方、癌細胞の転移浸潤過程において、癌細胞の細胞間接着を失い、一定の細胞形態を持って基底膜上に配列している上皮系の細胞がその細胞極性を失い、間葉系細胞に変化し、間質内へ浸潤し転移する現象として上皮・間葉形態転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) が注目されており、CSCs が浸潤転移する過程において、多くの細胞が EMT の現象を起こしていると考えられている。

2. 研究の目的

CSCs (cancer stem cells) をターゲットとした卵巣癌の白金製剤耐性化メカニズム解明とそれらをターゲットとする分子標的治療に向けた基礎的および臨床的検討を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) シスプラチン感受性卵巣癌細胞株 A2780 および耐性株 Caov-3 を使い、シスプラチン (CDDP)、トポテカン (TPT) 添加による細胞内シグナル伝達は Western Blotting 法で、EMT 関連遺伝子の発現は PCR 法で、EMT 化に関与する HIF-1alpha の関与は ChIP assay で検討した。

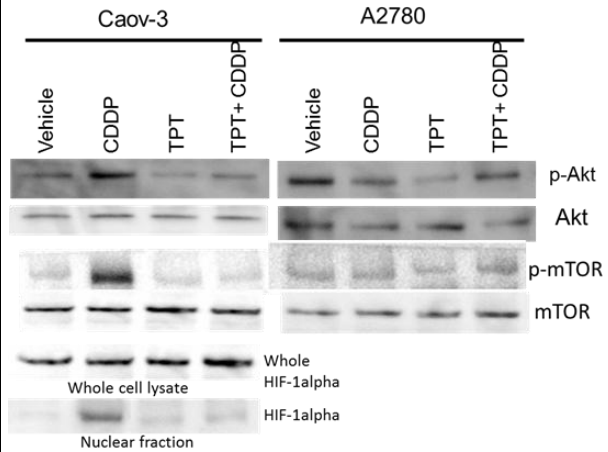
(2) TPT による CDDP-induced EMT の抑制とそれに伴う腫瘍縮小現象を、卵巣癌モデルマウスを用いて検討した。

(3) GPR30 の発現が卵巣癌患者の予後に関与するか否か、病理組織を用いて免疫染色を行ない検討した。

(4) GPR30 が卵巣癌の EMT に関与することを、GPR30 発現ベクターを作成し、強制発現させて検討した。また、TGF-beta を添加し、EMT 関連タンパクの発現量を Western Blotting 法で、遺伝子発現を PCR 法で検討した。

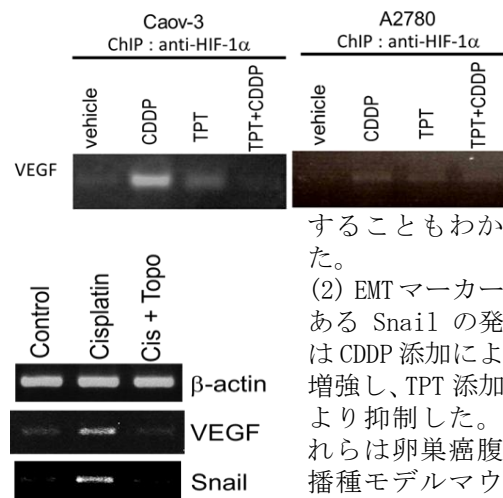
4. 研究成果

(1) 抗癌剤耐性卵巣癌 (Caov-3) では CDDP 添加で Akt がリン酸化され、mTOR-HIF1alpha の



活性化を認めた。一方 TPT を添加することですべて抑制された。さらに HIF-1alpha の下流について検討したところ、VEGF の発現に関与しており、抗癌剤耐性癌において CDDP 添加による VEGF 発現の増強が抗癌剤耐性化のメカニズムの一つと考えられた。

TPT は VEGF 発現を抑制し、抗腫瘍効果を発揮

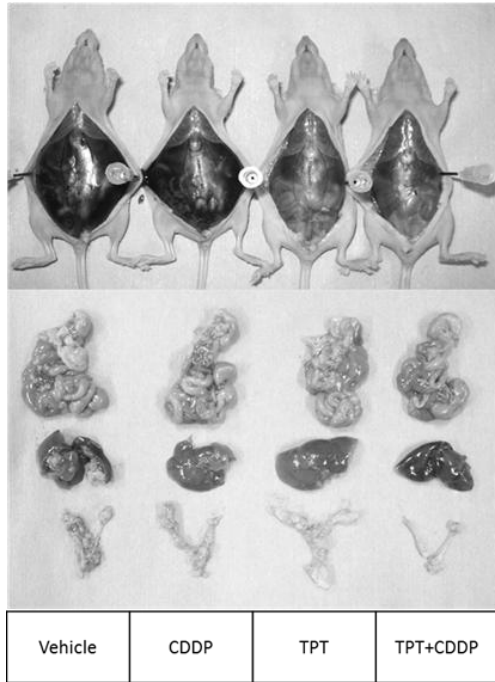


することもわかった。

(2) EMT マーカーである Snail の発現は CDDP 添加により増強し、TPT 添加により抑制した。これらは卵巣癌腹膜播種モデルマウスによる in vivo 検

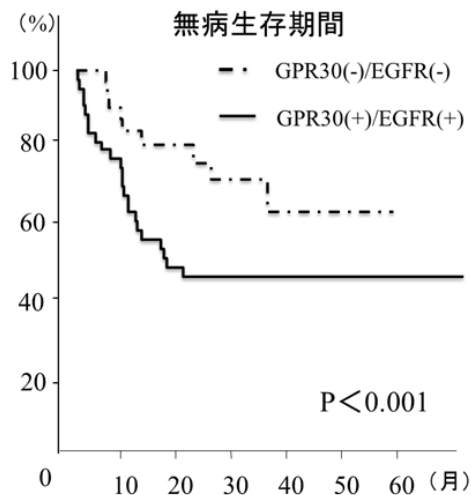
討において、CDDP+TPT 同時投与により抗癌剤

感受性を取り戻すことを再確認した。

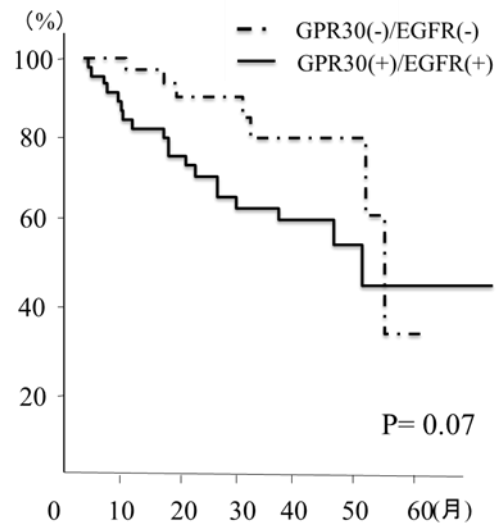


つまり、抗癌剤耐性化卵巣癌における CDDP 耐性化は VEGF 発現増強と EMT 化現象が病態であり、TPT はそれらを抑制し、CDDP 感受性を取り戻す可能性がある」と結論付けられた。

(3) 卵巣癌において、GPR30 はその下流シグナルに Src, HB-EGF を有し、EGFR の活性化に関与することが報告されている。そこで我々は GPR30 と EGFR の発現が、卵巣癌における予後因子として関与するか否かを検討した。卵巣癌患者 168 例の病理組織を用い、GPR30 と EGFR を免疫染色し、染色の有無による予後との相関を検討した。無病生存期間において、GPR30(-)/EGFR(-) と比較し、GPR30(+)/EGFR(+) は有意に短縮を認めた。全生存期間においても GPR30(+)/EGFR(+) は短縮の傾向を認めた。



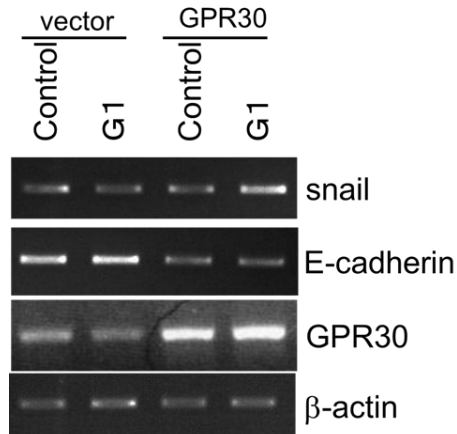
全生存期間



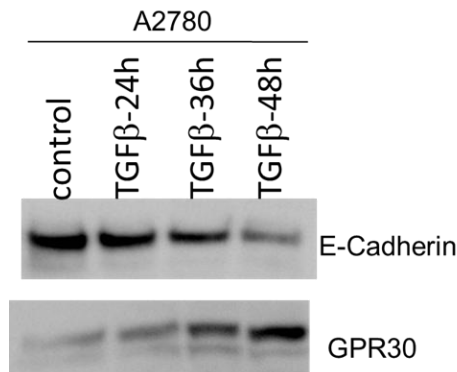
(4) 卵巣癌における GPR30 の役割を検討するため、GPR30 の発現ベクターを強制発現させ、GPR30 の agonist である G1 を添加し EMT 関連因子の mRNA 発現を検討した。

GPR30 を過剰発現するだけで E-cadherin mRNA の減少を認め、G1 添加で snail mRNA の増加を認めた。

さらに、EMT 惹起作用を持つ TGF-beta を添加



し、GPR30 の発現が変化するか否かを検討したところ、TGF-beta により E-cadherin の減少と比例するように GPR30 の発現増加を認めた。



つまり、GPR30 は卵巣癌において予後不良因子であり、癌細胞の EMT 化に関与しているのがその理由の一つであると考えられた。よって、GPR30 は難治性卵巣癌の新しい分子標的としての可能性があると考えられた。

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 3 件)

①Tanaka Y(代表), Tanabe A(共同)

「Prognostic effect of epidermal growth factor receptor gene mutations and the aberrant phosphorylation of Akt and ERK in ovarian cancer.」

Cancer Biology & Therapy (査読あり)

11 巻 2011、50-57

PMID: 21057220

②Tsunetoh S(代表), Tanabe A(共同)

「Topotecan as a molecular targeting agent which blocks the Akt and VEGF cascade in platinum-resistant ovarian cancers.」

Cancer Biology & Therapy (査読あり)

10 巻 2010、1137-1146

PMID: 20935474

[学会発表] (計 9 件)

①藤原聡枝(代表)、田辺晃子 (共同演者)

「卵巣癌におけるエストロゲン受容体 GPR30 および ER/PR の発現と臨床病理学的意義」

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寺井義人(代表)、田辺晃子 (共同演者)

「婦人科癌と EMT」

第 50 回日本婦人科腫瘍学会学術集会

平成 23 年 5 月 20-22 日

北海道

6. 研究組織

(1)研究代表者

田辺 晃子 (Tanabe Akiko)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：70454543

(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

金村 昌徳 (Kanemura Masanori)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：40298782

佐々木 浩 (Sasaki Hiroshi)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：80432491