

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 4 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21689045

研究課題名（和文）難治性卵巣癌における上皮間葉転換に基づくオンコジェニックストレス耐性のメカニズム

研究課題名（英文）The EMT and its associated metastatic potential induced by microenvironmental oncogenic stress in refractory ovarian cancer

研究代表者

梶山 広明 (Hiroaki Kajiyama)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00345886

研究成果の概要（和文）：卵巣癌の転移浸潤における新規上皮間葉転換(EMT)誘導転写因子を同定した。ALX-1 あるいは PLAG2 が卵巣癌の腹膜播種形成に促進的な影響を及ぼしていることを明らかにした。さらに、薬剤耐性化卵巣癌における EMT 発現と転移浸潤能亢進には microRNA (miR-200c) を介する新規メカニズムを明らかとした。腹膜播種・進展には中皮 (Cancer associated mesothelial cell: CAM) -卵巣癌細胞間の相互 EMT 化に基づく微小環境の重要性が明らかとなった。新規 EMT 誘導転写因子を分子標的とすることによって腹膜播種あるいは薬剤耐性卵巣癌に対する治療に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We identified the novel EMT inducible transcriptional factor associated with the metastasis/invasion of ovarian cancer. Of these, ALX-1 and PLAG2 positively influenced the formation of peritoneal metastasis. Furthermore, in drug-refractory ovarian cancer model, we clarified the novel mechanism via microRNA (miR-200) in the link between enhanced metastatic capability and EMT. Furthermore, it was demonstrated that EMT in mesothelial cells, as well as carcinoma cells also play a crucial role in the development of peritoneal dissemination. Our current study suggested the EMT inducible factor targeting therapy may lead to a new approach for the treatment of progression to the peritoneum and drug-resistance of 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	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2010 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2011 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	21,100,000	6,330,000	27,430,000

研究分野：婦人科腫瘍学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：上皮間葉転換 (EMT)、卵巣癌、腹膜播種、薬剤耐性抗癌剤、転写因子

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌はその解剖学的構造より腹腔内転移を生じやすく、診断時にすでに周辺臓器へ浸潤していることが多い。抗癌剤は有効な治療であるが、多くの場合、薬剤耐性の腫瘍が

再発する。卵巣癌のこのような悪性転換や転移浸潤には上皮間葉形質転換(EMT)が深く関与していることを我々はこれまで明らかにしてきた。特に2種の細胞膜型アミノペプチダーゼの発現パターンによって、卵巣癌細胞

は CD13^{high}CD26^{low} 発現の間葉系形態／高浸潤性／低薬剤感受性のタイプか、あるいは CD13^{low}CD26^{high} 発現の上皮様形態／低浸潤性・高薬剤感受性のタイプに大別できることをこれまで明らかにした。さらに CD13^{high}CD26^{low} 型細胞への CD26 を過剰発現、CD13 のノックダウンによって間葉上皮転換 (MET) とタキソール感受性亢進を認めた。すなわち、これらの結果から、卵巣癌では、本質的に EMT、特に EMT 誘導転写因子が腹膜播種形成や抗薬剤耐性に促進的に機能している可能性と、逆に抗薬剤に対する獲得耐性が生じた結果、EMT 誘導転写因子などの発現亢進から EMT が誘導され“Metastatic potential”を二次的に有していくという二つの可能性が示唆された。

一方で卵巣癌にかかわらず、放射線照射が照射部位の縮小と共に二次的な転移を誘導することがあるのはよく知られた事実である。上記を敷衍すると、癌細胞は抗薬剤を初めとした放射線、低酸素、および低栄養状態などの細胞ストレスにさらされると、EMT を生じることによってよりストレスのない組織環境へエスケープしていく構図が予想される。従って、これらの“Metastatic potential”と“Chemo-Resistance”は互いに EMT というキーワードで双方向性リンク存在が想定された。

2. 研究の目的

本研究では微小なオンコジェニックストレスの重積が EMT を誘導し卵巣癌の腹膜転移を促進しているという仮説を検証するものである。具体的には以下の疑問点を明らかにすることである。1) : 本研究での第一義の目的は卵巣癌特異的 EMT 転写因子を同定すること、及び 2) : “Oncogenic stress-resistance”と“Metastatic potential”とが互いに EMT というキーワードで双方向的にリンクするかどうか自然耐性モデルと獲得耐性モデルにおいて明らかとすることである。

具体的な研究目的は以下の二項目に焦点を置いた。I) 卵巣癌が腹膜播種という転移形式を解剖学的にも生物化学的にも取りやすいわけであるが、卵巣癌により特異的な EMT 誘導転写因子は何であるのか探索すること、特に EMT 誘導転写因子の発現が“Oncogenic stress”抵抗性に対していかに関連し、影響を及ぼすか？ さらに、もともと薬剤感受性が比較的高い卵巣癌でも、再燃・再発を繰り返すことによって多剤耐性に至り、その後、急激に転移巣の増加を認めることを臨床面でよく経験する。従って II) ストレス耐性化した難治性再発・再燃卵巣癌では EMT が亢進しているか否か？ EMT 誘導転写因子が細胞レベルで浸潤能、運動能あるいは組織レベルで転移能亢進に関与してい

るか否か？という項目である。上記の二項目に渡る多角的研究により、“Stress-Resistance” ⇔ “EMT” ⇔ 腹膜播種の相互リンクの全体像を明らかにすることである。さらに、最終的には EMT 誘導転写因子を分子標的とすることによって“Stress-Sensitive”を誘導し難治性卵巣癌の新規治療法開発を目指すことを本研究の最大目的とする。

3. 研究の方法

(1) EMT という現象をより深く認識し、in vitro 実験モデルを構築するため、卵巣癌の転移形成に関与する新たな EMT 誘導転写因子同定に関する基礎研究を行った。すなわち、Oncomine DNA アレイのデータベースを用いて卵巣癌で発現が上昇している転写因子を探索した。そして癌で発現が亢進している転写因子を 48 個に絞り込み、さらに網羅的 siRNA ノックダウン機能解析によって候補遺伝子を同定した。それらの新規転写因子を用いて EMT ⇒ “Oncogenic stress”の流れに関する機能解析を行った。

(2) 我々はこれまで卵巣漿液性腺癌 NOS-2 細胞において adriamycin, vincristine, プラチナ製剤 (2 種), パクリタキセルの計 5 種類の耐性株を、また SKOV-3 細胞、HEY 細胞においてパクリタキセル耐性細胞株を樹立してきた。“Oncogenic stress”に対する獲得耐性 ⇒ EMT (⇒ 二次転移) を誘導する難治性再発卵巣癌における EMT の役割を探求するために耐性株を用いて上記機能・メカニズム解析を行った。上記系を用い、臨床上の再発・再燃卵巣癌に対処すべく分子標的治療の可能性を追求した。

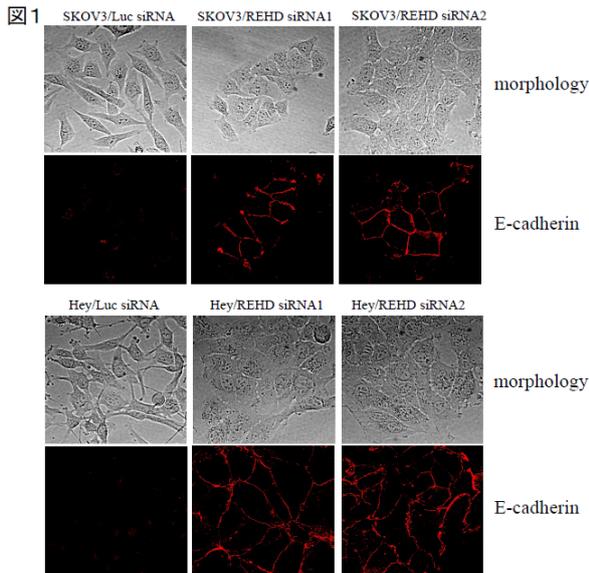
(3) 本研究の副次的検討項目として卵巣癌が腹膜播種する際の Counterpart 細胞である腹膜中皮細胞の EMT に注目して腹膜播種の微小環境制御メカニズムを探求した。

4. 研究成果

(1) ES-2 細胞は線維芽細胞様の形態であるが、ZNF91, ZNF142, ZNF154 などの遺伝子に対する siRNA を導入することで、EMT が誘導され、上皮様の形態へと変化した。また、ALX1, TRIM29, PLAGL2, HOXB7 など遺伝子に対する siRNA の導入により、細胞骨格の形成が促進され、細胞の浸潤が顕著に抑制されることが明らかとなった。特に本科学研究費執行期間において、ALX1, 及び PLAGL2 に着目した。

(2) 2 種の ALX1 に対する siRNA を卵巣漿液性腺癌由来の ES-2 細胞、または SKOV3 細胞に導入すると、細胞の形態が上皮細胞様となる

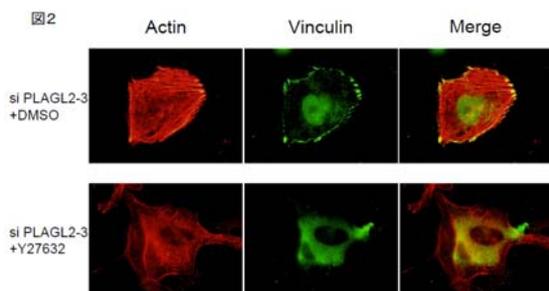
とともに、E-cadherin の発現亢進が観察された (図 1)。



ALX1 の発現低下により、細胞浸潤能および Oncogenesis の低下がみられた。さらに、上皮細胞である MCF10A 細胞に ALX1 を過剰発現すると、形態が線維芽細胞様となり、E-cadherin 発現が低下した。これらのことから、ALX1 は細胞形態の変化、および E-cadherin 発現に重要な役割をはたしており、EMT を制御する重要な因子であると考えられた。さらに、ALX1 の EMT 制御メカニズムを検討したところ、ALX1 の発現抑制が Snail 発現を抑制し、また、ALX1 は Snail のプロモーター領域を活性化することが Luciferase assay にて確認できた。従って ALX1 は Snail の発現を介して、EMT を制御していると推測された。

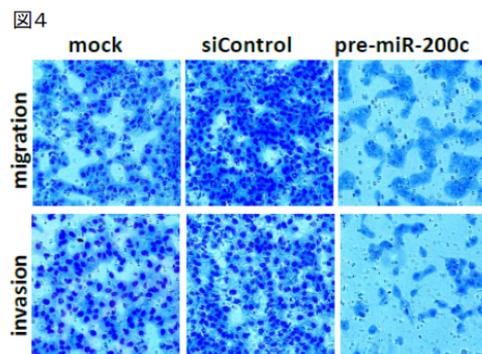
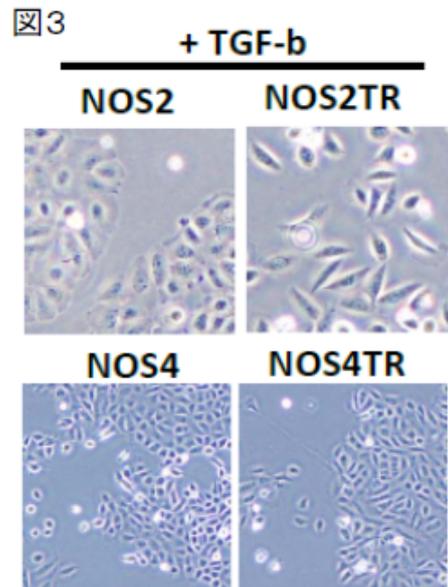
ALX1 の発現が Snail 発現に特異的依存することによって EMT を促進し、卵巣癌の腹膜播種を促進すること、および抗癌剤耐性回復や転移・浸潤抑制に向けた分子標的になりうることを見いだしたことは本研究の多大な成果であった。

(3) Zinc-finger protein である PLAGL2 が卵巣癌細胞の新規 EMT 誘導転写因子になりうることを見いだした。ES2 細胞において PLAGL2 siRNA により、Actin stress fiber と Focal



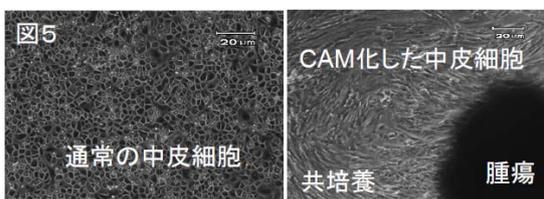
adhesion の形成促進を伴う形態変化及び浸潤能の低下を認めた。さらに PLAGL2 を抑制した ES2 細胞に Rho/ROCK inhibitor を加えると、Stress fiber、Focal adhesion が消失した (図 2)。すなわち、PLAGL2 は Actin stress fiber と Focal adhesion の形成を促進することにより転移浸潤を亢進させ、この根底のメカニズムには Rho pathway の積極的関与が明らかとなった。

(4) タキサン系抗癌剤特異的耐性株 NOS2TR, NOS3TR, NOS4TR では微小環境において分泌される TGF- β によってその EMT 性が亢進した (図 3)。EMT が誘導された卵巣癌細胞株に pre-miR200c を導入するとその浸潤性が抑制された (図 4)。すなわち、耐性化細胞における EMT の根底には micro-RNA による調節制御機構の存在が示唆された。また、TGF- β はもともと CD13^{high}CD26^{low}型の高転移性卵巣癌細胞から分泌が亢進しているものの、CD13^{low}CD26^{high}発現パターンの NOS2 細胞では autocrine 分泌が低レベルである。しかしながら、薬剤耐性化に伴いその基礎分泌能が亢進しでありこれら耐性細胞自身からも



autocrine 分泌が亢進していた。すなわち TGF- β autocrine loop が相乗効果的播種促進機構の本態である可能性が示唆された。

(5) 卵巣癌の腹膜播種を想定する場合には、腫瘍のみならず腹膜側の Counterpart である腹膜中皮細胞の存在も考慮に入れなくてはならない。今回、我々は腫瘍の分泌する TGF- β によって腹膜中皮が EMT 化し、腫瘍の腹膜播種をサポート (腫瘍-中皮間の接着能亢進) するメカニズムを示唆できた。また、中皮が CAM (Cancer associated mesothelial cell) 化することによって中皮細胞は CD13^{low}CD26^{high}→CD13^{high}CD26^{low} 化し、腫瘍-中皮の接着が亢進することも明らかにした。すなわち、CAM の本質は EMT 化であり、本来生体防衛的な中皮が腫瘍の味方にさせられるという構図が想定された (図5)。



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 20 件)

以下全て査読有り

- Mitsui H, Shibata K, Kajiyama H, (15人中6番目). Functional interaction between peritoneal mesothelial cells and stem cells of ovarian yolk sac tumor (SC-OYST) in peritoneal dissemination. *Gynecol Oncol.* 2012;124(2):303-10.
- Maeda O, Shibata K, Kajiyama H, (10人中6番目). Spectrin α II and β II tetramers contribute to platinum anticancer drug resistance in ovarian serous adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2012 ;130(1):113-21.
- Sekiya R, Kajiyama H, (10人中2番目). Expression of CXCR4 indicates poor prognosis in patients with clear cell carcinoma of the ovary. *Hum Pathol.* 2012 (in press)
- Kajiyama H, Shibata K, (9人中1番目). Long-term survival of young women receiving fertility-sparing surgery for ovarian cancer in comparison with those undergoing radical surgery. *Br J Cancer.* 2011 ;105(9):1288-94
- Higashi M, Kajiyama H, (10人中2番目). Survival impact of capsule rupture in stage I clear cell carcinoma of the ovary in comparison with other histological types. *Gynecol Oncol.* 2011 ;123(3):474-8.
- Umez T, Shibata K, Kajiyama H, (6人中3番目). Glypican-3 expression predicts poor clinical outcome of patients with early-stage clear cell carcinoma of the ovary. *J Clin Pathol.* 2010 ;63(11):962-6.
- Sakurai M, Shibata K, Umez T, Kajiyama H, (8人中4番目). Growth-suppressing function of glypican-3 (GPC3) via insulin like growth factor II (IGF-II) signaling pathway in ovarian clear cell carcinoma cells. *Gynecol Oncol.* 2010 ;119(2):332-6.
- Inaba T, Ino K, Kajiyama H, (10人中3番目). Indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts impaired survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy. *Gynecol Oncol.* 2010 ;117(3):423-8.
- Kajiyama H, Shibata K, (6人中1番目). The expression of dipeptidyl peptidase IV (DPPIV/CD26) is associated with enhanced chemosensitivity to paclitaxel in epithelial ovarian carcinoma cells. *Cancer Sci.* 2010 ;101(2):347-54.
- Umez T, Shibata K, Kajiyama H, (9人中4番目). Gene silencing of glypican-3 in clear cell carcinoma of the ovary renders it more sensitive to the apoptotic agent paclitaxel in vitro and in vivo. *Cancer Sci.* 2010;101(1):143-8.

[学会発表] (計 14 件)

- Kajiyama H. Impact of capsule rupture in stage I clear-cell carcinoma of the ovary. The 14th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility (17-20 Nov. 2011 Paris, France).
- Kajiyama H, Shibata K, Suzuki S, Ino K, Nawa A, Kawai M, Nagasaka T, Kikkawa F. Does selecting the fertility-sparing surgery in young women with stage I ovarian cancer lead to a poorer survival outcome? International Gynecologic Cancer Society 13th Biennial Meeting (Prague, 2010).

- 10.23-26)
3. Hirosawa T, Kajiyama H, Sekiya R, Shibata K, Kikkawa F. Is There Survival Benefits Performing Retroperitoneal Systemic Lymphadenectomy in Advanced Epithelial Ovarian cancer? International Gynecologic Cancer Society 13th Biennial Meeting (Prague, 2010. 10.23-26)
 4. Sekiya R, Kajiyama H, Sakai K, Higashi M, Umezumi T, Shibata K, Yamamoto E, Nawa A, Kikkawa F. Expression of CXCR4 Predicts Poor prognosis of Patients with Clear Cell Carcinoma of the Ovary. International Gynecologic Cancer Society 13th Biennial Meeting (Prague, 2010. 10.23-26)

〔図書〕 (計6件)

1. Ino K, Shibata K, Yamamoto E, Kajiyama H, Nawa A, Mabuchi Y, Yagi S, Minami S, Tanizaki Y, Kobayashi A, Kikkawa F. Curr Cancer Drug Targets. 2011;11(4):405-11.
2. 梶山広明、吉川史隆 婦人科がん化学療法ハンドブック 中外医学社「再発癌に対する化学療法」
3. 梶山広明. 卵巣癌の腹膜播種機構の解明～がんにとって中皮は“味方”となりうるか?～ 日本婦人科腫瘍学会雑誌 Vol.28 No.1 2010

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：卵巣癌治療装置

発明者：堀 勝、吉川史隆、梶山広明ほか

権利者：国立大学法人名古屋大学

種類：特許

番号：特許第 100087723 号

出願年月日：24年1月31日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/obgy/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

梶山 広明 (Kajiyama Hiroaki)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00345886