

## 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 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22659300

研究課題名（和文） 卵巣癌幹細胞は卵巣癌細胞の「iPS 化」により生じるか

研究課題名（英文） Can we produce ovarian stem cells by gene expression of Yamanaka factors to ovarian cancer cell lines?

研究代表者

小阪 謙三 (KOSAKA KENZO)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：90359828

研究成果の概要（和文）：

多分化能を發揮させる遺伝子の発現が、卵巣癌の発生や幹細胞の同定、化学療法抵抗性に関連している可能性があると考え、山中 4 因子の卵巣癌での発現、および卵巣癌細胞株に山中 4 因子を発現させることによる変化を検討した結果、卵巣未熟奇形腫の未分化な部分に山中 4 因子のひとつである OCT4 が発現することを見出した。

また、この研究の過程において、卵巣癌の転移に関しては TGF- $\beta$  経路が重要な役割を果たしている可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）： Ovarian cancer is characterized by its early metastasis and peritoneal dissemination. Their prognosis is very bad among other gynecological malignancies. So, we need to clarify the mechanism of pathogenesis and metastasis. We found the expression of OCT4, which is one of Yamanaka factors. We are aimed to detect changes of ovarian cancer cell lines by gene expression of Yamanaka factors. We also present the possibility of the important role of TGF- $\beta$  pathway for the metastasis of ovarian cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	0	1,500,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

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：卵巣癌、幹細胞、iPS

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は、早期より腹腔内転移という形で進行癌となる、婦人科癌のうち最も予後不良で治療法のさらなる開発を必要とする癌である。また、発生母地も、上皮性、胚細胞性など多様で生物学的特性も異なり、自ずから治療法も異なるはずである。特に、上皮性卵

巣癌では、一時的には化学療法が著効し肉眼的病変が消失しても、一定の時間経過とともに再発し化学療法抵抗性となることが比較的多い。また、腹腔内転移の制御も大きなテーマである。これらの問題を根本的に解決するためには、卵巣癌の発生・転移のメカニズムについてのさらなる基礎的研究、また卵巣

癌幹細胞の探索が不可欠であると考えられた。

## 2. 研究の目的

卵巣癌は、発生源地も、上皮性、胚細胞性など多様で生物学的特性も異なり、自ずから治療法も異なるはずである。特に、上皮性卵巣癌では、一時的には化学療法が著効し肉眼的病変が消失しても、一定の時間経過とともに再発し化学療法抵抗性となることが比較的多い。また、腹腔内転移の制御も大きなテーマである。これらの問題を根本的に解決するためには、卵巣癌の発生・転移のメカニズムについてのさらなる基礎的研究、また卵巣癌幹細胞の探索が不可欠であると考えられた。

## 3. 研究の方法

今回、われわれは癌の多分化能に着目して研究を行った。多分化能を発揮させる遺伝子の発現が卵巣癌の発生や幹細胞の同定、化学療法抵抗性の獲得に関連している可能性があると考えられるため、この仮説をさらに発展させ、卵巣癌細胞株に山中4因子を発現させることによる変化を検討し、卵巣癌の発生、幹細胞の同定、化学療法抵抗性獲得のメカニズムを解き明かす鍵を見出すべく研究を行った。

具体的には、第一に、当施設の倫理委員会の承認を得て、当科で手術を行い文書で同意の得られた11例の卵巣原発の未熟奇形腫（G1:2例、G2:4例、G3:5例）についてOCT4, PAX6, および神経細胞のマーカーであるCD56の免疫組織学的検討を行った。

第二に、卵巣癌の転移のメカニズム解明を目的とし、卵巣癌の原発巣88例と大網播種性転移巣38例のマイクロアレイデータをwebsiteより入手し、山中4因子のひとつであるMycを含む7つのシグナル経路(Ras, Beta-catenin, Src, TNF-a, TNF-b, E2F, Myc)の活性をbinary regression法により解析し、続いて、当科で手術を行い文書による同意を得られた卵巣癌原発巣と大網転移巣のペア解析が可能であった13例をTGFBR2とリン酸化SMAD2の免疫組織染色によって解析、さらに、TGF-b1あるいはTGFBR2キナーゼ阻害剤A-8301の添加による、マウス卵巣癌細胞株HM-1のin vitro増殖、浸潤、接着、遊走に与える影響を検討、合わせて当施設倫理委員会の承認を得て、HM-1細胞株の腹膜播種in vivoモデルを用い、A-8301腹腔内注入による治療効果を検討した。

## 4. 研究成果

今回、われわれは癌の多分化能に着目して研究を行い、まず、卵巣未熟奇形腫の未分化な部分にiPS細胞作製に必要な山中4因子のひとつであるOCT4が発現することを見出した。

具体的には、OCT4は卵巣未熟奇形腫のG3では、5例すべて、G2では4例中2例の未熟な神経上皮成分において発現が見られたが、G1の2例では発現していなかった。OCT4陽性症例ではOCT4陽性の神経上皮のロゼットと隣接してPAX6陽性のロゼットが存在していた。CD56は成熟神経成分と一部の未熟神経成分において陽性であったが、OCT4陽性の細胞では陰性であった。

すなわち、OCT4は高グレードの未熟奇形腫の未熟神経上皮の一部にのみ発現しており、PAX6, CD56の発現様式とも考え合わせると、病理学的に「未熟な神経上皮成分」と診断される組織中にも、実際にはさまざまな分化段階の細胞が含まれていると考えられた。OCT4の発現は細胞の全能性の維持に必須であることから未熟神経細胞の多分化能を反映していると考えられる。この知見より、OCT4の免疫染色により、高グレードの未熟奇形腫にのみ存在する、より未熟な神経成分を鑑別することが可能であり、未熟奇形腫の悪性度の診断に有用であると考えられた。

第二の知見は、卵巣癌の転移に関して、TGF-b経路が重要な役割を果たしている可能性を示したことである。

卵巣癌は婦人科で最も予後不良な疾患であり、その腹膜への播種性転移は重要な予後因子である。その分子機序を解明し、分子標的治療の開発を目的として解析を行った結果、原発巣に比して転移巣で有意に活性が亢進していたのはTGF-b経路だけであった(p<0.0001)卵巣・大網転移巣のペアの比較ではTGFBR2およびリン酸化SMAD2の発現は大網転移巣で有意に増強していた(p<0.01)TGF-b1はHM-1細胞の浸潤、接着、遊走を有意に亢進し、A-8301は有意に抑制した(p<0.05)が、両者とも増殖には影響を与えなかった。A-8301は卵巣癌腹膜播種モデルマウスの生存期間を有意に延長した(p<0.05)。

以上の結果から卵巣癌播種性転移巣ではTGF-b経路が活性化しており、その阻害剤は卵巣癌の転移を抑制し予後改善に寄与する可能性がある結論した。

## 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6件)

- ① 万代昌紀、岡本尊子、松村謙臣、ほか「エンドメトリオーシスと卵巣癌 子宮内膜症から発生する卵巣癌の生物学、日本エンドメトリオーシス学会会誌 32,39-42,2011. 査読有り DOI :該当なし
- ② 万代昌紀、馬場 長、松村謙臣、ほか【婦人科がんのMolecular Biology】 cancer stem cell、産科と婦人科 78、95-100、2011. 査読なし DOI :該当なし
- ③ 万代昌紀、鈴木彩子、松村謙臣、ほか【卵巣がんに関する最新トピックス】 卵巣類内膜腺癌 update、産婦人科の実際 59、1485-92、2011. 査読なし DOI :該当なし
- ④ Hamanishi J, Mandai M, Abiko K, et al The comprehensive assessment of local immune status of ovarian cancer by the clustering of multiple immune factors. Clin Immunol 141、338-47,2011. 査読有り DOI:10.1016/j.clim.2011.08.013
- ⑤ Mandai M, Matsumura N, Baba T, et al Ovarian clear cell carcinoma as a stress-responsive cancer: influence of the microenvironment on the carcinogenesis. Cancer Lett. 310、129-33,2011. 査読有り DOI: 10.1016/j.canlet.2011.06.039
- ⑥ Matsumura N, Huang Z, Mori S, et al Epigenetic suppression of the TGF-beta pathway revealed by transcriptome profiling in ovarian cancer. Genome Res. 21,74-82,2011. 査読有り DOI: 10.1101/gr.108803.110
- [学会発表] (計 8 件)
- ① 万代昌紀、山口 建、松村謙臣、ほか卵巣明細胞腺癌に対する分子標的療法の展望－臨床試験実施の可能性を探る」 「卵巣明細胞腺癌に特異的に発現する遺伝子群 OCCC signature の同定とその応用 第 8 回 婦人科がん会議平成 23 年 11 月 11-12 日那覇 全日空ホテルズ ラグナガーデンホテル
- ② Yamaguchi K, Mandai M, Matsumura N, et al COMPREHENSIVE METHYLATION ANALYSES REVEAL SYNCHRONOUS HYPOMETHYLATION OF HNF1 NETWORK GENES IN OVARIAN CLEAR CELL CARCINOMA 2nd Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology (ASGO) 平成 23 年 11 月 3-5 日 Ritz Carlton Hotel, Seoul, Korea
- ③ Abiko K, Mandai M, Hamanishi J, et al PD-L1 expression on mouse ovarian cancer cells promotes tumor survival in ascites and tumor progression 第 70 回 日本癌学会学術総会平成 23 年 10 月 3-5 日名古屋市 名古屋国際会議場
- ④ Yamaguchi K, Mandai M, Hamanishi J, et al The carcinogenic environment characterizes ovarian clear cell carcinoma via coordinate epigenetic modifications 第 70 回 日本癌学会学術総会平成 23 年 10 月 3-5 日名古屋市 名古屋国際会議場
- ⑤ Yamaguchi K, Mandai M, Matsumura N, et al GENOME-WIDE METHYLATION ANALYSES REVEAL HNF1 NETWORK GENES ARE SYNCHRONOUSLY HYPOMETHYLATED IN OVARIAN CLEAR CELL CARCINOMA The 17th ESGO International Meeting of European Society of Gynaecological Oncology (ESGO) 平成 23 年 9 月 11-14 日 Milan Convention Center (MIC), Milan, Italy
- ⑥ 山口 建、万代昌紀、松村謙臣、ほか「Identification of an ovarian clear cell carcinoma gene signature that reflects inherent disease biology and the carcinogenic processes 卵巣明細胞腺癌において、マイクロアレイ解析により特徴付けられる生物学的特性は特有の発癌環境を反映している」第 63 回日本産科婦人科学会学術集会 平成 23 年 8 月 29-31 日 大阪国際会議場
- ⑦ 万代昌紀、山口 建、松村謙臣、ほか「特異的遺伝子発現の解析から示唆される卵巣明細胞腺癌の生物学的特性」第 50 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会、平成 23 年 7 月 22-24 日 札幌市 札幌コンベンションセンター
- ⑧ 山口 建、万代昌紀、松村謙臣、ほか「卵巣明細胞腺癌において、HNF1 パスウェイ遺伝子は低メチル化を介したエピジェネティクスにより活性化されている」第 10 回 日本婦人科がん分子標的研究会学術集会、平成 23 年 7 月 2 日 島根 松江しんじ湖温泉ホテル一畑

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

小阪 謙三 (KOSAKA KENZO)  
京都大学・医学研究科・講師  
研究者番号：90359828

### (2) 研究分担者

松村謙臣 (MATSUMURA NORIOMI)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：20452336

### 研究分担者

濱西 潤三 (HAMANISHI JYUNZO)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：80378736