

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592469

研究課題名(和文)子宮内膜症の線維化・癌化における治療標的分子としてのRCAS1の意義

研究課題名(英文)Significance of RCAS1 as targeted molecular therapy in fibrosis and the canceration of the endometriosis

研究代表者

城田 京子 (SHIROTA, Kyoko)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：70441756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症は月経痛・不妊・異常妊娠・卵巣癌と、女性の生涯に多大な影響をもたらす。本研究では、子宮内膜症の疼痛の原因となり、がんへ進展する足がかりとなる「線維化」に関与すると考えられる分子RCAS1の作用機序を解明することを目的とした。子宮内膜症患者の腹水中にはRCAS1が高濃度に存在し、重症度との関連性が示唆された。子宮内膜症間質細胞を用いた3次元培養において、RCAS1の癒痕形成作用が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Endometriosis can affect a woman's whole life, in terms of pelvic pain, infertility, abnormal pregnancy and ovarian cancer. The aim of this study is to provide a clue to elucidate the molecular mechanisms underlying the endometriosis related pain and canceration. We have investigated RCAS1 receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells) as a beneficial target molecule for the treatment of endometriosis in the future. High level of RCAS1 concentration in ascites was revealed in the case of rAFS (Revised American Fertility Society) classification stage IV. In the collagen gel contraction assay, RCAS1 clearly caused significantly decrease the areas of gel surface. Although its putative mechanisms remain undefined, this research suggested a possibility that RCAS1 is involved in endometriosis-associated fibrosis. Further exploration of RCAS1 biological function will facilitate development of novel therapeutic strategies for endometriosis that does not depend on estrogen.

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：子宮内膜症 RCAS1

1. 研究開始当初の背景

女性の 10-30%に発生する子宮内膜症は、重度の月経困難症や不妊症の原因となることはよく知られている。近年の晩婚化・少子化は、女性の生涯におけるエストロゲン曝露期間を延長させるため、子宮内膜症の罹患率は上昇している。一方、子宮内膜症は卵巣癌の発生母地として注目されるようになり、子宮内膜症性卵巣嚢胞の約 1%が癌化すること、その多くが化学療法の無効な明細胞腺癌であること、そして特に日本人で好発することが報告されている。

最近の研究で、子宮内膜症の発症と進展に関わる分子として、receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1)が注目されてきた。RCAS1 は子宮頸癌細胞株 (SiSo 細胞)から単離された分子で、がん細胞では増殖シグナルを活性化し、腫瘍免疫を抑制する。我々は RCAS1 が、子宮頸癌のみならず種々の悪性腫瘍の癌標的分子であることを、報告してきたが、子宮内膜症に対する標的分子としての研究は全く行われていなかった。

2. 研究の目的

子宮内膜症の増殖・線維化と癌化に RCAS1 が関わることを明らかにし、子宮内膜症や、子宮内膜症に起因する難治性卵巣癌治療における標的分子として RCAS1 の妥当性を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

RCAS1 関連分子から癌治療標的分子となる分子を同定することを目的として、卵巣癌の前癌病変である子宮内膜症における RCAS1 の作用機構の解明を行った。

(1)腹水中 RCAS1 と子宮内膜症に関する研究

子宮内膜症患者とコントロールとして骨盤内に子宮内膜症病変がなく、他の組織型の良性卵巣腫瘍を有する患者から得られた検体を使用して RCAS1 ELISA kit (Cusabio Biotech 社)で解析を行った、さらに、病変の広がりによって肉眼的に評価する rAFS (the revised American Fertility Society) に基づいて評価した子宮内膜症の重症度と腹水中の RCAS1 濃度を比較した。

(2) 子宮内膜症・卵巣癌組織における RCAS1 の局在

免疫組織学を用いて、ヒトの子宮内膜症・卵巣癌組織における RCAS1 の局在を調べた。

(3) 子宮内膜症の癒痕形成の mechanism に関する癒痕化の in vitro モデル(3次元培養)による検討

子宮内膜症性嚢胞間質細胞を患者から同意を得て分離・培養し、type I collagen 溶液 (Nitta gelatin 社)内に  $3 \times 10^5/ml$  の濃度になるよう懸濁した。次に 35mm dish に

2ml ずつ分注し、37 度で 2 時間培養してゲル化させた後、タッピングによってして dish からゲルを浮遊させ、10%ウシ血清を添加した DMEM 1ml を加え 48 時間 3 次元培養した。培養後写真撮影して培養液に RCAS1 を添加することによる収縮率の変化とゲル内の細胞の形態的变化を比較検討した。

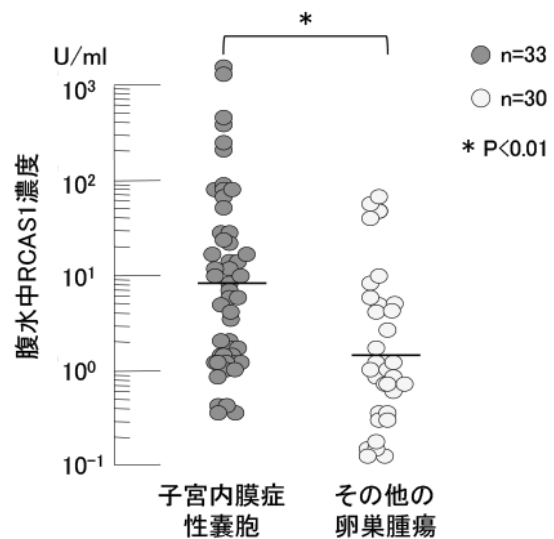
(4) 発現アレイによる RCAS1 作用発現に関わる分子の解析

(3)で用いた細胞から抽出した mRNA を用いて、cDNA マイクロアレイにより遺伝子発現の網羅的解析を行った。

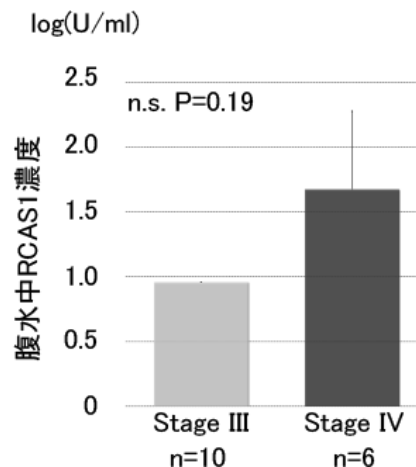
4. 研究成果

(1)腹水中 RCAS1 と子宮内膜症に関する研究

子宮内膜症患者の腹腔内環境を知るために、子宮内膜症性嚢胞とその他の良性卵巣腫瘍患者において腹水中の RCAS1 濃度を検討したところ、子宮内膜症の患者では腹水中の RCAS1 濃度が有意に高かった。



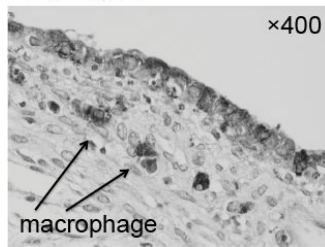
さらに、子宮内膜症の患者を重症度によって階層化したところ、rAFS stage III の患者に比べ、重症度の高い stage IV の症例では、腹水中 RCAS1 濃度が高い傾向であったが有意差はなかった。



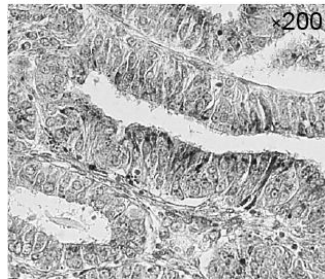
(2) 子宮内膜症・卵巣癌組織における RCAS1 の局在

子宮内膜症性嚢胞では、全く染色されないものと、強陽性に染色されるものに2分された。また、組織が強陽性に染色ものでは、腹水中 RCAS1 の値も高いことがわかった。子宮内膜症性嚢胞では、子宮内膜症腺上皮細胞が染色され、間質は染色されなかった。悪性腫瘍では子宮内膜症腺上皮細胞と間質が染色された。また、いずれの組織でも、間質に浸潤したマクロファージが濃染されており、従来の報告と同様に、RCAS1 が免疫系と関わることを示唆された。

子宮内膜症

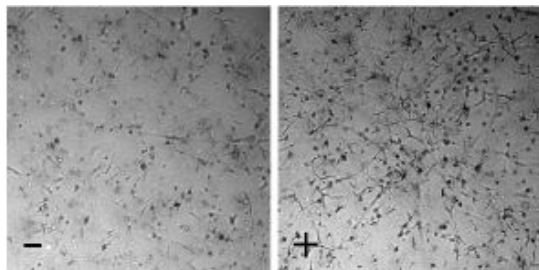
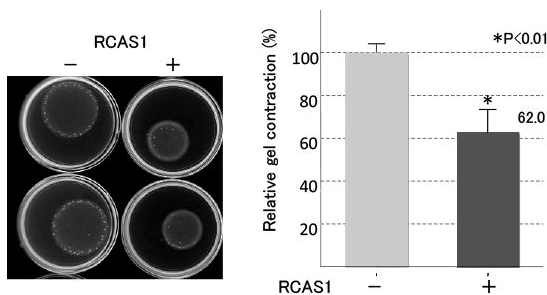


類内膜腺癌



(3) 子宮内膜症の癒痕形成の mechanism に関する癒痕化の in vitro モデル(3次元培養)による検討

培養液に RCAS1 を添加した場合、ゲルの収縮が有意に亢進した。形態学的には間質細胞が繊維芽細胞様に変化していることが確認された。



(4) 発現アレイによる RCAS1 作用発現に関わる分子の解析

培養細胞を発現アレイで解析した結果、間質細胞に RCAS1 を添加すると、神経系、免

疫系、上皮性腺癌関連遺伝子を中心に発現増強が認められ、現在この中から再現性・特異性よく出現する遺伝子を個々に解析中である。

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 20 件)

1. Kato T, Miyata K, Sonobe M, Yamashita S, Tamano M, Miura K, Kanai Y, Miyamoto S, Sakuma T, Yamamoto T, Inui M, Kikusui T, Asahara H, Takada S. Production of Sry knockout mouse using TALEN via oocyte injection. Scientific Reports 査読有 2013; 3:3136

2. Yotsumoto F, Tokunaga E, Oki E, Maehara Y, Yamada H, Nakajima K, Nam SO, Miyata K, Koyanagi M, Doi K, Shirasawa S, Kuroki M, Miyamoto S. Molecular hierarchy of heparin-binding EGF-like growth factor-regulated angiogenesis in triple-negative breast cancer. Mol Cancer Res. 査読有 2013; 11: 506-17.

3. Ueda T, Maehara M, Takahashi Y, Nakayama N, Kondo H, Shirota K, Yoshizato T, Miyamoto S. Clinical significance of cell-free and concentrated ascites re-infusion therapy for advanced and recurrent gynecological cancer. Anticancer Res. 査読有 2012; 32: 2353-7.

4. Fukuoka M, Hamasaki M, Koga K, Hayashi H, Aoki M, Kawarabayashi T, Miyamoto S, Nabeshima K. Expression patterns of emmprin and monocarboxylate transporter-1 in ovarian epithelial tumors. Virchows Arch. 査読有 2012; 461: 457-66.

5. Nojiri T, Yoshizato T, Fukami T, Obama H, Yagi H, Yotsumoto F, Miyamoto S. Clinical significance of amphiregulin and epidermal growth factor in colostrum. Arch Gynecol Obstet. 査読有 2012; 286: 643-7.

6. Tsunoda T, Ota T, Fujimoto T, Doi K, Tanaka Y, Yoshida Y, Ogawa M, Matsuzaki H, Hamabashiri M, Tyson DR, Kuroki M, Miyamoto S, Shirasawa S. Inhibition of phosphodiesterase-4 (PDE4) activity triggers luminal apoptosis and AKT dephosphorylation in a 3-D colonic-crypt model. Mol Cancer. 査読有 2012; 11: 46.

7. Miyata K, Yotsumoto F, Nam SO, Kuroki M, Miyamoto S. Regulatory mechanisms of the

HB-EGF autocrine loop in inflammation, homeostasis, development and cancer. *Anticancer Res.* 査読有 2012; 32: 2347-52. Review.

8.Ota T, Doi K, Fujimoto T, Tanaka Y, Ogawa M, Matsuzaki H, Kuroki M, Miyamoto S, Shirasawa S, Tsunoda T. KRAS up-regulates the expression of miR-181a, miR-200c and miR-210 in a three-dimensional-specific manner in DLD-1 colorectal cancer cells. *Anticancer Res.* 査読有 2012; 32: 2271-5.

9.Kasai N, Kobayashi K, Shioya S, Yoshikawa Y, Yotsumoto F, Miyamoto S, Mekada E, Enokizono J. Soluble heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) detected by newly developed immuno-PCR method is a clear-cut serological biomarker for ovarian cancer. *Am J Transl Res.* 査読有 2012; 4: 415-21

10.Hikita S, Yotsumoto F, Fukami T, Horiuchi S, Sanui A, Miyata K, Nam SO, Tsujioka H, Ueda T, Shirota K, Yoshizato T, Maeda K, Ishikawa T, Okuno Y, Kuroki M, Mekada E, Miyamoto S. Assessment of HB-EGF levels in peritoneal fluid and serum of ovarian cancer patients using ELISA. *Anticancer Res.* 査読有 2011; 31: 2553-9.

11.Shirota K, Ota T, Tsujioka H, Miyamoto S. Uterine inversion due to a leiomyoma on postpartum day 41: a case report. *J Obstet Gynaecol Res.* 査読有 2011; 37:897-900.

12.Naganuma Y, Choijamts B, Shirota K, Nakajima K, Ogata S, Miyamoto S, Kawarabayashi T, Emoto M. Metronomic doxorubicin chemotherapy combined with the anti-angiogenic agent TNP-470 inhibits the growth of human uterine carcinosarcoma xenografts. *Cancer Sci.* 査読有 2011; 102: 1545-52.

13.Shirota K, Nagata Y, Honjou K, Tsujioka H, Yoshizato T, Miyamoto S. Involvement of antacentromere antibody in interference with oocyte meiosis and embryo cleavage. *Fertil Steril.* 査読有 2011; 95:2729-31.

14.Miyamoto S, Iwamoto R, Furuya A, Takahashi K, Sasaki Y, Ando H, Yotsumoto F, Yoneda T, Hamaoka M, Yagi H, Murakami T, Hori S, Shitara K, Mekada E. A novel anti-human HB-EGF monoclonal antibody with multiple antitumor mechanisms against ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res.* 査読有 2011; 17: 6733-41.

15.Tsujioka H, Fukami T, Yotsumoto F, Ueda T, Hikita S, Takahashi Y, Kondo H, Kuroki M, Miyamoto S. A possible clinical adaptation of CRM197 in combination with conventional chemotherapeutic agents for ovarian cancer. *Anticancer Res.* 査読有 2011; 31: 2461-5.

16.Emoto M, Sadamori R, Hachisuga T, Kawarabayashi T, Miyamoto S. Clinical usefulness of contrast-enhanced color Doppler ultrasonography in invasive and noninvasive gestational trophoblastic diseases: a preliminary study. *J Reprod Med.* 査読有 2011; 56: 224-34.

17.Choijamts B, Naganuma Y, Nakajima K, Kawarabayashi T, Miyamoto S, Tachibana K, Emoto M. Metronomic irinotecan chemotherapy combined with ultrasound irradiation for a human uterine sarcoma xenograft. *Cancer Sci.* 査読有 2011; 102:452-9.

18.Tsujioka H, Yotsumoto F, Hikita S, Ueda T, Kuroki M, Miyamoto S. Targeting the heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in ovarian cancer therapy. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 査読有 2011 Feb; 23: 24-30.

19.Koshikawa N, Mizushima H, Minegishi T, Eguchi F, Yotsumoto F, Nabeshima K, Miyamoto S, Mekada E, Seiki M. Proteolytic activation of heparin-binding EGF-like growth factor by membrane-type matrix metalloproteinase-1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Sci.* 査読有 2011; 102: 111-6.

20.Masumoto K, Kai H, Oka Y, Otake R, Yoshizato T, Miyamoto S, Hirose S, Hamasaki M, Nabeshima K, Iwasaki A. A case of cystic biliary atresia with an antenatally detected cyst: the possibility of changing from a correctable type with a cystic lesion (I cyst) to an uncorrectable one (IIId). *Pediatr Surg Int.* 査読有 2011; 27: 99-102

〔学会発表〕(計 10 件)

1.宮本新吾: 医療イノベーションを目指したがん治療の創薬開発 東京大学医科学研究所特別講演会 (東京) 2013 年 2 月 4 日

2.宮本新吾: シンポジウム 卵巣癌を対象とした分子標的治療薬BK-UMの臨床開発 2012 年日台癌のトランスレーショナル研究シンポジウム 2012 年 11 月 21 日

3. Shirota K, Honjou K, Toman H, Nakayama N, Ito H, Nagata Y, Miyamoto S : Dienogest (DNG) treatment enhances the follicular amount of human chorionic gonadotrophin (hCG) in patients with severe endometriosis 2ND ASIAN CONFERENCE ON ENDOMETRIOSIS (Istanbul, Turkey) 2012年11月9-11日

4. 宮本新吾 : 医療イノベーションを目指したがん治療の創薬開発～HB-EGF を標的とした新規卵巣癌治療薬～北関東婦人科がん講演会 (埼玉県) 平成 24 年 5 月 25 日

5. 城田京子、中山直美、津野晃寿、奈須家栄、榎原久司、園田顕三、宮本新吾 : 子宮内膜症における RCAS1 の発現と癒痕化に対する作用 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 (兵庫県) 平成 24 年 4 月 13-15 日

6. Shirota K : Changes in the treatment of endometriosis in the last 6 years in our department 6th AAGL International Congress on Minimally Invasive Gynecology Osaka Dec. 9-11, 2011年12月9-11日

7. 城田京子 : 当科における過去6年間の子宮内膜症治療の変遷第24回日本内視鏡外科学会 (大阪府) 平成 23 年 12 月 7-9 日

8. Miyamoto S : Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a novel targeting molecule for ovarian cancer therapy HSUM International conference on Medical Molecular Biology Mongolia 2011年7月8日

9. Shirota K : Involvement of anti-centromere antibody in interference with oocyte meiosis and embryo cleavage HSUM International conference on Medical Molecular Biology Mongolia 2011年7月8日

10. 城田京子、中山直美、宮本新吾 : 当科における子宮内膜症治療の現状 第68回日本生殖医学会九州支部会 (福岡県) 平成 2011 年 4 月 2 4 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)  
国内外の別: 国内

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

城田 京子 (SHIROTA, Kyoko)  
福岡大学・医学部・講師  
研究者番号: 70441756

### (2) 研究分担者

宮本 新吾 (MIYAMOTO, Shingo)  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号: 40209945

### (3) 連携研究者

斎藤 臣雄 (SAITO, Tamio)  
独立行政法人理化学研究所・ケミカル  
バイオロジー研究基盤施設・支援促進  
チーム チームヘッド  
研究者番号: 40260228

園田 顕三 (SONODA, Kenzo)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号: 30294929