

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：13901
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24390380
 研究課題名(和文) EMTを標的とする、微少環境ストレス誘導転移の解明と克服～卵巣癌の予後向上へ～

 研究課題名(英文) Clarification of microenvironment-stress induced metastasis and its targeting approach in ovarian cancer

 研究代表者
 梶山 広明 (KAJIYAMA, HIROAKI)

 名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

 研究者番号：00345886

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は卵巣癌により特異性のあるEMT誘導転写を分子標的とすることによって"ストレス抵抗性" "感受性"を誘導し難治性卵巣癌の新規治療法開発を目指したものである。ALX-1/4とストレス(主として薬剤耐性)誘導EMTの中心となるZEB1について機能解析を行った。その結果、高転移性・薬剤耐性卵巣癌においてHOXB13/SLUGおよびALX4/SLUG軸がEMTおよび浸潤の促進の新たな経路を発見した。さらにZEB1ノックダウン薬剤耐性化高転移性卵巣癌細胞の腹膜転移形成能はコントロールと比較し有意に抑制され、予後延長に寄与するという基礎的データの構築につながった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to generate new therapeutic approach targeting EMT-induced transcriptional factors specific for ovarian cancer (OC). We show that two homeoproteins, HOXB13 and ALX4, are associated with EMT and invasion of OC cells. HOXB13 and ALX4 formed a complex in cells and exogenous expression of either protein promoted EMT and invasion. Knockdown of HOXB13 or ALX4 suppressed SLUG expression and exogenous expression of either protein promoted SLUG expression. Finally we showed that SLUG expression was essential for the HOXB13- or ALX4-mediated EMT and invasion. Our results show that HOXB13/SLUG and ALX4/SLUG axes are novel pathways that promote EMT and invasion of OC cells. Furthermore, in the current study, we showed the role of ZEB1, a member of zinc-finger E-box binding homeobox (ZFH) family, in metastasis and chronic paclitaxel resistance in OC.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 腹膜播種 上皮間葉転換 薬剤耐性 腹膜中皮細胞 転写因子

1. 研究開始当初の背景

上皮性卵巣癌は腹膜転移やリンパ行性転移を起こしやすく、婦人科悪性腫瘍の中でも予後不良な癌種の一つである。手術で病変を除去することが重要であるが、細胞レベルの病変に対しては既存の抗癌剤を中心とした化学療法に依存している。長期間にわたる化学療法の継続中に突然の多発転移を認めることがある。難治性卵巣癌において転移抑制と同時に薬剤感受性を増強あるいは回復することは予後の改善に関して最も重要な課題であるが、個々の研究者によって断片的に研究されてきたのが現状である。

癌細胞は抗癌剤や放射線などにさらされると、大部分はアポトーシスを生じ死滅したとしても、その一部は上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition : 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。抗癌剤や放射線、低酸素、および活性酸素などの微小環境ストレスが"転移原性ストレス"となり EMT をリクルートして、より"Metastatic"に、そしてより"ストレス抵抗性"に変化する可能性が見えてくる。

2. 研究の目的

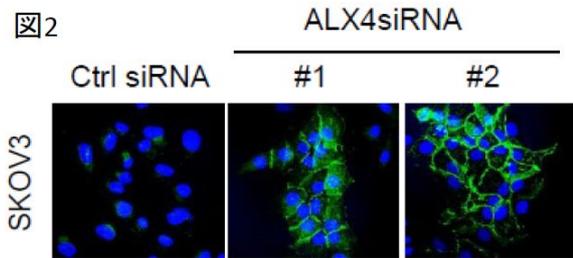
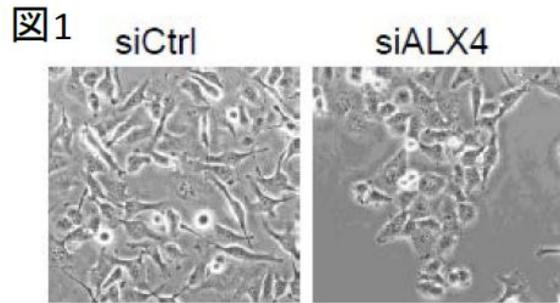
上記の背景を受けて、本研究での第一義の目的は腫瘍にとって微小環境ストレスが EMT を介してどのように転移原性となりうるのか？そして卵巣癌における EMT、特に EMT 誘導転写因子の発現が抗腫瘍薬、放射線感受性などの微小環境ストレスに抵抗性に対していかに関連し、影響を及ぼすかを明らかにすることである。さらに、もともと薬剤感受性が比較的高い卵巣癌でも、再燃・再発を繰り返すことによって多剤耐性に至り、その後、急激に転移巣の増加を認めることを臨床面でもよく経験する。従って難治性再発・再燃卵巣癌ではストレス耐性化に伴って、微小環境からのエスケープのために卵巣癌特有な EMT 転写因子を介した EMT をいかに利用しているのか？という項目である。さらに、それらを分子標的とすることによって"ストレス抵抗性" "感受性"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最大の研究目的とした。

3. 研究の方法

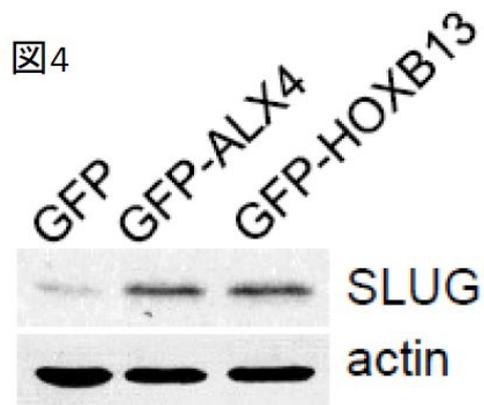
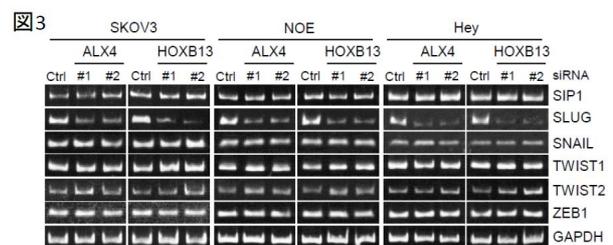
本研究 2 つの研究テーマから成り立つ。第 1 に卵巣癌特有な EMT を誘導する EMT 転写因子である ALX-1/4 とストレス(主として薬剤耐性)誘導 EMT の中心となる ZEB1 について機能解析を行った。第 2 に ALX-1 や ZEB1 を初めとした EMT 誘導転写因子の発現亢進性を獲得した高転移性卵巣癌細胞が各種微小環境ストレス抵抗性をいかに獲得していくのか、そしてそれらのノックダウンが広範囲な腹膜播種を抑制しうるか *in vitro*, *in vivo* の両系で解析した。

4. 研究成果

我々はすでに ALX1 が Snail 発現の調節を通じて EMT 決定因子として機能していることを見いだしてきたが、その上流因子は不明であった。第 1 に、ALX3 および ALX4 という二つ ALX1 homologues が EMT および卵巣癌の転移浸潤に中心的役割を果たすことを明らかにした。SKOV3 細胞に siRNA を導入し ALX4 の発現を抑制すると、EMT の上皮マーカーである E-cadherin の発現亢進とともに、MET (Mesenchymal-Epithelial-Transition) が観



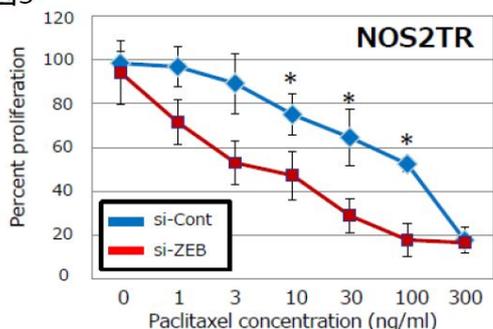
察された (図 1-2)。さらにこの遺伝子を SKOV3 に強制発現させると、E-cadherin の発現が低下し、N-cadherin、Vimentin などの EMT マーカータンパク質の発現が亢進し、EMT が誘導されるメカニズムを明らかにした。*in vitro* invasion assay と colony forming



assay による機能解析の結果、ALX4 発現と浸潤性 / 非足場依存増殖能がポジティブにリンクしていることを明らかとした。また、ALX4 の遺伝子発現抑制により、Slug の発現が抑制され、逆に、ALX4 の強制発現により Slug の発現は亢進するという EMT 転写因子同士の双方向性リンクが示唆された (図 3-4)。さらに HOXB13 と ALX4 は複合体を形成し、これらの相互作用が Slug の発現の調節メカニズムであることが判明した。高転移性・薬剤耐性卵巣癌において HOXB13/SLUG および ALX4/SLUG アクシスが EMT および浸潤の促進の新たな経路を発見した。

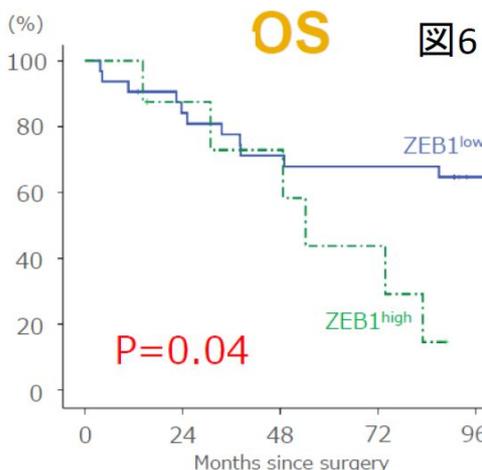
第 2 に ZEB1 および EMT 誘導因子 TGF- β に注目し、薬剤耐性化した卵巣癌が二次的な転移・薬剤耐性を獲得するメカニズムを検討した。結果的に、NOS2TR/NOS3TR 細胞(パクリタキセル耐性卵巣癌細胞)では、(1) ZEB1 ノックダウンによる転移能低下および抗癌剤感受性の上昇が観察された (図 5)。またそのメカニズムとして、MET の誘導および Akt 活性の抑制によるアポトーシスの関与が示唆された。(2) TGF- β 添加により、NOS2TR/NOS3TR 細胞は ZEB1 の発現とともに

図5



に EMT が誘導され、p-smad2 および TGF β -R1 発現の亢進を認めた。これより薬剤耐性卵巣癌は親株と比較し、TGF- β シグナル経路が活性化され、EMT の誘導を通じて、転移能が亢進するメカニズムが示唆された。

さらに *in vivo* では ZEB1 ノックダウンによる stable shRNA ベクターを作成し、動物実験における腹膜播種能を検討した。その結果、コントロールと比較し ZEB1 ノックダウン薬剤耐性化高転移性卵巣癌細胞の腹膜転移形成能は有意に抑制され、全生存率の延長につ



ながった。(3) 臨床検体を用いた実際の卵巣癌患者の腫瘍における ZEB1 発現は予後不良性と有意に相関していた (図 6: 全生存期間)。現在これらの結果を踏まえて最終的な論文作成を進めている。これらの一連の結果から薬剤 (ストレス) 耐性誘導性の EMT が sudden metastasis に重要な役割を担っており、詳細なメカニズム解明とともにその障害が予後延長に寄与するという基礎的データの構築につながった。

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 7 件)

Yuan H, Kajiyama H, Ito S, Chen D, Shibata K, Hamaguchi M, Kikkawa F, Senga T. HOXB13 and ALX4 induce SLUG expression for the promotion of EMT and cell invasion in ovarian cancer cells. *Oncotarget*. 2015 (in press) 査読有

Luo C, Shibata K, Suzuki S, Kajiyama H, Senga T, Koya Y, Daimon M, Yamashita M, Kikkawa F. GPC3 expression in mouse ovarian cancer induces GPC3-specific T cell-mediated immune response through M1 macrophages and suppresses tumor growth. *Oncol Rep*. 2014 Sep;32(3):913-21. 査読有
doi: 10.3892/or.2014.3300.

Sekiya R, Maeda M, Yuan H, Asano E, Hyodo T, Hasegawa H, Ito S, Shibata K, Hamaguchi M, Kikkawa F, Kajiyama H, Senga T. PLAGL2 regulates actin cytoskeletal architecture and cell migration. *Carcinogenesis*. 2014 Sep;35(9):1993-2001. 査読有
doi: 10.1093/carcin/bgu081.

Sugiyama K, Kajiyama H, Shibata K, Yuan H, Kikkawa F, Senga T. Expression of the miR200 family of microRNAs in mesothelial cells suppresses the dissemination of ovarian cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2014 Aug;13(8):2081-91. 査読有
doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0135.

Yuan H, Kajiyama H, Ito S, Yoshikawa N, Hyodo T, Asano E, Hasegawa H, Maeda M, Shibata K, Hamaguchi M, Kikkawa F, Senga T. ALX1 induces snail expression to promote epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 2013 Mar 1;73(5):1581-90. 査読有

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2377.

Sekiya R, Kajiyama H, Sakai K, Umezu T, Mizuno M, Shibata K, Yamamoto E, Fujiwara S, Nagasaka T, Kikkawa F. Expression of CXCR4 indicates poor prognosis in patients with clear cell carcinoma of the ovary. Hum Pathol. 2012 Jun;43(6):904-10. 査読有
doi: 10.1016/j.humpath.2011.08.002.

〔学会発表〕(計7件)

第73回日本癌学会学術講演会
2014年10月27日(神奈川県横浜市パシフィコ横浜)
PLAGL2 regulates cell migration and actin cytoskeleton organization. 関谷龍一郎、三井寛子、鈴木史朗、水野美香、柴田清住、梶山広明、千賀威、吉川史隆

第56回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
2014年7月17日(栃木県宇都宮市 栃木県総合文化センター)薬剤耐性卵巣癌における EMT 転写因子 ZEB1 および誘導因子 TGF-β の関与. 坂田 純、梶山広明、関谷龍一郎、三井寛子、鈴木史朗、梅津朋和、水野美香、柴田清住、吉川史隆

Asian Society of Gynecologic Oncology (ASGO) 3rd Biennial Meeting (DEC 13-15/2013 Kyoto, The Westin Miyako Hotel) Interaction between peritoneal mesothelial cells and ovarian cancer cells in peritoneal Dissemination. Mitsui H, Shibata K, Suzuki S, Umezu T, Mizuno M, Kajiyama H, Kikkawa F.

第54回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
2013年7月20日(東京都港区 ホテル グランパシフィック LE DAIBA)
薬剤耐性獲得卵巣癌細胞における EMT 誘導性とそのメカニズム.梶山広明

第54回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
2013年7月20日(東京都港区 ホテル グランパシフィック LE DAIBA)
脈管侵襲陽性例における上皮間葉転換誘導転写因子 Twist の発現意義.梶山広明

第54回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
2013年7月20日(東京都港区 ホテル グランパシフィック LE DAIBA)
卵巣癌微小環境で腹膜中皮細胞は腫瘍促進的に働く.芳川修久,梶山広明,関谷龍一郎,三井寛子,鈴木史朗,梅津朋和,水野美香,柴田清住,吉川史隆

第54回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
2013年7月20日(東京都港区 ホテル

グランパシフィック LE DAIBA)
卵巣癌腹膜播種過程における癌関連腹膜中皮細胞の作用.三井寛子,柴田清住,芳川修久,関谷龍一郎,鈴木史朗,梅津朋和,水野美香,梶山広明,吉川史隆

〔図書〕(計3件)

STATE of the Art in ovarian cancer management 「卵巣癌腹膜播種に対する治療戦略」吉川史隆,梶山広明 Progress in Ovarian Cancer Management メディカルレビュー社 1巻1号 2013年11月: 44(33-37)

がん・生殖医療の現状と展望 「化学療法による卵巣毒性とその対策」梶山広明産科と婦人科 診断と治療社 81巻10号, 2014年 74(1169-1243)

プラズマがん治療の将来展望 吉川史隆 梶山広明 静電気学会誌 38巻4号, 2014年 35(177-182)

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称:抗腫瘍水溶液とその製造方法
発明者:堀 勝、倉家 尚之、水野 正明、吉川 史隆、梶山 広明、中村 香江、石川 健治、田中 宏昌
権利者:名古屋大学
種類:特許
番号:2015-47884
出願年月日:2015年3月11日

名称:抗腫瘍水溶液および抗癌剤とその製造方法
発明者:堀 勝、水野 正明、吉川 史隆、梶山 広明、中村 香江、内海 史、石川 健治、竹田 圭吾、田中 宏昌、加納 浩之
権利者:名古屋大学
種類:特許
番号:2014-122088
出願年月日:2014年6月13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・大学医学系研究科・准教授

研究者番号:00345886

(2)研究分担者

柴田 清住 (SHIBATA, Kiyosumi)
名古屋大学・大学医学系研究科・准教授
研究者番号：90335026

(3)連携研究者

千賀 威 (SENGA, Takeshi)
名古屋大学・大学医学系研究科・准教授
研究者番号：80419431