

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390384

研究課題名(和文) 難治性子宮内膜癌の治療戦略～高分子ミセルを用いたEMT制御を目指した治療の開発～

研究課題名(英文) To control in invasion and metastasis through EMT
(Epithelial-Mesenchymal-Transition) functional analysis of CD24 in endometrial cancer

研究代表者

大道 正英 (Ohmichi, Masahide)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：10283764

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)：再発や多臓器転移を示す難治性内膜癌に対しての新規治療法は改善を認めていない。細胞表面マーカーのひとつCD24の発現増加が臨床検体での解析により予後不良因子であることを報告し、CD24の機能解析を細胞株を用いて行なった。GPIアンカー蛋白であるCD24は細胞膜表面のHGF受容体Metをlipid raftにリクルートし、Metシグナルの増幅に寄与していることを発見した。さらに多剤耐性獲得メカニズムのひとつABCトランスポーターの発現制御も行っており、内膜癌の転移能獲得、多剤耐性獲得に大きく寄与していることが明らかとなり、分子標的としてふさわしい膜蛋白であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The development of resistance to chemotherapeutic drugs by cancer cells represents a major challenge in the clinical cure of advanced and metastatic cancers. CD24 has been reported to be a marker for a poor prognosis in several tumors, and we herein examined the functions of CD24 in human endometrioid adenocarcinoma cell lines, and evaluated how it contributes to cancer drug resistance. We demonstrated that CD24 was responsible for the recruitment of phosphorylated-Met to the lipid raft domain of the cell membrane, resulting in amplification of the Met signaling cascade, ultimately leading endometrial cancer cells to express higher levels of ATP binding cassette (ABC) transporters. Our findings suggest that CD24-mediated amplification of the Met cascade may contribute to the drug resistance of endometrial cancer.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮内膜癌 EMT CD24 HGF Met ABC transporter

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌は近年、子宮癌全体に占める割合も40%に達し増加傾向にある。子宮内膜癌に対する主治療としては、黄体ホルモン療法、放射線療法などがあるが、抗癌化学療法の有用性が認識されつつある。しかしながら、難治性子宮内膜癌に対する追加治療については未だ確立されておらず、放射線療法や抗癌剤治療を行うも早期に転移や再発を示すことが知られている。近年、正常細胞における幹細胞(stem cells)の研究が話題となっているが、癌細胞においてもCancer Stem Cells (CSCs)が注目されている。CSCsはnon CSCsと比較して、強い自己複製能と腫瘍形成能を有することが明らかになってきており、抗癌剤治療や放射線療法に抵抗を示し、癌再発の原因細胞であると考えられている。一方、癌細胞の転移・浸潤過程において、細胞間接着や細胞極性を失い、間葉系細胞に変化し、間質内へ浸潤・転移する現象として上皮・間葉形態転換(EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition)が注目されている。過去の報告からCSCsが浸潤・転移する過程においてEMTの現象を起こしているとし、両者の関連を示唆している。EMTを起こしている細胞は、CSCsと同様に強い自己複製能と腫瘍形成能を有し、薬剤に耐性を示すことが明らかとなりつつある。我々はEMT現象を引き起こす細胞を研究する上で、CSCsの有用な表面マーカーとして乳癌、膵臓癌で注目されているCD24に着目している。CD24陽性細胞は幹細胞と間葉系細胞の性質を合わせもち、腫瘍形成能にすぐれていることが報告されている。以上より、CD24は子宮内膜癌における浸潤・転移に関するEMTマーカーとして利用できる可能性があると考えていたが、その機能に関しては不明なままであった。

2. 研究の目的

子宮内膜癌の浸潤・転移に重要な上皮・間葉形態転換(Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT)現象の制御を目指し、EMT化細胞の表現マーカーに対する抗体を外郭に結合させた抗癌剤内包高分子ミセルを作成し、EMT化細胞を標的とするドラッグデリバリーシステムの開発が、研究開始当初の目的であった。そのためには子宮内膜癌におけるCD24の機能解析を行ない、EMT現象、多剤耐性獲得へのメカニズムを明らかにする必要がある。

3. 研究の方法

類内膜腺癌の細胞株 hec-1A, hec-108 を用い、以下のように検討した。

1) 膜上のCD24をFITC標識抗CD24抗体で認識させ、フローサイトメトリーでCD24陽性細胞と陰性細胞とに分け、

cisplatinに対する感受性をMTS assayにて多剤耐性関連因子(主に薬物を細胞外に排出するTransporter)であるMDR-1(ABCB1), MRP(ABCC1), ABCG2の蛋白発現、遺伝子発現をそれぞれWestern blotting法、PCR法にてさらにそれらTransporterの活性をdye uptake protocol (eFluxx-IDH green multi-drug resistance assay kit)を用いて細胞内シグナルの変化はWestern blottingにて検討した。

2) CD24に対する特異的siRNAを細胞内へ導入しknock downさせ、1)での変化が抑制されるか否かを検証した。

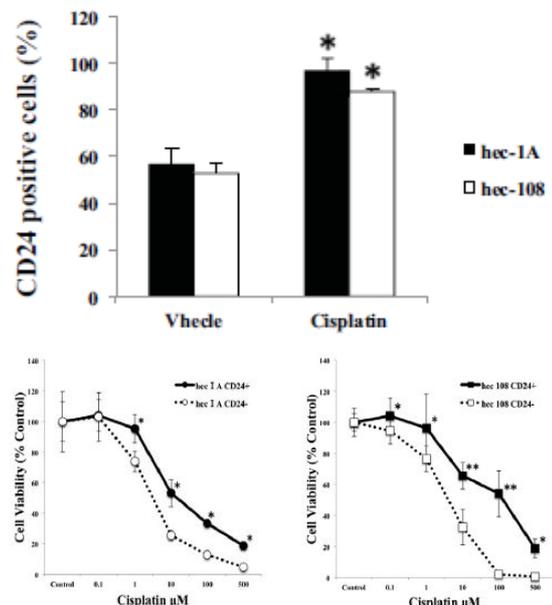
CD24は細胞膜微小構造のlipid raftに存在する分子であり、癌細胞の進展に重要なサイトカインの一つHGF受容体(Met)の細胞内シグナル伝達の効率化に関与することが判明したため、次の検討を行なった。

3) CD24とMetがlipid raftに共存していることをsucrose gradientで13の細胞分画に分離しWestern blotting法で確認した。さらにCD24 siRNAによりlipid raftの構造異常とMetシグナルの抑制化が起きるか否かを同じくsucrose gradientで13の細胞分画に分離しWestern blotting法で確認した。また、Texas Red-phosphoMet抗体とFITC-CD24抗体またはFITC-Caveolin1抗体で細胞染色し、コンフォーカル顕微鏡で局在の変化を検証した。

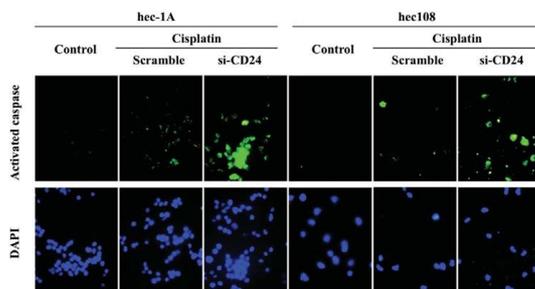
4. 研究成果

1)

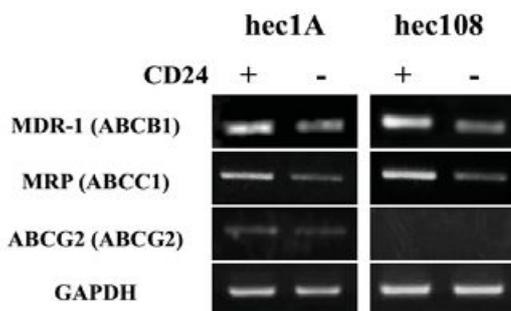
子宮類内膜腺癌細胞株 hec-1A, hec-108 は cisplatin 投与によりCD24陽性細胞比率が増し、Cisplatin感受性はCD24陽性細胞で耐性化を示した。



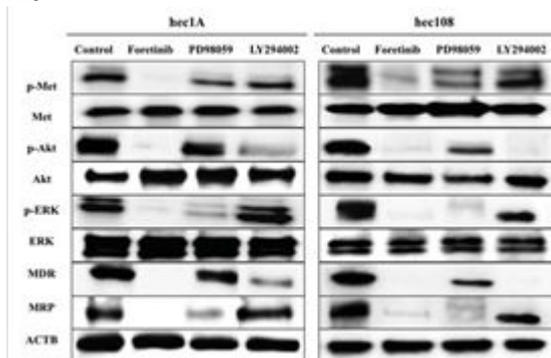
CD24 を siRNA-CD24 の導入で knock down すると cisplatin の耐性が解除され、cisplatin による apoptosis が惹起された



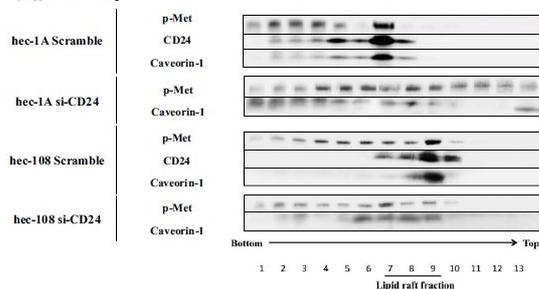
cisplatin の耐性に関するトランスポーター類は CD24 陽性細胞で強発現していた。



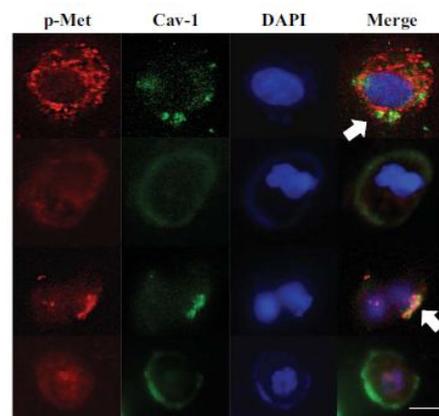
上記トランスポーター類の発現に必要なシグナルの一つ、Met-Akt, および Met-ERK シグナルは parent cells で活性化されており、HGF-Met signal の basal な活性化が認められた。



CD24 の発現が Met signal の活性化にどのような影響を与えているのか、CD24 の機能解析を行なうために、sucrose gradient で 13 の細胞分画に分離し、CD24 と Met の共発現を確認した。siRNA-CD24 で CD24 を knock down



するとリン酸化され活性化されていた Met がリン酸化されなくなった。



また、リン酸化された Met は lipid raft の構成分子のひとつ Caveolin-1(Cav-1)と共発現しており、lipid raft 存在下でリン酸化されていた。つまり、CD24 は lipid raft 形成に必要であり、Met を lipid raft 内にとどめておく作用を有していることが明らかとなった。

以上より、内膜癌細胞株における CD24 発現は lipid raft 形成に必要であり、HGF-Met シグナルの効率化に寄与し、癌転移、抗癌剤耐性化の主要なメカニズムを担っていることが判明した。

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 4 件)

- 1) Ono YJ, Hayashi M, Tanabe A, Hayashi A, Kanemura M, Terai Y, Ohmichi M. Estradiol-mediated hepatocyte growth factor is involved in the implantation of endometriotic cells via the mesothelial-mesenchymal transition in the peritoneum. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015 Apr 7;ajpendo.00573.2014. (査読有)
- 2) Ono YJ, Terai Y, Tanabe A, Hayashi A, Hayashi M, Yamashita Y, Kyo S, Ohmichi M. Decorin induced by progesterone plays a crucial role in suppressing endometriosis. *J Endocrinol.* 2014 Nov;223(2):203-216. (査読有)
- 3) Ashihara K, Tanaka T, Maruoka R, Ono YJ, Tanabe A, Terai Y, Ohmichi M. Postmenopausal patients with endometrial cancer of type 1 have elevated serum estradiol levels in the ovarian vein. *Int J Gynecol Cancer.* 2014 Oct; 24(8): 1455-1460. (査読有)
- 4) Tanaka Y, Terai Y, Kawaguchi H, Fujiwara S, Yoo S, Tsunetoh S, Takai M, Kanemura M,

Tanabe A, Ohmichi M
Prognostic impact of EMT (epithelial-
mesenchymal-transition)-related protein
expression in endometrial cancer.
Cancer Biol Ther. 2013 Jan;14(1):13-19.
(査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

1) 田中良道

子宮体癌における EMT のマーカーとしての
CD24 の有用性
第 64 回日本産科婦人科学会学術集会
2012/04/13- 04/15
神戸国際展示場 兵庫県

2) 寺井義人

婦人科癌の浸潤転移における EMT の意義と EMT
制御をターゲットとした新規治療の基礎的研究
第 53 回日本婦人科腫瘍学会
2012/11/23- 11/24
岡山コンベンションセンター岡山県

3) 中村起代子

上皮間葉転換を介した浸潤・転移の制御を目指し
て
第 65 回日本産科婦人科学会学術集会
2013/05/10-05/12
ロイトン札幌 北海道

4) 田中良道

若年性子宮内膜癌・子宮内膜異形増殖症に対する
MPA 治療法の治療成績
第 51 回日本癌治療学会
2013/10/24-10/26
京都国際会館 京都府

5) 田中良道

Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) in
Endometrial Cancer
第 3 回アジア婦人科腫瘍学会 第 55 回日本婦人科
腫瘍学会
2014/12/13-12/15
ウェスティン都ホテル京都 京都府

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大道 正英 (Ohmichi Masahide)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：10283764

(2) 研究分担者

田辺 晃子 (Tanabe Akiko)
大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：70454543

林 正美 (Hayashi Masami)

大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：00551748

田中 良道 (Tanaka Yoshimichi)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：10625502

金村 昌徳 (Kanemura Masanori)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：40298782

山下 能毅 (Yamashita Yoshiki)
大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：50268207

恒遠 啓示 (Tsunetoh Satoshi)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：70388255

寺井 義人 (Terai Yoshito)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90278531

(3) 研究協力者

中村起代子 (Nakamura Kiyoko)
大阪医科大学・医学部・大学院生