

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590406

研究課題名(和文)子宮頸癌の放射線治療効果予測における病理医の早期介入：治療早期の上皮間葉移行評価

研究課題名(英文) Early pathological evaluation for irradiation effectiveness in uterine cervical cancer

研究代表者

谷野 美智枝 (Tanino, Mishie)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90360908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸癌は若年発症が特徴で罹患率は増加傾向を示す。放射線照射が行われるが、個々の腫瘍反応性は異なり治療効果も様々である。放射線照射後増殖腫瘍の分子メカニズムを解析することで個々の腫瘍の特性に応じた治療効果予測ができる可能性があるのではないかと考えた。これまでの研究結果から放射線照射後の耐性細胞ではHippo経路を介したEMT関連分子及びstemness関連分子の発現誘導、EGFR、PDGFRのリン酸化が関与することがわかった。現在、Hippo経路あるいはEMT経路を抑えて放射線照射を行うことで悪性形質転化を抑制できるか検討中である。

研究成果の概要(英文)：Ionizing irradiation is an effective treatment for uterine cervical cancer, however, a higher rate of recurrence with more aggressive phenotypes is a vital issue. Although epithelial-mesenchymal transition (EMT) is involved in irradiation-induced cancer progression, the role for such phenotypic transition in uterine cervical cancer remains unknown. To investigate the mechanism of irradiation-dependent tumor progression, cervical cancer cell lines were irradiated multifractionated 20Gy in two weeks. Knocking down Snail and Yap cell lines were established. EMT regulators, Hippo pathway effector, mesenchymal and stemness proteins were increased after irradiation. In phenotypical analysis, cells exhibited an upregulation of migration, invasion, numbers of focal adhesion. Knocking down Snail and Yap inhibit increase in mesenchymal markers. In conclusion, we propose inhibiting both EMT and Hippo pathway is useful to prevent malignant transition after irradiation.

研究分野：外科病理学

キーワード：子宮頸癌 放射線治療 上皮間葉移行

1. 研究開始当初の背景

近年、個々の腫瘍の性質に応じた個別化診断、それに基づく分子標的治療が施行されており、病理医は患者検体における免疫染色評価、遺伝子変異の解析などを介して重要な役割を果たしている。一方、放射線治療は、高い治療効果と低侵襲性が特徴ではあるが、個々の腫瘍の性質を考慮せず一律な照射が行われている。一部の腫瘍では、照射後の悪性形質への変化、耐性獲得などにより早い時期での転移巣の出現が臨床的に認識され問題となっている。これらの悪性形質獲得において様々な腫瘍では上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) の関与が示唆されている。

子宮頸癌は若年発症が特徴で罹患率は増加傾向を示す。外科療法、化学療法、放射線照射などの治療が行われるが、個々の腫瘍反応性は異なり治療効果も様々である。分子標的治療薬が個々の腫瘍の特性に応じた個別化医療であるように、放射線治療も個々の腫瘍の特性に応じた治療効果予測ができる可能性があるのではないかと考えた。特に照射初期の段階で EMT が確認できればその後悪性形質への移行が予測できる可能性があるのではないかと予測した。

2. 研究の目的

放射線治療に対する今回の研究は、放射線照射後の早い段階での EMT 関連分子を中心とした分子プロファイリングの変化を評価し、治療効果を予測することで病理学の立場から治療へ積極的に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 4 種類の子宮頸癌細胞株を使用

扁平上皮癌: Caski, C33A

腺癌: SiHa, Hela

(2) 放射線照射

LINAC III accelerator (6MV X-ray, Siemens) を使用し以下の方法で細胞照射を行う。

- 10 Gy を単独照射
- 2 Gy を 10 回に分割照射 (総線量 20 Gy)

照射後早期と晩期に細胞を回収し分析する。早期は照射によるアポトーシス誘導過程における変化を反映し、晩期は照射後サバイバルしてくる細胞における変化を反映するものと想定した。

(3) Real time PCR による mRNA の発現

早期変化: 照射 48hr 後、晩期変化: 照射 21 日後

EMT 関連転写因子: Slug, Snail, Twist, ZEB-1
EMT 関連分子: E-cadherin, Vimentin, Collagen 1A1, α -SMA, MMP-2, 9

Stemness 関連転写因子: Sox2, Oct3/4, Nanog, CD44

Hippo 関連分子: YAP1, YAP2, Taz, Tef4

(4) 放射線照射 21 日後の細胞における蛋白の発現

(5) Snail ノックダウン細胞株を樹立し放射

線照射

(6) Snail, YAP1, TAZ ノックダウン細胞株の樹立と EMT, 間葉系マーカーの遺伝子解析

(7) YAP1 ノックダウン細胞株への放射線照射と遺伝子発現の解析

4. 研究成果

(1) 放射線照射後の EMT 関連分子発現

① 10Gy1 回照射 (総照射 10 Gy)

照射 48 時間後の C33A 細胞では照射早期では Slug, Snail, Twist などの EMT 関連転写因子 mRNA の発現が増加し、それに伴い間葉系マーカーである α SMA, Collagen1A1 mRNA や MMP-2, 9 mRNA の発現が増加した。また、Hippo 関連分子である YAP1, 2 や Taz, Tef の発現も増加した。照射 21 日後の再増殖してきた細胞においてさらに発現が上昇したが、EMT で見られる Cadherin switch は認めなかった。しかしながら、stemness 関連分子である Oct3/4, Nanog, CD44 などの上昇を認めた。

Caski 細胞では Snail, Zeb1 mRNA の上昇が照射 48 時間後に見られたが 21 日後には Twist, Zeb1 の増加を認め、 α SMA, Collagen1A1, Vimentin, Fibronectin mRNA や MMP-2, 9 mRNA の発現が増加した。また、早期には Taz の発現が増加、21 日後には Yap, Taz, Tef などがさらに上昇していた。また stemness 関連分子である Sox2, Oct3/4, Nanog, CD44 はいずれもが 21 日後に高値を示した。

② 2Gy 10 回照射 (総照射 20 Gy)

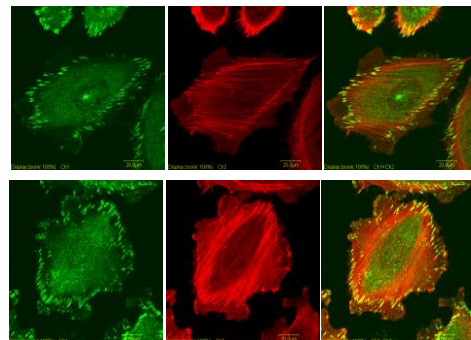
分割照射後再増殖した 21 日には C33A, Caski はいずれの細胞においても EMT 関連分子や間葉系マーカーの上昇がみられた。またこの照射では Hippo 関連分子の上昇、Stemness 関連分子の上昇がいずれもほぼ同様に見られた。

(2) 放射線照射後の形態学的変化

再増殖してきた細胞 (SiHa) を用いて細胞接着斑の構成蛋白である Paxillin と細胞骨格を形成する F-actin の蛍光二重免疫染色を行ったところ Paxillin の接着斑への集積と actin fiber の形成が高度に認められた。

(図 1, 上段: 照射なし、下段 10Gy 照射)

Paxillin F-actin Merge



(3) 放射線照射後の細胞運動能、浸潤能の変化

C33A, Caski いずれの細胞においても、Transwell を用いた運動能の検討では 4, 8, 12, 24 時間後のいずれにおいても 10Gy 単独

照射後残存細胞の運動能は未照射細胞と比較して増加していた。また、matrigel invasion assay では 10Gy 単独でも分割照射 20Gy でも、未照射の細胞と比較して浸潤能が増加していた。

(4) 放射線照射後再増殖細胞における EGFR, PDGFR のリン酸化

免疫電気泳動にて pEGFR1068, pEGFR1173, pPDGFR 754, pPDGFR857 の検出を行った。放射線単独及び分割照射のいずれも方法の再増殖細胞において pEGFR1173, pPDGFR 754 の発現が見られ細胞のレセプターは自己リン酸化が起きていることがわかった。

(5) Yap siRNA, Taz siRNA を用いたノックダウン細胞の樹立

C33A においては Yap siRNA を用いてもノックダウン細胞が樹立できなかったが、Taz siRNA では約 60%に発現を減らすことができた。一方 Caski においては Yap siRNA は発現を 20%程度にまで減少させ、Taz は 60%程度にまで減少させることができた。

(6) Yap, Taz ノックダウン細胞株における EMT 関連分子、間葉系マーカー、stemness 関連分子の発現変化

Yap, Taz いずれのノックダウン細胞株においても Slug, Twist, Vimentin, Fibronectin の発現を減少させた。しかし Snail, Zeb1, α SMA, Collagen1A1 mRNA の発現は変化しなかった。また、stemness 関連分子では Sox2, Oct3/4, Nanog の発現を減少させなかったが、CD44mRNA の発現は低下した。

(7) Snail ノックダウン細胞株における EMT 関連分子と間葉系マーカーの発現変化

Snail ノックダウン細胞では Yap1/2 いずれも 60%程度にまで減少させ、fibronectin の発現も 70%程度に抑えたがその他の間葉系マーカーの発現は抑制しなかった。

以上の結果からは、放射線照射後の耐性メカニズムにおいて、EMT 変化は誘導されないものの Hippo 経路を介した EMT 関連分子の発現誘導や stemness 関連分子の発現誘導、さらには EGFR, PDGFR の自己リン酸化が再発腫瘍の悪性度を規定する因子である可能性を示唆している。現在 Yap ノックダウン細胞株での悪性形質の解析、さらには放射線照射後の悪性形質転化を抑制できるか検討中である。放射線照射後の再増殖腫瘍で増加する分子が同定できたら、患者検体を用いた免疫染色を施行し再発癌の特徴を確認する。すべてのデータが揃ったら論文の形で発表予定である。

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 67 件)

1. Tanino M, Sasajima T, Nanjo H, Akesaka S, Kagaya M, Kimura T, Ishida Y, Oda M, Takahashi M, Sugawara T, Yoshioka T,

- Nishihara H, Akagami Y, Goto A, Minamiya Y, Tanaka S; R-IHC Study Group. Rapid immunohistochemistry based on alternating current electric field for intraoperative diagnosis of brain tumors Brain Tumor Pathol. 2015 Jan;32(1):12-9. doi: 10.1007/s10014-014-0188-y. Epub 2014 May 8. 査読有
2. Yabe I, Tanino M, Yaguchi H, Takiyama A, Cai H, Kanno H, Takahashi I, Hayashi Y, Watanabe M, Takahashi H, Hatakeyama S, Tanaka S, Sasaki H. (Yabe I, Tanino M and Yaguchi H are contributed equally to this work) Pathology of frontotemporal dementia with limb girdle muscular dystrophy caused by a DNAJB6 mutation. Clinical Neurology and Neurosurgery 2014.127:10-12. doi:10.1016/j.clineuro.2014.09.013 査読有
3. Mahabir R, Tanino M*, Elimansuri, Wang L, Kimura T, Itoh T, Ohba Y, Nishihara H, Shirato H, Tsuda M, Tanaka S: Sustained elevation of Snail promotes Glial-Mesenchymal Transition (GMT) after irradiation in malignant glioma. Neuro-Oncology 2014.16(5):671-85 doi:10.1093/neuonc/not239 査読有
4. Mitamura T, Watari H, Wang L, Kanno H, Kitagawa M, Hassan MK, Kimura T, Tanino M, Nishiara H, Tanaka S, Sakuragi N: MicroRNA 31 functions as an endometrial Mitamura T, Watari H, Wang L, Kanno H, Hassan MK, Miyazaki M, Katoh Y, Kimura T, Tanino M, Nishihara H, Tanaka S, Sakuragi N: Downregulation of miRNA-31 induces taxane resistance in ovarian cancer cells through increase of receptor tyrosine kinase MET. Oncogenesis, 2:e40, 2013.cancer oncogene by suppressing Hippo tumor suppressor pathway. Mol Cancer 2014. Apr 29; 13:97.doi:10.1186/1476-4598-13-97. 査読有
5. Kanno H, Tanino M*, Watanabe K, Ozaki Y, Itoh T, Kimura T, Nishihara H, Itoh T, Narita T, Nagashima K, Tanaka S. Intracranial mass-forming lesion associated with dural thickening and hypophysitis. Neuropathology33, 213-6, 2013 doi:10.1111/j.1440-1789.2012.01342.x 査読有
6. Onodera S, Shimizu S, Tanaka S, Shirato H, Tanino M*, Sabe H. Kinoshita R, Nam JM, Ito YM, Hatanaka KC, Hashimoto A, Handa H, Otsuka Y, Hashimoto S, Onodera Y, Hosoda M, Co-Overexpression of GEP100 and AMAP1 Proteins Correlates with Rapid Local Recurrence after Breast Conservative Therapy. PLoS One 8, e76791, 2013 doi:10.1371/journal.pone.0076791 査読有
7. Herrero R, Tanino M, Smith LS, Kajikawa O, Wong VA, Mongovin S, Matute-Bello G,

- Martin TR: The Fas/FasL pathway impairs the alveolar fluid clearance in mouse lungs. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 305, L377-88, 2013 doi: 10.1152/ajplung.00271.2012 査読有
8. Tanino M, Kohsaka S, Kimura T, Tabu K, Nishihara H, Sawa H, Kawami H, Kamada H, Shimizu M, Tanaka S. A case of clear cell variant of solid-pseudopapillary tumor of the pancreas in an adult male patient. Ann Diagn Pathol 16, 134-40, 2012 doi:10.1016/j.anndiagpath.2010.11.011 査読有
9. Watari H, Kinoshita R, Han Y, Wang L, Hosaka M, Taguchi H, Tsuchiya K, Tanaka Sm, Shirato H, Sakuragu N. Prognostic significance of clusterin expression in advanced-stage cervical cancer treated with curative intended radiotherapy. Int J Gynecol Cancer. 2012 22(3):465-70. doi:10.1097/IGC.0b013e31821a03d9. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

1. 谷野美智枝
特別講演：肺癌における上皮間葉移行 (EMT) を介した腫瘍 - 腫瘍間質の相互作用の解析
第 47 回北海道病理談話会 平成 26 年 10 月 11 日旭川グランドホテル (北海道・旭川市)
2. 谷野美智枝, 竹浪智子, 木村太一, 石田雄介, 西原広史, 田中伸哉 :
使用経験 2 電界攪拌迅速免疫染色機を使用した脳腫瘍術中迅速免疫染色の有用性
第 90 回 日本病理組織技術学会 2014 年 8 月 3 日 (日) 東京慈恵医科大学 (東京都)
3. 谷野美智枝, Roshan Mahabir, Aiman Elimansuri, 王磊, 木村太一, 西原広史, 伊東民雄, 白土博樹, 津田真寿美, 田中伸哉 :
悪性神経膠腫放射線照射後の Snail による Glial-mesenchymal transition (GMT) の関与
第 32 回日本脳腫瘍病理学会 2014 年 5 月 23~24 日あわぎんホール (徳島県・徳島市)
4. 谷野美智枝, 明坂詩織, 石田雄介, 木村太一, 西原広史, 田中伸哉 : 術中迅速脳腫瘍診断における電解非接触攪拌技術を搭載した迅速免疫染色装置使用の有用性
第 102 回日本病理学会総会, ロイトン札幌 (北海道・札幌市), 2013 年 6 月 8 日
5. 谷野美智枝, 明坂詩織, 石田雄介, 木村太一, 西原広史, 田中伸哉 : 術中迅速脳腫瘍診断における電解非接触攪拌技術を搭載した迅速免疫染色装置使用の有用性
第 31 回日本脳腫瘍病理学会, 国際ファ

ッションセンター (東京都), 2013 年 5 月 24~25 日

6. Tanino M, Kohasa S, Yachi K, Marukawa E, Tsuda M, Kimura T, Nishihara H, Tanaka S: Let 7a regulates IL-6 expression in malignant mesothelioma 第 72 回日本癌学会総会, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市), 2013 年 10 月 3 日~5 日
7. Tanino M, Kohasaka S, Yachi K, Tsuda M, Kimura T, Nishihara H, Tanaka S. Let7a regulates IL-6 expression in malignant mesothelioma. AACR-NCI-EORTC International Conference, Molecular Targets and Cancer Therapeutics. 2013.10.19-23 Boston, MA, USA, 2013 年 10 月 3 日~5 日

[図書] (計 1 件)

池田仁, 石津明洋, 渋谷みよ, 田中伸哉, 谷野美智枝, 中村仁志夫, 成松英明, 西原広史, 野島孝之, 柳輝希, 渡邊純: 消化器系. 118 頁-133 頁, (中村仁志夫, 佐藤達資, 石津明洋, 田中伸哉編: 医療系学生のための病理学, 第 4 版, 講談社, 東京), 2012

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ホルマリン固定生体組織内での活性型低分子量 GTP 結合蛋白質検出方法
発明者: 田中伸哉, 津田真寿美, 谷野美智枝
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2015-043171
出願年月日: 平成 27 年 3 月 5 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等
<http://patho2.med.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
谷野 美智枝 (Mishie Tanino)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 70507582

(2) 研究分担者
渡利 英道 (Hidemichi Watari)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号: 10344508

田中 伸哉 (Shinya Tanaka)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 70261287

木下 留美子 (Rumiko Kinoshita)
北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：70507582