

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592536

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌に対するmTOR阻害剤によるEMT現象の制御とその応用

研究課題名(英文) Control of EMT phenomenon by mTOR inhibitor for ovarian clear cell carcinoma.

研究代表者

恒遠 啓示 (Tsunetoh, Satoshi)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：70388255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間葉転換(EMT)とは上皮細胞が間葉系の細胞へと性質を転換する現象である。卵巣癌症例においてEMT現象陽性では有意差を持って予後不良であり、独立した予後不良因子であることを確認した。明細胞腺癌株にmTOR阻害剤を添付したところEMT現象を抑制した。また表現マーカーCD24を介したEMT現象があることを確認し、CD24は卵巣癌において予後因子でありEMTに関わる重要なマーカーとなることが示唆された。また、CD24を抑制することで、浸潤能の抑制をされると予想される。現在CD24陽性の腫瘍細胞に選択的に内包した薬剤を放出することができる薬剤を作成し、抗腫瘍効果があることを検討中である。

研究成果の概要(英文)：The epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a phenomenon to convert the property into cells of mesenchymal epithelial cells. In ovarian cancer cases was a poor prognosis with a significant difference in the EMT phenomenon positive. We confirmed to that EMT phenomenon positive is an independent poor prognostic factor. mTOR inhibitors in clear cell adenocarcinoma lines inhibited EMT phenomenon. The in vitro examination showed that high expression level of CD24 in significantly associated with EMT prosvivity. CD24 expression in ovarian cancer may be related to tumor invasion and migration. The anti-cancer agent incorporated polymeric micelles, which have anti-CD24 antibodies in their outer layer, are in development.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：EMT 明細胞腺癌 CD24

1. 研究開始当初の背景

卵巣明細胞腺癌は卵巣癌の中でも最も予後が悪いことが知られている。卵巣明細胞腺癌において卵巣癌治療の key drug である白金製剤耐性が強いことが多くの研究者により報告されており(Ref.1,2)、その治療戦略を考えることが急務である。我々は卵巣明細胞腺癌において、他の組織型に比して HIF-1 α の発現が高いことや、HIF-1 α 及び上流にあるリン酸化 mTOR が共に強発現し、mTOR・HIF-1 α シグナルが活性化していること、特に白金製剤耐性の明細胞腺癌でより高い発現・活性を示すことを明らかにした(Ref.1,2)。さらにマウス白金製剤耐性明細胞腺癌細胞株皮下移植腫瘍において mTOR 阻害剤が有意な抗腫瘍効果を認めた(Ref.1)

近年、癌細胞の浸潤・転移過程において、上皮間葉形態転換(Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) が注目されている。EMT は癌細胞の細胞間接着を失い、一定の細胞形態を持って基底膜上に配列している上皮系細胞のその細胞極性を失い、間葉系細胞に変化し、間質内へ浸潤し転移する現象とされている。我々は、EMT を起こすシグナルとして知られている TGF- β の添加あるいは 1% Hypoxia の条件で卵巣明細胞腺癌株(RMG-1)を培養することで、EMT 現象を起こしていることを確認した。一方、近年、hypoxia な局所微小環境下が EMT 現象を促進していることが注目され、HIF-1 α が重要な因子として働いている可能性が示唆されている。我々は、HIF-1 α は、hypoxia の条件下で上流にある Akt-mTOR の活性化により制御されていることを明らかにしてきたが(Ref.3) mTOR 阻害剤が mTOR の下流にある HIF-1 α の活性を制御し、EMT 現象を制御する事が明らかとなれば、腫瘍の増殖、浸潤・転移を抑制のみならず、薬剤耐性性の癌幹細胞の治療にも結びつき、難治性である卵巣明細胞腺癌の新たな治療戦略となりえる。また、乳癌、膵臓癌で注目されている CD24 は細胞表面マーカーの一つであり、GPI (glycosylphosphatidylinositol) 結合型蛋白である。CD24 陽性を予後不良因子であるとする報告があるが、いまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) hypoxia により誘導される上皮間葉形態転換 EMT 現象に注目し、癌の浸潤・転移の過程で重要で白金製剤耐性明細胞腺癌に強発現している EMT 現象のメカニズムの解明とその制御に向けた基礎的検討。

(2) CD24 陽性細胞の耐性獲得のメカニズムと EMT 現象との関連を調べ、関連があれば EMT 現象の制御の可能性に向けた基礎的および臨床的検討を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 接着因子である E-cadherin と転写因子で

ある Snail・Slug に注目し、Snail または Slug 核内染色陽性かつ E-cadherin の減弱をもって EMT 現象陽性と定義した。そして初回手術を行った上皮系卵巣癌病理検体 200 例のパラフィン切片から組織マイクロアレイ標本を作製し、EMT 現象と臨床病理学的因子、予後とを比較検討した。

(2) HIF-1 α が EMT 現象の転写因子である Snail・Slug によって制御されていることは知られているので、卵巣癌株において HIF-1 α の発現率を Western blotting で検討する。また mTOR 阻害剤で HIF-1 α がどのように影響を受けるかを検討する。

(3) CD24 が卵巣癌の予後因子となるか、免疫染色法を用いて検討しました。当科で初回手術を行った卵巣癌 200 例を対象とし原発巣のパラフィン切片から組織マイクロアレイ標本を作成し CD24 の免疫染色を施行後、CD24 と臨床病理学的因子、予後との関係を検討した。

(4) 当科で初回手術を行った卵巣癌 200 例を対象とし原発巣のパラフィン切片を用いて、Snail、slug、E-cadherin の染色を施行し、Snail または Slug が陰性かつイーカドヘリンが陽性であるものを EMT 陽性とした上で CD24 と EMT の相関関係を検討した

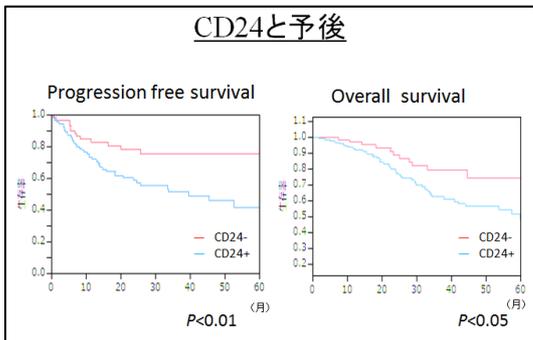
(5) CD24 強制発現すると EMT を引き起こすか否かを検討した後に、CD24 と浸潤・転移との関係を検討するために、浸潤能が亢進するのかをアッパーチャンバーに浸潤マトリゲルコートをした invasion assay で検討した。

4. 研究成果

(1) 明細胞腺癌では、他の組織型と比較して EMT 現象陽性率が高いことが分かった。さらに腹腔内播種転移陽性群では EMT 現象は有意に高いだけでなく、EMT 現象陽性では無像増悪生存期間、全生存期間が有意差を持って予後不良であった。多変量解析で解析したところ、EMT 現象陽性は独立した予後不良因子であった。

(2) Western blotting 法で HIF-1 α の蛋白質の発現を確認したところ明細胞腺癌細胞株である RMG-1 は他の卵巣癌細胞株である A2780、A2780CP、CaOv-3、Skov3 と比較して、HIF-1 の発現率は高いことが判明した。また mTOR 阻害剤を添付したところ HIF-1 の発現率は抑制されることが確認された。

(3) CD24 陽性と予後との関連を検討したところ CD24 陰性群と比べて CD24 陽性群は PFS、OS とともに予後不良であった。以上より、CD24 は卵巣癌において予後不良因子となることが示唆された。

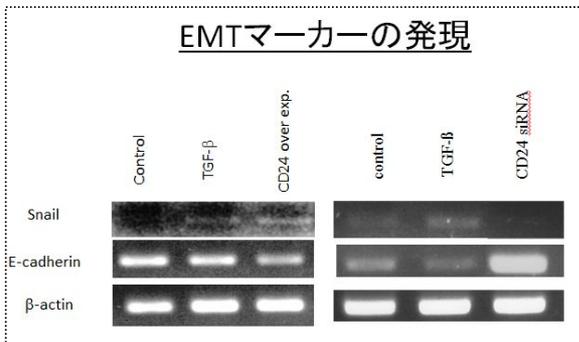


(4) CD24 と EMT の相関関係を検討したところ、CD24 陽性と EMT 陽性で有意に相関関係を認められた。

CD24とEMT現象との関係			
Variables	CD24		P-value
	Low (%)	High (%)	
EMT			0.003
現象あり	4 (11.6)	32 (88.4)	
現象なし	66 (40.6)	98 (59.4)	

CD24陽性とEMT陽性で有意に相関関係あり

(5) RT-PCR法においてCD24強制発現するとEMTを引き起こすと言われているTGF-βと同様に間葉系マーカーであるSnailの発現増強と上皮系マーカーであるE-cadherinの発現減弱を認めた。一方、CD24をノックダウンした場合EMTマーカーの変化を認めなかった。浸潤能が亢進するのかをアッパーチャンバーに浸潤マトリゲルコートをしたinvasion assayで検討したところ、何もしていないものと比較し、CD24強制発現で有意に浸潤能の亢進を認めた。



以上のことからCD24は卵巣癌において予後因子でありEMTに関わる重要なマーカーとなることが示唆された。また、CD24を抑制することで、浸潤能の抑制をされると予想される。現在CD24陽性の腫瘍細胞に選択的に内包した薬剤を放出することができる薬剤を作成し、抗腫瘍効果があ

るかを検討中である。

<引用文献>

- Mabuchi S, Ohmichi M, et al. Clin Cancer Res 2009 15: 5404
- Mabuchi S, Terai Y, Ohmichi M, et al. Mol Cancer Ther. 2010 9: 2411
- Fujita D, Tanabe A, Terai Y, Ohmichi M, et al. J Endocrinology. 2010 206: 131.

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 1件)

Takai M, Terai Y, Kawaguchi H, Ashihara, Fujiwara S, Tanaka T, Tsunetoh S, Tanaka Y, Sasaki H, Kanemura M, Tanabe A, Ohmichi M. The EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression indicates the metastatic status and prognosis in patients with ovarian cancer. 査読有 J Ovarian Res. 2014 Jul 27;7:76. doi: 10.1186/1757-2215-7-76.

[学会発表](計 6件)

芦原敬允、卵巣癌におけるCD24の発現意義と機能解析について第66回日本産科婦人科学会、2014年4月18~20日、東京国際フォーラム(東京)

川口浩史、白金製剤耐性卵巣癌におけるAktをターゲットとした分子標的薬としてのGemcitabineの機能解析 2013年5月10~12日、札幌プリンスホテル(北海道)

中村起代子、上皮間葉転換(EMT)を介した浸潤・転移の制御を目指して~CD24の機能解析~第65回日本産科婦人科学会、2013年5月10~12日、札幌プリンスホテル(北海道)

高井雅聡、卵巣癌におけるEMT現象の意義。第65回日本産科婦人科学会 2013年5月10~12日、札幌プリンスホテル(北海道)

高井雅聡、卵巣癌におけるEMT現象の指標になるE-cadherin, snail, slug, 第64回日本産科婦人科学会、2012年4月13~15日、神戸国際会議場(兵庫県)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

恒遠 啓示 (Tsunetoh Satoshi)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70388255

(2)研究分担者

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

林 正美 (Hayashi Masami)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：551748

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

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

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

山田 隆司 (Yamada Takashi)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：10182536

朝日 通雄 (Asahi Michio)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：10397614

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