

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791713

研究課題名(和文) 卵巣癌における癌幹細胞マーカーEpCAMの機能解析：卵巣癌新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Functional analysis of cancer stem cell marker EpCAM in ovarian cancer

研究代表者

本原 剛志 (Motohara, Takeshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：10457591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究では、卵巣癌における癌幹細胞の細胞表面マーカーである上皮細胞接着分子(Epithelial cell adhesion molecule: EpCAM)の分子生物学的な特性を明らかにし、難治性卵巣癌に対する新たな治療戦略を開発することを目的とした。ヒト卵巣癌細胞株を用いたin vitroでの解析では、抗癌剤を添加することでEpCAM陽性細胞の割合が増加することが示された。さらに、in vivoにおける樹立したマウスモデルでの検討においても同様の結果が示されており、EpCAM陽性の腫瘍細胞は抗癌剤治療抵抗性に関与していることが証明された。

研究成果の概要(英文)：The present study was designated to evaluate the role of Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in tumor resistance to chemotherapy in association with ovarian cancer stem cell. To investigate whether the EpCAM-positive subpopulations enhance chemoresistance, ovarian cancer cells were exposed to cisplatin in vitro. Flow cytometric analysis showed that treatment with cisplatin result in enhanced expression of EpCAM in residual cells as compared to untreated cells. To evaluate the in vivo relevance of chemoresistance in EpCAM-positive cells, we studied an established mouse model in vivo, and we found that EpCAM-positive ovarian cancer cells are involved in resistance to chemotherapy. Given that a distinct subpopulation of EpCAM-positive cancer cells plays a critical role in chemoresistance, definitive treatment should target this subpopulation of EpCAM-positive cells in ovarian cancer.

研究分野：婦人科学

キーワード：卵巣癌 癌幹細胞 抗癌剤治療抵抗性

1. 研究開始当初の背景

近年の癌治療の領域においては、癌細胞の特性に関わる分子機構が明らかにされるに伴って、それらの分子機構に関連する分子標的を明確にして、その機能を特異的に制御する分子標的治療が、抗悪性腫瘍薬開発の中心的な役割を果たすようになった。現在まで、多くの悪性腫瘍において新たな分子標的薬が続々と臨床に導入されその有効性が示されてきたが、卵巣癌における分子標的薬は限られている。今後の卵巣癌に対する新規分子標的薬の開発は卵巣癌治療に課せられた焦眉の命題である。

卵巣癌は早期診断が困難で、すでに腹膜播種や遠隔転移をきたした進行癌で診断されることが大部分である。プラチナ製剤やタキサン系薬剤の登場以来、5年生存率の向上をみてきたが、長期生存率は依然として不良である。さらに、初回治療が奏効し寛解が得られた場合でも、その多くは再発を繰り返し、上記の化学療法に加え種々の集学的治療をもってしても治療成績の向上はみられていない。近時、悪性腫瘍の治療抵抗性や再発において、一群の細胞集団である“癌幹細胞”の関与が指摘されている。すなわち、自己複製能をもつ癌幹細胞とそこから分化した癌細胞からなる階層性の存在が明らかにされ、その起源は正常組織内の組織幹細胞あるいは前駆細胞であるという見解が示されている。

われわれのこれまでの研究の結果、マウス卵巣に存在する組織幹細胞としての性質を有するEpCAM細胞の正常細胞に対して遺伝子操作による癌化誘導を行うことで、癌幹細胞を頂点とした階層性を有する癌幹細胞を頂点とした階層性を有する実験モデルを樹立した。すなわち、マウス卵巣に存在するEpCAM陽性細胞に対して、RNA干渉法にて癌抑制遺伝子p53の発現を抑制した後、レトロウイルスベクターを用いてc-Mycおよび活性型K-Rasを強制発現させることで、自己複製能と多分化能を獲得したうえで免疫能が正常のマウスに腫瘍を形成することができる細胞(induced mouse ovarian tumor-initiating cell: iMOC)を樹立した。これら少数の細胞を正常免疫能のマウスの卵巣に同所移植することで、ヒト卵巣癌に生物学および組織学的に酷似した腫瘍を誘導することが可能である。さらに、形成されたマウス卵巣腫瘍組織において、EpCAM陽性の腫瘍細胞は高い腫瘍形成能を有し、さらに、自己複製能および分化能を保持していることを確認した。これらの腫瘍組織に対して、フローサイトメトリーを用いてEpCAM陽性あるいは陰性の細胞分画を分取することで、癌幹細胞と非癌幹細胞に分離することが可能であり、それぞれの分画を詳細に解析することができるため、*in vivo*で癌幹細胞の特性を解明することが可能である。

2. 研究の目的

卵巣癌の治療においてしばしば経験する治療抵抗性あるいは寛解後の再発、転移など、既存の抗癌剤治療には限界を感じることもすくなくない。卵巣癌患者の予後の改善に向けては、分子生物学的根拠に基づいた治療戦略の開発が望まれている。近年、悪性腫瘍の治療抵抗性や再発において、癌幹細胞の関与が指摘され、その知見が急速に集積されている。われわれは既に、癌幹細胞の生物学的特性を解析するための卵巣癌幹細胞マウスモデルを樹立しており、この実験システムを用いることで、卵巣癌幹細胞に關与するシグナルの同定ならびにそれを標的とした新規治療戦略の開発を研究の目的とした。

3. 研究の方法

われわれが樹立した卵巣癌幹細胞マウスモデルおよびヒト卵巣癌細胞株を用いて、癌幹細胞および非癌幹細胞それぞれの特性ならびに相互作用についての検討をすすめる。フローサイトメトリーにてEpCAM陽性およびEpCAM陰性の細胞集団をそれぞれ分取し、それらの幹細胞関連遺伝子や抗癌剤耐性に関わる遺伝子発現について*in vitro*で検討する。また、*in vivo*での検討として、マウスへの腫瘍細胞の移植実験を行い、EpCAM陽性細胞とEpCAM陰性細胞における腫瘍形成能の比較を行う。それぞれの細胞集団において造腫瘍能の差が見出された場合、抗癌剤治療抵抗性に関わるEpCAM遺伝子およびその下流シグナルについて解析する。

さらに、マウス卵巣癌幹細胞モデルで得られた結果に基づき、ヒト卵巣癌の臨床検体を用いることで、同定されたシグナルが予後や再発に及ぼす影響について免疫組織化学による検討を行い、その臨床病理学的意義について統計学的な解析を行う。実際に、進行卵巣癌症例で初回手術が試験開腹に終わり卵巣の原発巣あるいはダグラス窩の播種病巣の生検のみを施行した組織と、それら初回手術後に抗癌剤化学療法を行い、secondary debulking surgeryにて摘出した腫瘍の組織切片をそれぞれ作成し、各組織切片におけるEpCAM陽性細胞の割合や関連遺伝子の発現について検討する。さらに、そこで得られた癌幹細胞に關与する分子あるいはその下流シグナルに対して、卵巣癌再発あるいは生存における関連性を解析する。また、マウスモデルを用いて*in vivo*における癌幹細胞を標的とした抗癌剤治療実験を行う。

4. 研究成果

(1) 卵巣癌における癌幹細胞マーカーとしてのEpCAMの抗アポトーシス作用を介する抗癌剤治療抵抗性の分子メカニズムの解析

上皮細胞接着分子(EpCAM)は細胞接着に關与するI型膜タンパクであり、胚性幹細胞や他の正常組織における幹細胞との関連性が

指摘されている。また、様々な固形癌における癌幹細胞マーカーとしての報告があり、卵巣癌においても予後不良因子として重要である。すでにわれわれは、マウスを用いた卵巣癌幹細胞の実験モデルシステムを樹立しており、このシステムにおいてEpCAMが卵巣癌幹細胞のマーカーとしての役割を担っていることを見出した。

今回われわれは、卵巣癌におけるEpCAMの癌幹細胞としての特性を示すとともに、抗癌剤耐性機構におけるEpCAMの役割について、特にEpCAMと抗癌剤誘導性のアポトーシスとの関連性を明らかにすることを目的とし解析を行った。

ヒトおよびマウス卵巣癌細胞株を用いて、それぞれの細胞株におけるEpCAM陽性細胞の割合について、抗癌剤投与群および非投与群とでフローサイトメトリーにて比較を行ったところ、抗癌剤投与後にEpCAM陽性の腫瘍細胞の割合が増加することが示された。さらに、われわれが樹立した*in vivo*卵巣癌マウスモデルに対して、腹腔内に抗癌剤を投与することで、腫瘍組織におけるEpCAM陽性細胞の割合について解析した結果、抗癌剤を投与した群においてEpCAM陽性の腫瘍細胞の割合が増加が認められた。さらにヒト卵巣癌細胞株であるSKOV3とA2780における抗癌剤誘導性のアポトーシスについてアネキシン染色法を用いて解析した結果、EpCAM陰性細胞と比較してEpCAM陽性細胞は抗アポトーシス作用を有していることが示された。また、ウエスタンブロッティング法による網羅的なアポトーシス関連蛋白の発現解析から、EpCAM陰性細胞と比較して、EpCAM陽性細胞はアポトーシス誘導因子であるBaxの発現の低下と、アポトーシス抑制因子であるBcl-2の発現の上昇が認められた。以上より、EpCAM陽性細胞はアポトーシス抵抗性を獲得しており、抗癌剤に対し耐性を示すことが明らかになった。今後、卵巣癌に対するEpCAM陽性の癌幹細胞を標的とした治療が、卵巣癌の抗癌剤抵抗性の克服と卵巣癌治療の現状の打破に繋がることが期待される。

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 9 件)

1. Yae T, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Motohara T, Yoshikawa M, Yoshida GJ, Wada T, Masuko T, Mogushi K, Tanaka H, Osawa T, Kanki Y, Minami T, Aburatani H, Ohmura M, Kubo A, Suematsu M, Takahashi K, Saya H, Nagano O. Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. Nat Commun. 6;3:883,2012 査読あり
2. Motohara T, Tayama S, Narantuya D, Tashiro H, Katabuchi H. Anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma: clinical presentation, diagnosis, treatment, and surgical management. Int Canc Conf J. 2:121-130,2013 査読あり
3. Yoshikawa M, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Yae T, Motohara T, Sugihara E, Onishi N, Masuko T, Yoshizawa K, Kawashiri S, Mukai M, Asoda S, Kawana H, Nakagawa T, Saya H, Nagano O. xCT inhibition depletes CD44v-expressing tumor cells that are resistant to EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res. 15:1855-1866,2013 査読あり
4. 本原 剛志, 田代 浩徳, 片淵 秀隆. 婦人科がん -最新の研究動向- 卵巣癌. 卵巣癌の臨床病理学. 卵巣癌・子宮体癌の重複癌. 日本臨床. 74:523-527,2012 査読あり
5. 田代 浩徳, 佐々木 瑠美, 本原 剛志, 片淵 秀隆. 卵巣癌治療の標的分子の探索 マウスを用いた上皮性卵巣癌モデルシステム構築の意義. 産婦の実際. 61:171-180,2012 査読あり
6. 田山 親吾, 田代 浩徳, 本原 剛志, 山口 宗影, 本原 研一, 大場 隆, 片淵 秀隆. 正常大卵巣に局在し抗NMDA受容体脳炎を惹起した成熟嚢胞性奇形腫の1例. 日婦腫瘍会誌. 32:257-262,2014 査読あり
7. 本原 剛志, 片淵秀隆. Low-grade 漿液性腺癌の病態と治療. 産婦の実際. 63:959-965,2014 査読あり
8. 本原 剛志. -難治性卵巣癌の克服を目指して- 卵巣癌幹細胞および癌幹細胞ニッチとして機能する骨盤腹膜を標的とした新たな治療戦略. 日産婦誌. 66:2761-2770,2014 査読あり
9. 本原 剛志. 若手の最新研究紹介コーナー. 卵巣癌における癌幹細胞マーカー EpCAMの機能解析: 卵巣癌新規治療戦略の開発. 産と婦. 81:95-96,2014 査読あり

[学会発表](計 20 件)

1. The 5th Asan-Kumamoto International Joint Symposium (June 28, 2014, Asan, Korea)
Cancer stem cell in epithelial ovarian cancer. Tjhay F, Motohara T, Tayama S, Narantuya D, Sakaguchi I, Tashiro H, Katabuchi H.
2. The 4th Asan-Kumamoto International Joint Symposium (August 17, 2013, Kumamoto, Japan)
Epithelial cell adhesion molecule, a

potential marker of cancer stem cell, is associated with resistance to platinum-based chemotherapy in epithelial ovarian cancer. Tayama S, Motohara T, Tjhay F, Narantuya D, Takaishi K, Tashiro H, Katabuchi H.

3. The 4th Asan-Kumamoto International Joint Symposium (August 17, 2013, Kumamoto, Japan)

Survival impact of wide resection of the pelvic peritoneum in patients with epithelial ovarian cancer: Towards the development of novel surgical strategies for the removal of ovarian cancer stem cells and their niche. Motohara T, Tayama S, Saito F, Tjhay F, Takaishi K, Sakaguchi I, Tashiro H, Katabuchi H.

4. 第72回日本癌学会学術総会(2013年10月3日-5日:横浜市)

上皮性卵巣癌において癌幹細胞マーカーであるEpCAMはプラチナ製剤抵抗性に関与している. 田山 親吾, 本原 剛志, 田代 浩徳, 片淵 秀隆.

5. 第51回日本癌治療学会学術総会(2013年10月24日-26日:京都市)

本原 剛志, 田山 親吾, 高石 清美, 齋藤 文誉, 坂口 勲, 田代 浩徳, 片淵 秀隆.

6. 第13回日本婦人科がん分子標的研究会(2014年3月14-15日:米子市)

卵巣癌においてEpCAMは抗アポトーシス作用を介して抗癌剤治療抵抗性に関与している. 田山 親吾, 本原 剛志, Narantuya Dashdemberel, Francisca Tjhay, 高石 清美, 坂口 勲, 田代 浩徳, 片淵 秀隆.

7. 第66回日本産科婦人科学会学術講演会(2014年4月18日-20日:東京都)

卵巣癌幹細胞および癌幹細胞ニッチとして機能する骨盤腹膜を標的とした新たな治療戦略. 本原 剛志.

8. 第66回日本産科婦人科学会学術講演会(2014年4月18日-20日:東京都)

A subpopulation of EpCAM-positive cancer cells is involved in chemoresistance and prevents platinum anticancer drug-induced apoptosis in epithelial ovarian cancer. Tayama S, Motohara T, Tjhay F, Sakaguchi I, Tashiro H, Katabuchi H.

9. 第66回日本産科婦人科学会学術講演会(2014年4月18日-20日:東京都)

Involvement of CD44 variant, a cancer stem cell marker, in peritoneal metastasis and poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer. Tjhay F, Motohara T, Tayama S, Sakaguchi I, Tashiro H, Katabuchi H.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

本原 剛志(MOTOHARA, Takeshi)
熊本大学生命科学研究部
研究者番号:10457591

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: