

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670701

研究課題名(和文) 薬剤耐性難治性卵巣癌における上皮間葉転換誘導腹膜播種の克服に向けた新機軸

研究課題名(英文) New direction for the conquest of the EMT-related peritoneum dissemination in chemoresistant ovarian cancer

研究代表者

梶山 広明 (HIROAKI, KAJIYAMA)

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本科研費の成果は、卵巣癌における薬剤の獲得耐性化そのものが種々のEMT関連分子やmicroRNAの発現抑制を介して腹膜播種を増加させる負のスパイラル現象を解明したことである。本科学研究費課題において得られた最大の知見はマウス腹膜播種モデルにおけるAD-miR-200ba/429(アデノウイルスベクター)の投与が、顕著に腹膜播種を抑制し生存率の延長に寄与した。これらの結果によって、miR-200ファミリーの腹膜中皮への発現が腫瘍-中皮間の微小環境に変化を誘導し、腹膜播種の抑制の治療ターゲットとなり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mesothelial cells (MC) are the primary components of the tumor microenvironment for ovarian cancer (OC) cells. We show that TGF-beta-stimulated human MC (Cancer-associated mesothelial cells: CAM) are able to promote cancer cell attachment and proliferation and the activation of the promoter activities of MMP-2 and MMP-9, which are metalloproteinases necessary for tumor invasion. Expression of the miR-200 family was down-regulated in CAM, and restoration of the expression of miR-200 family members in MC suppressed cancer cell attachment and proliferation. Down-regulation of the miR-200 family by TGF-beta-induced Fibronectin production, which promoted cancer cell attachment to CAM. Finally, we demonstrated that the delivery of the miR-200s to CAM in mice inhibited OC cell implantation and dissemination. Our results suggest that alteration of the tumor microenvironment by the miR-200 family could be a novel therapeutic strategy for OC treatment.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 腹膜播種 マイクロRNA TGF- 腹膜中皮細胞 薬剤耐性 腹腔内微小環境

### 1. 研究開始当初の背景

上皮性卵巣癌の治療において手術で病変を摘除することが重要であるのはいまでもないが、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のが現状である。癌細胞には抗癌剤に対する自然耐性と獲得耐性が存在しており、これら二種の耐性克服と腹膜転移の抑制が卵巣癌に対するさらなる予後改善に対して不可欠である。通常、癌細胞が細胞間接着を失い、転移浸潤を生じる過程は上皮性細胞形態から線維芽細胞様形態へと変化する上皮・間葉形態転換現象 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) に基づく現象であると考えられている。我々はこれまで、卵巣癌腹膜播種における EMT のリンクを腫瘍細胞と、腹膜播種では腫瘍細胞の Counterpart である腹膜中皮細胞の両側から探求してきた。卵巣癌の腹膜播種は腫瘍細胞から一次的に分泌された TGF- $\beta$  が中皮細胞からの二次的な TGF- $\beta$  分泌を促進し、相乗効果的に腫瘍と中皮細胞の EMT を誘導している構図が想定される。

### 2. 研究の目的

本課題では特に薬剤の獲得耐性化そのものが種々の EMT 関連分子や microRNA の発現亢進を介して腹膜播種を増加させる負のスパイラル機構を解明する。さらに再発・再燃卵巣癌の予後改善を念頭に置いた戦略的分子標的治療を目指すものである。本研究の第 1 の研究目的は癌性腹膜炎形成時の癌-中皮間細胞コミュニケーションにおける microRNA を介するメカニズムを解明することにある。さらに、我々はこれまで CD13 および CD26 といった細胞膜型 Aminipeptidase (AP) の発現バランスが酵素活性非依存的に EMT あるいは Mesenchymal-epithelial transition (MET) を誘導しうること、逆に EMT 自体が CD13-CD26 発現変化に影響を与えることを示してきたが、この間に介在する酵素活性比依存的メカニズムがこれまで不明であった。この間をリンクさせる細胞骨格関連蛋白として Fascin を Key regulator として注目している。EMTness との関連性から Fascin の機能解析を本研究課題における第 2 の目的とした。

### 3. 研究の方法

難治性卵巣癌における“Chemogenic stress”に対する自然耐性および獲得耐性と EMT の双方向的リンクを“ジェネティック”および“エピジェネティック”の視点から多角的に検討し、EMT 誘導転写因子を標的とした新規治療法の可能性を追求した。まずは、CD13<sup>low</sup>CD26<sup>high</sup> タイプの NOS-2/3/4 細胞から CD13<sup>high</sup>CD26<sup>low</sup> タイプへと変貌を遂げたパクリタキセル耐性細胞群の網羅的アレイ対比によって既に確認されたファイブネクチン (FN1) に着目した。エピジェネティックスの観点から miR200c と FN1 の相互的 EMT

誘導性を検証した。次にジェネティックな観点から細胞骨格関連蛋白である Fascin に注目して卵巣癌の腹膜播種を増加させる負のスパイラル機構を転移浸潤に関する機能解析を行った。

### 4. 研究成果

本研究課題の成果は、以下の項目を明らかにし得たことである。

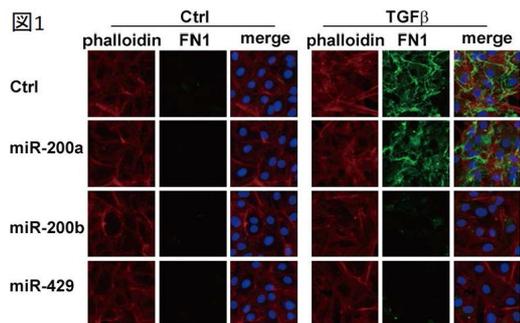
(1) ~腹膜中皮細胞における miR200 ファミリーの発現が卵巣癌の腹膜播種を抑制する~

FN1 転写領域には miR200c 結合域が存在しており、FN1 の影響を負に制御することを確認した。

卵巣癌細胞は TGF- $\beta$  のパラクライン作用により腹膜中皮を CAM へと変化させることで、微小環境を TGF- $\beta$  濃度の高い環境へと変え、CAM からの MMP-2,9 を利用して腹膜播種形成に有利な環境を整えていると考えられた。

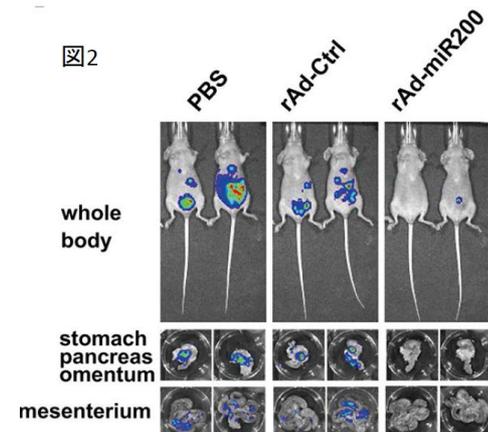
CAM では正常中皮細胞と比較して種々の卵巣癌細胞株との接着能が亢進した。また中皮-腫瘍の共培養において、CAM との共培養では腫瘍細胞の増殖能および MMP-2,9 プロモーター活性が有意に亢進した。

CAM では正常中皮と比較して endogenous な microRNA-200b、200a および 429 (miR-200ba/429) の発現抑制が観察されたが、exogenous にこれら microRNA を添加すると上記、 - の効果がキャンセルされた (図



1)。中皮における miR-200ba/429 の overexpression が、腫瘍の接着能および、増殖能を顕著に抑制した。

FN1 の 3'UTR に対する luciferase reporter assay および、発現解析、FN1 自身の機能阻害



などの結果から、miR-200ba/429 が直接 FN1 の発現を抑制することで、TGF- $\beta$  誘導性、腫瘍の転移浸潤能の亢進効果がキャンセルされた。

*in vivo* で miR-200ba/429 の腹膜播種抑制効果を検討するために、アデノウイルスベクター(AD-miR-200ba/429)を作成した。腹膜播種モデルのヌードマウスへ AD-miR-200ba/429 を投与したところ、顕著に腹膜播種が抑制された(図2)。

これらの結果によって、miR-200 ファミリーの腹膜中皮への発現が腫瘍-中皮間の微小環境に変化を誘導し、腹膜播種の抑制の治療ターゲットとなり得る可能性が示唆された。

### (2) ~細胞骨格関連蛋白 Fascin の機能解析~

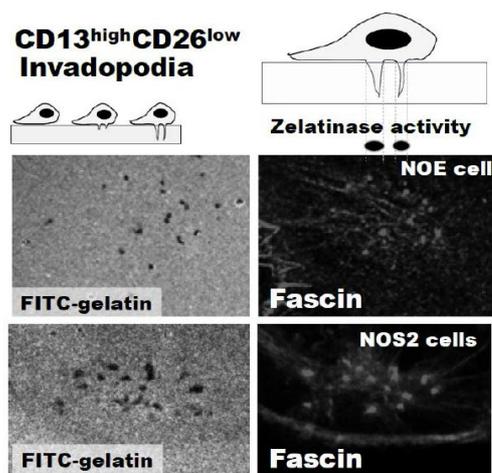
Fascin は細胞内においては、アクチン構造(filopodia, microspike, invadopodia, lamellipodia, stress fiber)上に局在していた(図3)。

卵巣癌細胞株における Fascin の発現解析では、一般的に mesenchymal phenotype を示す細胞株において高発現していた。

それらの細胞株(HE および ES-2)において、Fascin を knock down した結果、細胞浸潤能の低下が観察された。さらに Fascin 強制発現卵巣癌細胞では、コントロールと比較して gelatin 分解能と浸潤能が有意に亢進していた。

### Fascinの機能

図3



### 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.

Niimi K, Murakumo Y, Watanabe N, Kato T, Mii S, Enomoto A, Asai M, Asai N, Yamamoto E, Kajiyama H, Shibata K, Kikkawa F, Takahashi M. Suppression of REV7 enhances cisplatin sensitivity in ovarian clear cell carcinoma cells. *Cancer Sci*. 2014 May;105(5):545-52. 査読有  
doi: 10.1111/cas.12390.

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, Umezumi 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- $\beta$  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

The 1st International Workshop on Plasma for Cancer Treatment  
( Mar/25/2014, Washington DC, USA )  
Future Perspective of Strategic Plasma Therapy for Refractory Epithelial Ovarian Cancer. Kajiyama H, Nakamura K, Utsumi F, Tanaka H, Hori M, Kikkawa F.

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, Umezue T, Mizuno M, Kajiyama H, Kikkawa F.

JSAP-MRS ( Materials Research Society )  
Joint Symposia ( SEP 17/2013, Kyotanabe Campus, Doshisha University, Kyoto )  
Perspective of strategic plasma therapy for prognostic improvement of patients with ovarian cancer  
Kajiyama H, Utsumi F, Nakamura K, Tanaka H, Hori M, 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

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)

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)

〔産業財産権〕  
○出願状況 ( 計 3 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 : プラズマ照射点滴とその製造法  
発明者 : 水野 正明、堀 勝、吉川 史隆、梶山 広明、内海 史、中村 香江、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 : 2014-261364  
出願年月日 : 2014 年 12 月 24 日  
国内外の別 : 国内

名称 : 抗腫瘍水溶液および抗癌剤とそれらの製造方法  
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

〔図書〕( 計 3 件 )

がん・生殖医療の現状と展望 「化学療

研究者番号：00345886

(2)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