

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861317

研究課題名(和文)子宮内膜症からの多段階発癌モデルの作成

研究課題名(英文)Creation of the model of multistep carcinogenesis derived from ovarian endometrioma by introducing defined genetic elements

研究代表者

保野 由紀子 (Bono, Yukiko)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：80565416

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)：子宮内膜症性卵巣嚢胞から発生する癌化にはp53の不活化、KRAS遺伝子活性化の2 hitに加え、c-mycの活性化が必要であることが示唆された。bcl2、PIK3CA、phospho-Aktの関与については、これらの下流でいずれもmycが活性化されており、myc経路に集約される可能性があると思われた。

研究成果の概要(英文)：Malignant transformation of endometriotic epithelial cells required overexpression of c-myc or phospho-Akt or mutation of PIK3CA in addition to dysfunctional p53 and mutated KRAS. Since overexpression of phospho-Akt or mutation of PIK3CA lead to activate c-Myc by its phosphorylation, c-Myc activation in ovarian endometrioma might play a key role in transformation in the presence of dysfunctional p53 and activated ERK pathway.

研究分野：産婦人科

キーワード：子宮内膜症 卵巣がん 癌化

1. 研究開始当初の背景

近年、卵巣チョコレート嚢胞の癌化が問題となり、日本産婦人科学会の婦人科腫瘍委員会において、子宮内膜症癌化の頻度と予防の疫学研究に関する小委員会が立ち上げられ、前向きコフォート研究が進められている。卵巣チョコレート嚢胞の癌化は、難治性である明細胞癌へと進展することが多く、また卵巣癌の類内膜腺癌や明細胞癌では子宮内膜症の合併頻度が20-50%にも及び、臨床の現場で大きな問題となっている。卵巣チョコレート嚢胞の癌化においては、近年の分子生物学的解析によりp53、PIK3CA、phospho-Akt、KRAS (Kuo et. al. Am J Pathol. 2009) の変異など、ごく一部の遺伝子変化が知られるようになったが、その発生メカニズム、分子機構は全く不明である。一般に癌化の分子機構を明らかにするためには、ノックアウトマウスなどのマウスモデルが有用であるが、他方、発生母地の上皮細胞をin vitroで培養し、そこに様々な遺伝子操作を加えることで細胞を段階的に発癌させる多段階発癌モデルが重要な役割を演じる。しかしながら子宮内膜症の癌化モデル作成は、発生母地である内膜症上皮細胞の初代培養が極めて困難であり、これまでには実現していない。また多くの内膜症研究には間質細胞が実験に供されているのが現状である。これが子宮内膜症上皮細胞の癌化研究の遅れの主因である。当研究室では以前、RB蛋白の活性化を防ぐ遺伝子操作(HPV E6/E7遺伝子の導入)とテロメア伸張酵素テロメラーゼ(hTERT)の導入により、世界で初めて正常子宮内膜上皮細胞を不死化することに成功した(Kyo et al., Am.J.Pathol, 2003)。この技術を用い、卵巣チョコレート嚢胞上皮細胞を手術検体から分離、純化し、レンチウイルスベクターシステムによるcyclinD1/cdk4/TERTの遺伝子導入にて安定的に継代可能な不死化細胞を樹立し得た(Bono et. al. Br J Cancer. 2012)。また、正常子宮内膜上皮不死化細胞に

内膜癌で認められる既知の遺伝子変化を加えることでin vitroの癌化にも成功している(Mizumoto et al. Oncogene, 2006)。本研究では、卵巣チョコレート嚢胞上皮細胞から樹立した不死化細胞株に卵巣チョコレート嚢胞の癌化に関連する遺伝子を導入することで、子宮内膜症の癌化モデルの作成に取り組む。

2. 研究の目的

近年、卵巣チョコレート嚢胞の癌化が問題となっているが、その発生メカニズムは明らかになっていない。我々は以前、卵巣チョコレート嚢胞上皮細胞を手術検体から分離、純化し、レンチウイルスベクターシステムによるcyclinD1/cdk4/TERTの遺伝子導入にて安定的に継代可能な不死化細胞を樹立し得た。この細胞はがん形質を保持していないことを確認している。そこで、本研究では、この細胞に卵巣チョコレート嚢胞の癌化に関連している遺伝子を導入することで、卵巣チョコレート嚢胞上皮細胞の多段階発癌モデルを作成し、癌化に至る分子学的メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 不死化子宮内膜症細胞の癌化プロジェクト

不死化が多段階発癌の1st step であると考えられており、EMOsis-CC/TERT1 細胞はその段階にまで進んだ細胞と考える。以後どのような遺伝子変化が起これば癌化形質を獲得するかを明らかにすることは内膜症の癌化経路の解明に必須である。卵巣チョコレート嚢胞から発生した卵巣癌の遺伝子解析の結果、PTEN、p53、PIK3CA、phospho-Akt、KRAS 遺伝子変異などが明らかになってきている。そこで、PTEN 遺伝子変異をmimic するためにEMOsis-CC/TERT1 細胞にshRNA-PTEN を導入する。一方、K-ras 遺伝子変異をmimic するために活性型のoncogenic K-ras 遺伝子を導入する。さらに、ドミナントネガティブp53、

PIK3CA、phospho-Akt 遺伝子を導入する。これらのtransformant に癌化が起こっているかどうかを軟寒天培地の増殖能、マウス造腫瘍能などで検証する。この際、E2 依存性の有無を同時に解析する。導入するshRNA-PTEN、phospho-Akt、oncogenic K-ras 遺伝子は、以前当研究室が子宮内膜不死化細胞の癌化に成功した際(Mizumoto et al. Oncogene 2006) に使用した発現系(レトロウイルスベクター)を用いるので、効果は確実である。また、これら技術を駆使すれば、ドミナントネガティブp53、PIK3CA 変異遺伝子のstable transformant の作成は容易であると考えられる。さらに得られた癌化細胞については高度免疫不全マウス(NOD-SCID mouse 等)の皮下、あるいは腎被膜下あるいは卵巣に移植し、腫瘍が形成されればそのHistology 解析を行うとともに、免疫組織学的に各種因子の発現を検討する。特に癌化を起こさせるために遺伝子誘導またはノックダウンした因子の発現を見る。またステロイドレセプターの発現、さらには卵巣明細胞腺癌において過剰発現の見られるHNF1 (hepatocyte nuclear factor-1)についても検討する。

(2) 遺伝子スクリーニングによる内膜症癌化に関わる未知の遺伝子の探索と分子標的治療を目指した基礎研究

内膜症の癌化に関与するmiRNA は未だに同定されていない。我々が研究室で保持する内膜症から発生したと考えられる癌の手術検体からcDNA チップあるいはmiRNA チップにより発現量に変化のあるcDNA あるいはmiRNA をスクリーニングする。

スクリーニングされたcDNA あるいはmiRNA の発現量変化をRT-PCR, Northern, Western で解析する。実際に発現量に変化のあった遺伝子を発癌関連候補遺伝子とし、我々が作製した内膜症不死化細胞に強制発現させ、phenotype の変化を見る。

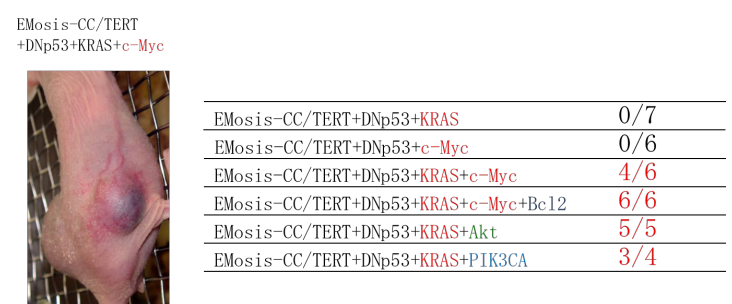
以上の実験によりphenotype に変化の見ら

れた遺伝子を内膜症発癌関連遺伝子として、分子標的診断及び治療への応用を企画する。4)具体的には同定された内膜症発癌関連遺伝子について、その発現を臨床検体で確認するとともに、clinicopathological characteristics との関連、さらには予後診断への応用について検討を加える。

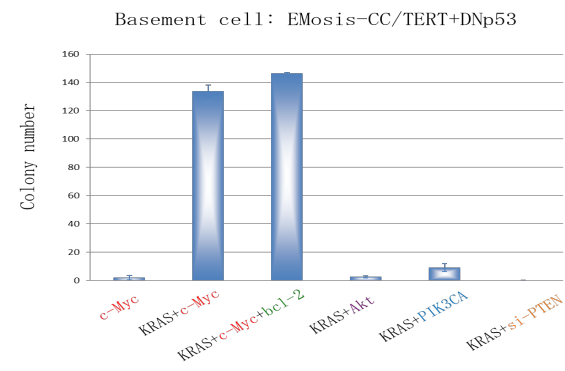
4 . 研究成果

内膜症より発生する卵巣がんの遺伝子異常の解析結果に基づき、卵巣チョコレート嚢胞から不死化した上皮細胞株に dominant negative p53 (DN-p53)、活性化型 KRAS 遺伝子を導入し、軟寒天培地上でのコロニーの形成、ヌードマウスの造腫瘍能を確認したが、コロニー形成、造腫瘍能とも認めなかった。さらに c-myc、bcl2、PIK3CA、phospho-Akt を強制発現したところ、いずれにもコロニーの形成とマウス造腫瘍能を認めた(図1)。c-myc の導入がコロニー形成、造腫瘍能とも最も高率であった(図2)

(図1) マウス造腫瘍能



(図2) 軟寒天培地上でのコロニー形成



また、文書による同意を得た子宮内膜症を合

併する卵巣癌 15 症例の p53、c-myc、phospho-Akt の発現を免疫組織染色、c-myc の遺伝子増幅を CISH 法にて、また PIK3CA の mutation 解析をし、子宮内膜症および併存する癌部分における各因子の違いについて検討したところ、子宮内膜症合併卵巣癌では癌部分において、p53、c-myc、phospho-Akt の過剰染色を認めた。PIK3CA の mutation 解析では、凍結組織から DNA を抽出した 8 症例中 2 症例で、PIK3CA の mutation を認めた。残りの症例は、固定パラフィン包埋から DNA を抽出したが、DNA が切断されていたため、PIK3CA のプライマーを設定しなおして施行したが、mutation を確認できなかった。さらに、卵巣明細胞腺癌において過剰発現のみられる HNF1 を卵巣チョコレート嚢胞から不死化した上皮細胞株に導入したところ、細胞が死滅し、培養系を作成することができなかった。以上から、子宮内膜症性卵巣嚢胞から発生する癌化には p53 の不活化、KRAS 遺伝子活性化の 2 hit に加え、c-myc の活性化が必要であることが示唆された。bcl2、PIK3CA、phospho-Akt の関与については、これらの下流でいずれも myc が活性化されており、myc 経路に集約される可能性があると思われた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

保野 由紀子、卵巣チョコレート嚢胞不死化細胞を用いた癌化モデルの作成と発がん分子機構の解析、日本産科婦人科学会、2014 年 4 月 19 日、東京国際フォーラム、東京都千代田区

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

保野 由紀子 (Bono Yukiko)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号 : 80565416

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし