

平成30年6月28日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10738

研究課題名(和文) 卵巣癌における膜型エストロゲン受容体GPR30を標的としたEMT現象の制御

研究課題名(英文) GPR30 signaling regulates Epithelial-Mesenchymal Transition in ovarian cancer

研究代表者

藤原 聡枝 (Fujiwara, Satoe)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：90707960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：GPR30の卵巣癌細胞株の細胞特性への影響とEMT関連因子の発現について検討した。細胞特性に関してGPR30選択的アゴニストであるG1を用い、3D培養を用いて位相差顕微鏡で検討を行った。またG1投与前後の細胞より、EMT関連因子の発現をQuantitative PCR、Western Blotting法にて解析を行った。G1投与により卵巣癌細胞は間葉系細胞様の形態に変化、sphereの形成を認めEMT化が推測された。またG1による刺激により、E-cadherine、AE1/AE3の発現低下、Snail、Vimentinの発現上昇を認め、分子生物学的にもEMT化が証明された。

研究成果の概要(英文)：The effect of GPR30 on EMT were evaluated in ovarian cancer cell line, A2780, which were cultured both in two-dimensional (2D) culture and three-dimensional (3D) culture model. GPR30 agonist, G1, was used to confirm the regulatory effects of GPR30 on the change of phenotypic modulation and EMT markers expression. In 3D culture, the stimulation of GPR30 leads the floating and sphere formation in A2780. G1-induced EMT was observed with related regulation of EMT markers expression at both mRNA and protein level. G1 induced the decrease of E-cadherin level and the increase of Snail and Vimentin in RT-PCR and Western blotting. Knockdown of GPR30, using siRNA, blocked G1-induced EMT. So, GPR30 might be an important molecule related to metastasis process in ovarian cancer.

研究分野：産婦人科

キーワード：卵巣癌 GPR30 EMT

1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣癌は近年、その罹患数は増加し、婦人科悪性腫瘍の中で死亡原因の第1位を占めている。卵巣癌に対する主治療としては、手術による腫瘍減量術や化学療法の有用性があるが、進行癌や抗がん剤、特に白金製剤に抵抗性を示す卵巣癌の予後は著しく悪い。我々は過去に、癌の浸潤・転移の制御や治療抵抗性癌の治療に向けた研究に注目してきた。我々は従来より、卵巣癌において、生存シグナルである Akt 経路が白金製剤の耐性に関わる重要な分子であることを *in vitro* および *in vivo* の研究で明らかにし、Akt の活性化が重要な予後因子であることを臨床病理学的にも確かめた (Tanaka Y, Ohmichi M, et al. *Cancer Biol Ther.* 2011 11: 50)。つまり、白金製剤の耐性化に関与する Akt 経路の抑制により、卵巣癌の白金製剤への耐性が解除され、抗がん剤の感受性が高まり、卵巣癌の治療効果が上がることを明らかにした (Tsunetoh S, Terai Y, Ohmichi M, et al. *Cancer Biol Ther.* 2010 10: 1137)。また一方で、同様に NCCN の治療ガイドラインでは、卵巣癌再発症例に対しホルモン療法が提示され、卵巣癌とエストロゲンとの関与が報告されている (JAMA 2001 285: 1460)。しかし、古典的なエストロゲン受容体 (ER α , ER β) の発現と卵巣癌の予後との関連はないと報告される。この点に着目し、新たなエストロゲンをリガンドとする膜型受容体 GPR30 (G-protein coupled estrogen receptor 30) に注目し、卵巣癌における GPR30 の発現意義について臨床病理学的に検討を行い、その発現が予後不良因子となること、また関与するシグナル経路が EGFR-Akt の活性化であることを証明した (Fujiwara S, Terai Y, Ohmichi M, et al. *JOvarian Res.* 2013 5)。

(2) また一方で近年、癌細胞の転移過程において、上皮系の細胞がその細胞極性を失い、間葉系細胞の性質を獲得し形態変化を起こし、間質内に浸潤・転移する現象として上皮間葉形質転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) が注目されている。早期に腹腔内播種を来す卵巣癌に対する治療戦略として、転移・浸潤の過程と考えられる EMT 現象の制御は卵巣癌の治療効果の上昇に非常に期待できると考えられるが、EMT 現象を

引き起こす機序については不明な点が多い。この EMT 現象は、Akt および下流の NF- κ B の活性化により調整されていること、これらの制御に Snail や Slug といった転写因子が関与していること、さらに Snail、Slug の制御が起こることが証明されている。つまり EMT 現象には、PI3K-Akt 経路が関与することが考えられている。我々は過去に、膜型エストロゲン受容体である GPR30 が卵巣癌の予後不良因子となり、Akt の活性化に関与することを証明している。この Akt の活性化は、先に述べたように GPR30 が EMT 現象を導く可能性が考えられる。また、転移の過程の1つとして、上皮細胞の接着因子の変化が考えられるが、その細胞接着に GPR30 の発現が関与するという報告 (Int J Gynecol Can. 2012 22: 539) がみられることから、さらに GPR30 が、転移・浸潤の過程を表すといわれる EMT 現象に関与することが示唆された。以上のことより、卵巣癌における GPR30 を介する EMT 現象を解析することで、卵巣癌の播種・転移メカニズムを解明できると考え研究計画を作成した。

2. 研究の目的

難治性である進行卵巣癌における腹膜播種病巣形成の初発段階である原発巣からの離脱に上皮間葉形態転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) 現象が関与している可能性がある点に着目し、我々が過去に卵巣癌で予後不良因子となることを報告した膜型エストロゲン受容体 GPR30 が腹膜播種病巣形成に関与するメカニズムの解明とその制御にむけた基礎的・臨床的検討を行うことを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) Lipofectamine 法を用いて GPR30 を強制発現させた卵巣癌細胞株 A2780 に、GPR30 の選択的アゴニスト (G1) および選択的アンタゴニスト (G15) を用いて GPR30 を刺激した時の EMT 現象による間葉系細胞への細胞形態変化および細胞集塊の形成の有無について、3D 培養を用いて位相差顕微鏡で検討する。

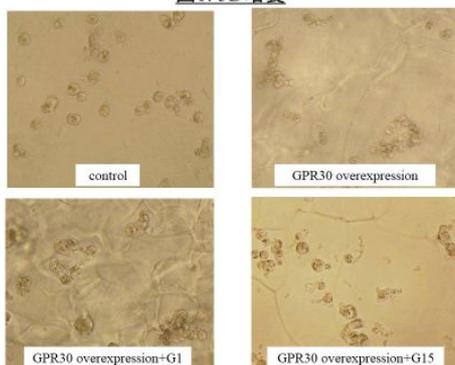
(2) GPR30 の発現ベクターを作成し、Lipofectamine 法で GPR30 を強制発現させた

卵巣癌細胞株 (A2780) を作成する。GPR30 の選択的アゴニスト (G1) を用いて GPR30 を刺激し、それぞれの細胞から RNA または蛋白を抽出し、EMT 関連因子 (E-cadherin、Snail) の発現を mRNA レベルは Quantitative PCR、蛋白発現は Western Blotting 法にて解析する。なお、比較対象として空ベクターを用いた GPR30 を強制発現させていない卵巣癌細胞株 A2780 を作成した。

4. 研究成果

(1) 卵巣癌細胞株 A2780 に対し、Lipofectamine 法を用いて GPR30 を強制発現する前の状態 (control; A) と強制発現後 (GPR30 overexpression; B)、強制発現の後に GPR30 選択的アゴニスト G1 添加 (GPR30 overexpression+G1; C) および選択的アタゴニスト G15 添加 (GPR30 overexpression+G15; D) することで、EMT 現象の細胞形態の変化の一つとされる sphere 形成を 3D 培養下で確認を行った (図 1)。A と比較し、B では卵巣癌細胞は 3D 培養下で浮遊し、さらに集塊 (sphere) を形成することが確認できた。さらに、GPR30 選択的アゴニストを添加した C では、その sphere 形成がさらに促進されたが、選択的アタゴニストを添加した D ではその反応は確認できなかった。卵巣癌細胞株に GPR30 を強制発現することで、接着能力が低下し EMT 現象である sphere を形成し、選択的アゴニストによりそれが促進されることから、GPR30 は EMT 現象を促すことが形態学的に証明された。

図 1. 3D 培養



(2) RT-PCR 法により mRNA レベルでの発現の変化を確認した (図 2)。空ベクターを用い、GPR30 を強制発現させていない細胞株 (scramble) に比較し、GPR30 を強制発現させた細胞株では、E-cadherin は有意に低下し、Snail が有意に上昇した。またこの反応は、選択的アゴニスト G1 を投与することでさらに促進された。同様に、蛋白レベルでの発現の変化を Western Blotting 法で確認した (図 3)。

蛋白レベルにおいても、GPR30 を強制発現させていない細胞株 (scramble) に比較し、GPR30 を強制発現させた細胞株では、E-cadherin は有意に低下し、Snail が有意に上昇し、選択的アゴニスト G1 を投与することでさらに促進された。以上の結果より、GPR30 は発現することにより EMT 現象を誘発し、選択的アゴニストによる刺激を行うとさらにその現象は促進することが証明された。以上のことより形態学的のみならず、GPR30 は分子生物学的にも EMT 現象に関与し促進することが証明された。

図 2. RT-PCR

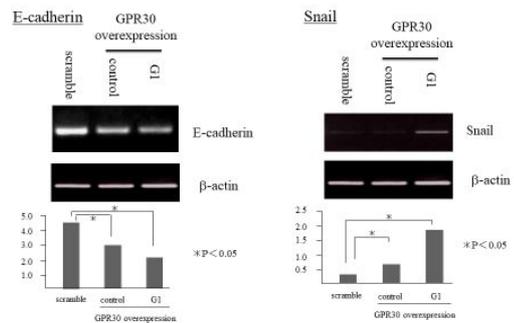
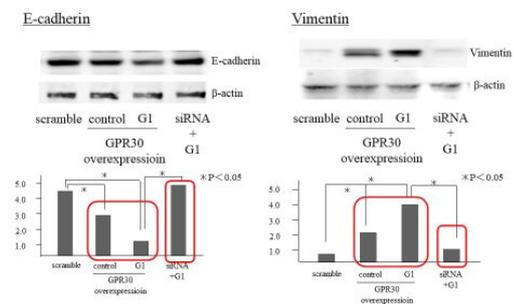


図 3. Western blotting



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)

(1) 藤原 聡枝 GPR30 signaling regulates Epithelial-Mesenchymal Transition in ovarian cancer、International Gynecologic Cancer Society、2018 年

〔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

藤原 聡枝 (Fujiwara Satoe)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：90707960

(2) 研究分担者

林 正美 (Hayashi Masami)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：00551748

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

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

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

恒遠 啓示 (Tsunetoh Satoshi)
大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：70388255

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

佐々木 浩 (Sasaki Hiroshi)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：80432491

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