

令和元年5月22日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06753

研究課題名(和文) 腹腔内細胞コミュニケーションに基づくp53変異卵巣癌における腹膜進展機序の新展開

研究課題名(英文) Elucidating mechanism of peritoneal metastasis in mutant p53 ovarian cancer based on cell-to-cell communication

研究代表者

芳川 修久 (Yoshikawa, Nobuhisa)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：60804747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：p53タンパクを発現していない卵巣癌細胞株に対してR248WとR248Qの2種類の変異型p53タンパクを強制発現させた新たな細胞株を樹立し、内因性miRNAの解析を行った。変異型p53の強制発現株2種類において1.5倍以上の発現上昇を認めたmiRNA8種類と2/3以上発現低下が認められたmiRNA17種類を同定した。腹膜進展機序の解明の一端として、成熟奇形腫患者と悪性転化した患者の間でパラフィン切片を用いて癌関連miRNAの網羅的解析を行い複数のmiRNAを同定した。また、癌性腹水中に多量に存在するPAI-1が腹膜中皮の変化を誘導することで好腫瘍環境を促進するメカニズムを解明し報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は難治性卵巣癌の腹膜微小環境におけるケモカインの意義の一端を明らかにするとともに、非常に稀な成熟奇形腫の悪性転化の発生に關与するmiRNA群を同定することを通して、卵巣癌の病態解明に寄与することになった。本研究の成果のみで現在の患者の治療を革新的に変化させたりできるものではないが、今後本研究を含む様々な知見の集積を通して卵巣癌の発生および難治性の克服につながっていくものと考えられる。本研究で得られた成果を継続して研究していくことがより一層のメカニズム解明に必要である。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the effects of exogenous mutant p53 protein on endogenous miRNAs expression, two different mutant p53 protein, R248W and R248Q, were expressed in ovarian cancer cell lines harboring p53-null. We identified eight miRNAs that showed 1.5-fold or more increase in expression and two miRNAs that had two-third or more expression reduction in two forced expression strains of mutant p53.

As a part of elucidation of the mechanism of peritoneal metastasis, we conducted comprehensive analysis of cancer-related miRNAs using FFPE between patients with mature teratomas and malignant transformations, and identified multiple miRNAs. We also elucidated and reported a novel mechanism by which PAI-1, which is abundantly present in cancerous ascites fluid, promotes changes in peritoneal mesothelial cells to promote the tumor-promoting environment.

研究分野：産婦人科

キーワード：卵巣癌 腹膜播種 微小環境 miRNA エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

上皮性卵巣癌の中でも特に腹膜転移を起こしやすい High Grade Serous Ovarian Carcinoma (HGSOc) はがん抑制遺伝子として知られる TP53 遺伝子の変異が必須の条件となっており、このほか相同組み換え修復異常もしばしば認められる。また、微小環境が癌の進展に寄与していることが徐々に明らかとなっており、そのメカニズム解明が新たな治療標的の特定につながり得ることもわかってきた。腹膜転移を起こしやすい HGSOc に認められる TP53 変異は、結果としてもたらされる正常な機能の喪失のみならず、変異型 p53 タンパクが細胞内に蓄積することにより癌細胞の様々な悪性形質を促進することも知られるようになってきている。とはいえ、HGSOc における好腹膜転移性は癌細胞のみならず腫瘍周辺の微小環境をも積極的に変化させて癌にとって都合のいい環境を作り出しているそのメカニズムは十分に明らかとなっておらず、特に変異型 p53 タンパクが微小環境へどのような影響を与えているかについては全く未知の状況である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、卵巣癌細胞を用いて変異型 p53 が細胞内代謝産物や腹腔内微小環境へ与える影響を網羅的に解析する。さらに、腹膜進展メカニズムを明らかとするために、腹膜中皮細胞との細胞コミュニケーションに関与する miRNA やケモカインの機能解析を行っていく。

3. 研究の方法

研究方法の概略としては以下の 3 項目にまとめられる。

- (1) 変異型 p53 タンパクの発現によって誘導される内的 miRNA 群の同定とその機能解析
- (2) 成熟奇形腫の悪性転化を誘導する特異的 miRNA の同定
- (3) 卵巣癌由来サイトカイン PAI-1 の腹膜中皮細胞誘導性の腹膜転移進展機構の解明

これらについて、卵巣癌細胞株のみならず、患者のパラフィン標本 (FFPE) の活用や患者由来の腫瘍組織をマウスに移植した Patient-derived xenograft マウスモデル (PDX モデル) を樹立し活用した。詳細については次項において記す。

4. 研究成果

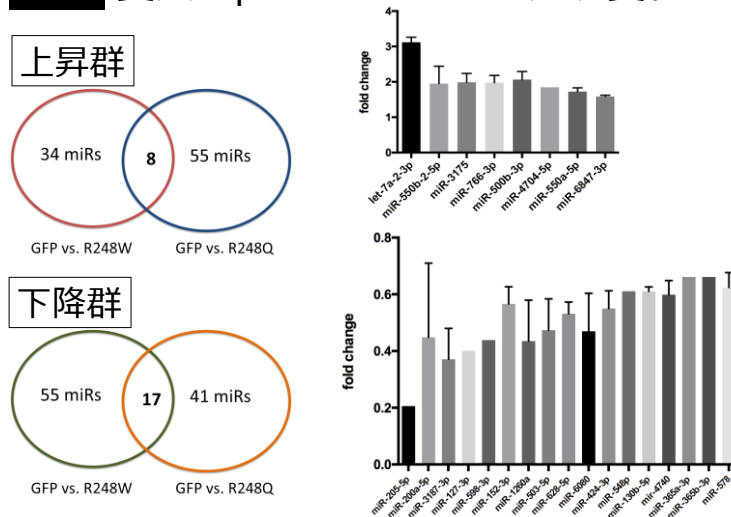
(1) 変異型 p53 タンパクの発現によって誘導される内的 miRNA 群の同定とその機能解析
変異型 p53 タンパクが腫瘍促進的機能を有することを gain-of-function (GOF) と呼び、TP53 変異の中でも様々な種類における変異が報告されている。今回の研究では HGSOc でしばしば認められる変異であって過去に GOF の報告のある R248Q および R248W の 2 つの変異に着目して研究を行った。pQCXIP ベクターを用いて外的に両変異を過剰発現させ有意な変化を認める細胞内 miRNA 群を同定した。(図 1) これらは変異型 p53

タンパクによりなんらかの制御を受けている可能性があると考えられる候補 miRNA 群であり、これらの中には過去に腫瘍抑制的に機能することが既知である mir-205-5p や mir-200a-5p が含まれていた。さらにこれらについて同じ条件の細胞の細胞内 miRNA を次世代シーケンサを用いて発現量まで確認し、十分量発現し且つ機能が十分明らかとなっていない miRNA として miR-152-3p, miR-424-3p, miR-503-5p, miR-5739, miR-125b-1-3p, miR-766-3p の 6 種類を同定した。今後これらの発現を PCR 解析にて確認するとともに、機能解析も行っていく見込みとしている。

(2) 成熟奇形腫の悪性転化を誘導する特異的 miRNA の同定

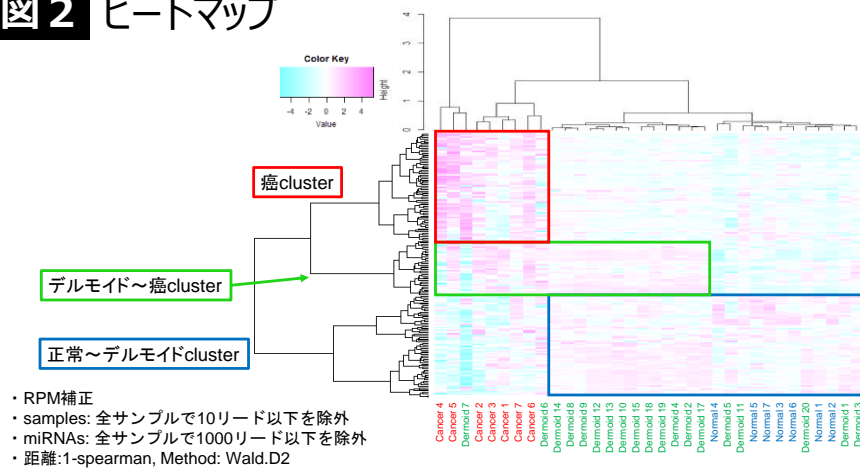
miRNA は様々な遺伝子の発現を介して発癌や腫瘍形質制御に寄与していることが明らかとなっており、婦人科領域で良性卵巣腫瘍の成熟奇形腫から稀に発生する悪性転化のメカニズムの解明に取り組んだ。患者 (成熟奇形腫悪性転化 7 例の癌部および正常部分、成熟奇形腫 20 例の主要部分) の FFPE 検体から miRNeasy FFPE kit を用いて RNA を抽出し miRNAs を次世代シーケンサを用いて網羅的抽出を行った。(図 2) これらの miRNA 群が腫瘍において実際発現しているか、また、腫瘍から分泌されているかを検討するため、PDX モデルを用いて検証し、PDX マウスモデルに生着した腫瘍組織内

図 1 変異型 p53 による miRNA 発現変化



miRNA およびマウスの血中のエクソソーム中に存在する miRNA は、FFPE 検体より抽出された候補 miRNA と共通しているものが含まれていた。これらの結果は成熟奇形腫の悪性転化の本質的機序に關与する可能性のある miRNA 群の同定だけでなく、血中エクソソーム内 miRNA を通した早期診断に寄与できる可能性も示唆するものとなった。

図2 ヒートマップ



- RPM補正
- samples: 全サンプルで10リード以下を除外
- miRNAs: 全サンプルで1000リード以下を除外
- 距離: 1-spearman, Method: Wald.D2

(3) 卵巣癌由来サイトカイン PAI-1 の腹膜中皮細胞誘導性の腹膜転移進展機構の解明

腹膜微小環境における卵巣癌腹膜転移促進機構の解明は本課題の重要なテーマの一つであるが、癌由来のサイトカイン PAI-1 および腹膜中皮細胞に着目した。研究代表者はこれまでの研究結果から癌性腹水やがん細胞由来メディアムが腹膜中皮細胞に線維芽細胞様の形態変化を誘導する現象を見出している。この変化の引き金となる癌細胞由来のサイトカインとしてサイトカインアレイを用いて PAI-1 を同定した。当院での卵巣癌症例 67 例および TCGA のデータベースを用いて PAI-1 発現と予後には負の相関関係があることを見出した。(図3) さらに、PAI-1 によって変化誘導の起きた線維芽細胞様腹膜中皮細胞を Cancer-associated mesothelial cells(CAMs)からは IL-8、CXCL5、Lopocalin-2 などが多量に分泌されるようになることが判明した。また卵巣癌細胞の PAI-1 発現を変化させ腹膜中皮細胞と共にマウス腹腔内に投与することにより PAI-1 抑制した場合においては腹膜中皮細胞の腫瘍促進効果が低減されることが示された。(図4)

図3 予後とPAI-1発現との相関

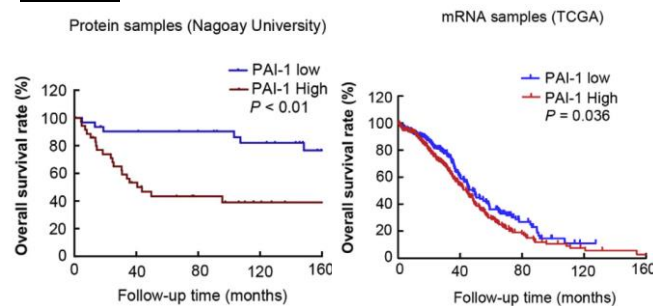
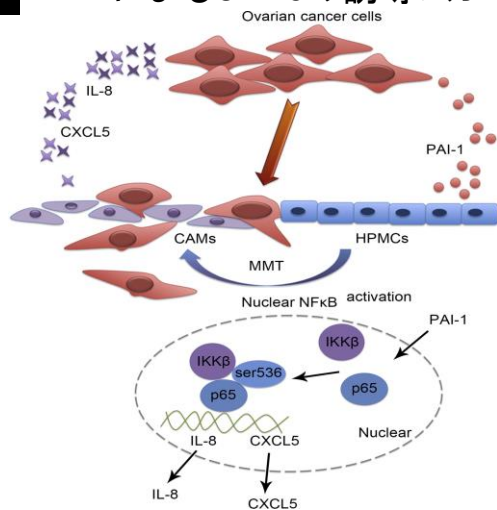


図4 PAI-1によるCAMsの誘導メカニズム



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Kajiyama H, Suzuki S, Yoshihara M, Tamauchi S, **Yoshikawa N**, Niimi K, Shibata K, Kikkawa F. Endometriosis and cancer. Free Radic Biol Med. 2019 Mar;133:186-192. 査読あり

- ② Peng Y, Kajiyama H, Yuan H, Nakamura K, Yoshihara M, Yokoi A, Fujikake K, Yasui H, **Yoshikawa N**, Suzuki S, Senga T, Shibata K, Kikkawa F. PAI-1 secreted from metastatic ovarian cancer cells triggers the tumor-promoting role of the mesothelium in a feedback loop to accelerate peritoneal dissemination. *Cancer Lett.* 2019 Feb 1;442:181-192. 査読あり
- ③ Tamauchi S, Kajiyama H, Yoshihara M, Ikeda Y, **Yoshikawa N**, Nishino K, Utsumi F, Niimi K, Suzuki S, Kikkawa F. Reproductive outcomes of 105 malignant ovarian germ cell tumor survivors: a multicenter study. *Am J Obstet Gynecol.* 2018 Oct;219(4):385.e1-385.e7. 査読あり
- ④ Yoshida K, Suzuki S, Sakata J, Utsumi F, Niimi K, **Yoshikawa N**, Nishino K, Shibata K, Kikkawa F, Kajiyama H. The upregulated expression of vascular endothelial growth factor in surgically treated patients with recurrent/radioresistant cervical cancer of the uterus. *Oncol Lett.* 2018 Jul;16(1):515-521. 査読あり
- ⑤ Fujikake K, Kajiyama H, Yoshihara M, Nishino K, **Yoshikawa N**, Utsumi F, Suzuki S, Niimi K, Sakata J, Mitsui H, Shibata K, Senga T, Kikkawa F. A novel mechanism of neovascularization in peritoneal dissemination via cancer-associated mesothelial cells affected by TGF- β derived from ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2018 Jan;39(1):193-200. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

- ① Tamauchi S, Kajiyama H, **Yoshikawa N**, Utsumi F, Suzuki S, Kikkawa F. A long non-coding RNA 'LUCAT1' mediates taxane-resistance acquisition in ovarian cancer 第 70 回日本産科婦人科学会 学術講演会 2018 年 5 月
- ② 玉内学志、梶山広明、吉原雅人、**芳川修久**、内海史、鈴木史朗、吉川史隆 109 名の卵巣悪性胚細胞腫瘍サバイバーにおける生殖アウトカムの検討 第 8 回日本がん・生殖医療学会学術集会 2018 年 2 月

[産業財産権]

取得状況 (計 2 件)

- ① 名称：腹腔内洗浄溶液の製造方法
 発明者：吉川史隆、堀勝、水野正明、豊國伸哉、梶山広明、**芳川修久**、中村香江、田中宏昌、石川健治、神藤高広、丹羽陽大、東田明洋
 権利者：国立大学法人名古屋大学、(株) FUJI
 種類：特許
 番号：特願 2018-203292
 出願年：2018 年 10 月 29 日
 国内外の別： 国内
- ② 名称：創傷治癒促進溶液の製造方法
 発明者：吉川史隆、堀勝、水野正明、豊國伸哉、梶山広明、**芳川修久**、中村香江、田中宏昌、石川健治、神藤高広、丹羽陽大、東田明洋
 権利者：国立大学法人名古屋大学、(株) FUJI
 種類：特許
 番号：特願 2018-203291
 出願年：2018 年 10 月 29 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

特になし