

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791552

研究課題名 (和文) タイプ2子宮体癌における癌幹細胞の同定およびターゲット治療の探索

研究課題名 (英文) Targeting of endometrial cancer with highly metastatic phenotype

研究代表者

馬場 長 (Tsukasa Baba)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60508240

研究成果の概要 (和文)：本研究では、子宮体癌における転移抑制因子メタスチンの機能、およびその受容体 GPR54 の発現機構について検討した。GPR54 陽性の子宮体癌は有意に予後良好であり、メタスチンにより浸潤・転移が抑制された。さらに、GPR54 遺伝子がエピジェネティックに発現制御を受けることを初めて明らかにし、GPR54 陰性の子宮体癌においても、脱メチル化剤などの併用により、その発現誘導が可能ならば、メタスチンの転移抑制効果が得られる可能性を示した。

研究成果の概要 (英文)：Invasion into deep myometrium and/or lymphovascular space is a well-known risk factor for endometrial cancer metastasis, resulting in poor prognosis. It is therefore clinically important to identify novel molecules that suppress tumor invasion. Reduced expression of the metastasis suppressor, KISS1 (kisspeptin), and its endogenous receptor, GPR54, has been reported in several cancers, but the significance of the KISS1/GPR54 axis in endometrial cancer metastasis has not been clarified. Metastin-10 is the minimal bioactive sequence of genetic products of *KISS1*. Clinicopathological analysis of 92 endometrial cancers revealed overall survival is improved in cancers with high expression of GPR54 ($p < 0.05$) and that GPR54 expression is associated with known prognostic factors including FIGO stage, grade, and deep myometrial invasion. Through RNAi and microarray analyses, metastin-10 was predicted to suppress metastasis of GPR54-expressing endometrial cancers *in vivo*. Methylation analysis revealed *GPR54* is epigenetically regulated. Metastin-GPR54 axis function was restored following treatment with the DNA hypomethylating agent 5-aza-DC. These data suggest that metastin-10 may be effective at inhibiting metastatic spread of endometrial cancers in combination with demethylating agents to induce GPR54 expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	2,500,000	750,000	3,250,000
平成22年度	900,000	270,000	1,170,000
度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

子宮体癌は欧米の婦人科悪性腫瘍の最多病因であるだけでなく、日本でも新規患者数がこの10年で倍増し、進行例や高リスク例も多く経験される。子宮体癌は比較的早期に発見されることが多く、子宮に局限したI/II期の癌が全体の約7割を占め、これらの症例では5年生存率95%以上と良好だが、遠隔転移をおこしたIV期では25%と予後不良であり、子宮体癌細胞の浸潤・転移の進行を食い止めることが、予後改善につながると期待される。子宮体癌は臨床病理学的に、エストロゲン依存性に発生する高分化型類内膜腺癌 (Type1) とエストロゲン非依存性に発生する低分化型類内膜腺癌や漿液性腺癌 (Type2) の2つのタイプに分類され、特にType2子宮体癌は転移を起しやすいたことが分っている。当研究は、転移好性で予後不良なType2子宮体癌特有の遺伝子発現パターンを解明し個別化治療を確立することが子宮体癌全体の予後改善には不可欠と考え、研究を開始した。

2. 研究の目的

当研究の目的は、癌幹細胞など子宮体癌において活発な転移形態や化学療法への高い抵抗性を示す予後不良な細胞集団の存在を明らかにし、予後不良なType2子宮体癌に特異的に発現変化が見られる遺伝子の中から分子標的治療の対象となる分子を同定することである。再発を繰り返す転移好性子宮体癌への新しい取り組みであり、これにより新しい治療法の確立が期待される。

3. 研究の方法

子宮体癌57例のマイクロアレイ解析を行い、Type2子宮体癌で癌幹細胞signatureが高いかどうか検討した。さらに、癌幹細胞は転移好性であることから、Type2子宮体癌においてこれまで明らかにされていない転移抑制系、metastin-GPR54経路について発現制御およびその機能を検討した。まず、92例の子宮体癌臨床サンプルにおいてmetastinおよびGPR54の免疫組織染色を施行し、予後との相関を臨床病理学的に検討した。次に、子宮体癌細胞株を用い、その発現およびプロモーター領域のメチル化解析を定量PCR法およびメチル化PCR法にて検討した。さらに、metastin添加による浸潤能の変化をボイデンチェンバーアッセイにて検討した。受容体であるGPR54をsiRNAにて発現抑制しながら同アッセイを行い、同受容体を介した機能変化であるかも検討した。さらに、metastinおよびsiRNAの添加の有無ごとに細胞を回収し、マイクロアレイ解析を行い転移signatureが変化するかを検討した。また、ヌードマウスにmetastinを投与し、子宮体癌の子宮外への転移を抑制するかを検討した。

4. 研究成果

子宮体癌57例のマイクロアレイ解析にて、Type1子宮体癌と比べてType2子宮体癌で有意に癌幹細胞signatureが高く(p=0.01)、Type2子宮体癌で

癌幹細胞がより高率に存在することが示唆された。さらに、転移抑制分子metastinの受容体であるGPR54の遺伝子発現がType2体癌で低いことが示唆され、免疫組織染色でもType2体癌で有意に発現が低いことが確認され、生存率解析でもGPR54発現低下群は有意に予後不良であった。さらにmetastin添加により子宮体癌細胞株の浸潤が制御されることを確認し、エピジェネティックな遺伝子発現解析にてGPR54発現低下は遺伝子プロモーター領域のメチル化によってもたらされていることを確認し、GPR54発現が低い子宮体癌細胞株にメチル化阻害剤を作用させることで発現が回復することを明らかにした。metastin単独では同細胞株の浸潤能は抑制されなかったが、メチル化阻害剤と併用することで浸潤能も有意に抑制されることを示した。また、metastin添加により転移signatureが下がるが、その作用はsiRNAによるGPR54の発現抑制にて拮抗されることをマイクロアレイ解析にて示した。最後にヌードマウスモデルにてmetastin投与により子宮からリンパ節への転移が抑制されることを示した。以上より、当研究は子宮体癌における転移抑制経路の重要性と今後の転移抑制治療の有効性の解明に貢献し、婦人科腫瘍学の進歩に寄与すると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計16件)

1. **Baba T**, Mandai M, Yamanishi Y, Suzuki A, Kang HS, Konishi I. Endometrial cancer implanted within a cesarean section scar. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011 Mar;37(3):245-9.
2. Kang HS, **Baba T**, Mandai M, Matsumura N, Hamanishi J, Kharma B, Kondoh E, Yoshioka Y, Oishi S, Fujii N, Murphy SK, Konishi I. GPR54 Is a Target for Suppression of Metastasis in Endometrial Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2011 Apr;10(4):580-90. Epub 2011 Jan 31.
3. Matsumura N, Huang Z, Mori S, **Baba T**, Fujii S, Konishi I, Iversen ES, Berchuck A, Murphy SK. Epigenetic suppression of the TGF-beta pathway revealed by transcriptome profiling in ovarian cancer. *Genome Res.* 2011 Jan;21(1):74-82.
4. Okamoto T, Matsumura N, Mandai M, Oura T, Yamanishi Y, Horiuchi A, Hamanishi J, **Baba T**, Koshiyama M, Shiozawa T, Konishi I.

- Distinguishing primary from secondary mucinous ovarian tumors: an algorithm using the novel marker DPEP1. *Mod Pathol*. 2011 Feb;24(2):267-76.
5. Abiko K, Mandai M, Hamanishi J, Matsumura N, **Baba T**, Horiuchi A, Mikami Y, Yoshioka S, Wakasa T, Shiozawa T, Konishi I. Oct4 expression in immature teratoma of the ovary: relevance to histologic grade and degree of differentiation. *Am J Surg Pathol*. 2010 Dec;34(12):1842-8.
 6. Matsumura N, Mandai M, Okamoto T, Yamaguchi K, Yamamura S, Oura T, **Baba T**, Hamanishi J, Kang HS, Matsui S, Mori S, Murphy SK, Konishi I. Sorafenib efficacy in ovarian clear cell carcinoma revealed by transcriptome profiling. *Cancer Sci*. 2010 Dec;101(12):2658-63.
 7. Kondoh E, Mori S, Yamaguchi K, **Baba T**, Matsumura N, Cory Barnett J, Whitaker RS, Konishi I, Fujii S, Berchuck A, Murphy SK. Targeting slow-proliferating ovarian cancer cells. *Int J Cancer*. 2010 May 15;126(10):2448-56.
 8. Bernardini MQ, **Baba T**, Lee PS, Barnett JC, Sfakianos GP, Secord AA, Murphy SK, Iversen E, Marks JR, Berchuck A. Expression signatures of TP53 mutations in serous ovarian cancer s. *BMC Cancer*. 2010 May 15;237.
 9. Yamaguchi K, Mandai M, Oura T, Matsumura N, Hamanishi J, **Baba T**, Matsui S, Murphy SK, Konishi I. Identification of an ovarian clear cell carcinoma gene signature that reflects inherent disease biology and the carcinogenic processes. *Oncogene*. 2010 Mar 25;29(12):1741-52.
 10. Barnett JC, Bean SM, Whitaker RS, Kondoh E, **Baba T**, Fujii S, Marks JR, Dressman HK, Murphy SK, Berchuck A. Ovarian cancer tumor infiltrating T-regulatory (T(reg)) cells are associated with a metastatic phenotype. *Gynecol Oncol*. 2010 Mar;116(3):556-62.
 11. Lee PS, Teaberry VS, Bland AE, Huang Z, Whitaker RS, **Baba T**, Fujii S, Secord AA, Berchuck A, Murphy SK. Elevated MAL expression is accompanied by promoter hypomethylation and platinum resistance in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2010 Mar 15;126(6):1378-89.
 12. Abiko K, **Baba T**, Ogawa M, Mikami Y, Koyama T, Mandai M, Konishi I. Minimal deviation mucinous adenocarcinoma ('adenoma malignum') of the uterine corpus. *Pathol Int*. 2010 Jan;60(1):42-7.
 13. Hamanishi J, Mandai M, Matsumura N, **Baba T**, Yamaguchi K, Fujii S, Konishi I. Activated local immunity by CC chemokine ligand 19-transduced embryonic endothelial progenitor cells suppresses metastasis of murine ovarian cancer. *Stem Cells*. 2010 Jan;28(1):164-73.
 14. Mandai M, Yamaguchi K, Matsumura N, **Baba T**, Konishi I. Ovarian cancer in endometriosis: molecular biology, pathology, and clinical management. *Int J Clin Oncol*. 2009 Oct;14(5):383-91.
 15. Mori S, Chang JT, Andrechek ER, Matsumura N, **Baba T**, Yao G, Kim JW, Gatz M, Murphy S, Nevins JR. Anchorage-independent cell growth signature identifies tumors with metastatic potential. *Oncogene*. 2009 Aug 6;28(31):2796-805.
 16. Ding X, Mohd AB, Huang Z, **Baba T**, Bernardini MQ, Lysterly HK, Berchuck A,

Murphy SK, Buermeyer AB, Devi GR. MLH1 expression sensitises ovarian cancer cells to cell death mediated by XIAP inhibition. *Br J Cancer*. 2009 Jul 21;101(2):269-77.

[学会発表] (計 9 件)

1. Kang HS, **Baba T**, Konishi I et al. "The novel role of GPR54 in endometrial cancer." 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2010/9/23, Osaka
2. Kharma B, **Baba T**, Konishi I et al. "Fludarabine as a possible alternative treatment in endometrial cancer type II by interfering STAT1 pathway." 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2010/9/23, Osaka
3. Kharma B, **Baba T**, Konishi I et al. "STAT1 and p53 status on chemotherapy-induced apoptosis in endometrial cancer." 14th International Congress of Immunology. 2010/8/22, Kobe
4. **Baba T**, Kang HS, Konishi I et al. "Metastin-10 suppresses invasion of endometrial cancer cells." The 6th International Symposium on Hormonal Oncogenesis. 2010/09/12, Chiba
5. **Baba T**, Kang HS, Konishi I et al. "Metastin-10 suppresses invasion of endometrial cancer cells." 41st Annual Meeting on Women's Cancer. 2010/03/15, San Francisco, USA
6. Kang HS, **Baba T**, Konishi I et al. "The novel role of GPR54 in endometrial cancer." 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2009/10/01, Yokohama
7. **馬場 長**, 姜 賢淑, 小西郁生. "子宮体癌における転移抑制ペプチド metastin の有用性." 第 48 回日本婦人科腫瘍学会学術集会. 2010/07/08, 筑波
8. 姜 賢淑, **馬場 長**, 小西郁生. "子宮体癌における metastin-GPR54 axis." 第 15 回生殖医学フォーラム. 2010/06/04, 唐津

9. 姜 賢淑, **馬場 長**, 小西郁生. "子宮体癌における転移抑制因子受容体 GPR54 の発現と機能." 第 8 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会. 2009/07/03, 博多

[図書] (計 2 件)

1. **馬場 長**, 万代昌紀, 小西郁生. 「子宮体がん: 転移リスクとその取り扱い」, 細胞工学別冊 がん転移:臨床と研究の羅針盤, 秀潤社, p83-88, 2010
2. **馬場 長**, 小西郁生. 「子宮ポリープ状異型腺筋腫(atypical polypoid adenomyoma, APAM)の病態と診断～日常診療で気をつけるべきこと～」, OG scope : 産婦人科医のための定期情報誌, 医科学出版社, v. 1, no. 2, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 長 (Tsukasa Baba)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号 : 60508240