

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390387

研究課題名(和文) 卵巣チョコレート嚢腫上皮の不死化、癌化による多段階発癌モデルの構築と分子標的探索

研究課題名(英文) Exploration of molecular targets for endometriosis-associated ovarian cancer with in vitro multistep carcinogenesis model

研究代表者

京 哲 (Kyo, Satoru)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：50272969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣チョコレート嚢腫からの癌化メカニズムを明らかにする目的で、卵巣チョコレート嚢腫の臨床検体より上皮細胞分画を単離し、cyclinD1/cdk4/hTERTを過剰発現させ上皮不死化細胞を樹立した。これらに卵巣チョコレート嚢腫合併卵巣癌に高頻度に見られる遺伝子異常の解析から明らかとなった遺伝子変異を導入し、phenotypeを観察した。その結果、dominant negative p53, oncogenic K-ras allele, c-myc overexpressionの導入にて癌化形質を有する細胞を樹立することに成功した。以上の成果は内膜症合併卵巣癌の分子標的の探索に有用と思われる。

研究成果の概要(英文)：To more understand the molecular mechanisms of ovarian carcinogenesis arising from ovarian endometrioma, we first established the immortalized epithelial cells from ovarian endometrioma via overexpressing cyclinD1/cdk4/hTERT cDNA. Based on the genetic analyses of clinical samples, we introduced several genetic factors into these cells to observe the transformed phenotypes. Introduction of dominant negative p53, oncogenic K-ras alleles, together with c-myc overexpression, enabled cells to obtain transformed phenotypes. These 3 steps appeared to be essential for ovarian carcinogenesis associated with endometriosis and thereby will be a promising molecular target for the novel treatment modality.

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：chocolate cyst endometriosis ovarian cancer immortalization carcinogenesis

## 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、前向きコホ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PTENやK-ras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。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。

これまで我々はヒト正常細胞が一定の培養期間後に増殖を停止するメカニズムとして染色体末端に存在するテロメアの短縮による細胞老化を詳細に解析してきた。その結果、多くの細胞が約30-50回の細胞分裂にてテロメアが限界までの短縮し、それによるDNAダメージシグナルの惹起が細胞周期を停止させ、細胞老化に導くことを明らかにしてきた。さらに多くの上皮細胞ではテロメア短縮による細胞老化の前段階として、細胞分裂10回前後の若い時期にRB蛋白の活性化に起因するpremature senescenceという細胞分裂停止の機構が働くことを明らかにしてきた。子宮内膜症上皮細胞もこの例に漏れず、培養早期でpremature senescenceに陥る。子宮内膜症上皮細胞の培養が不可能な理由はこの2つの障壁の存在による。

以前我々は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)。またこれらの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)。このように当研究室では上皮細胞に特定の遺伝子操作(Rb抑制およびTERT導入)を行うことで癌化まで誘導し得る技術を保持している。

## 2. 研究の目的

我々は卵巣チョコレート嚢腫の上皮細胞を効率的に純化する方法を構築している。予備実験において、同意を得て採取した手術材料より卵巣チョコレート嚢腫の上皮細胞を分離、純化し、様々な遺伝子操作を試みて、通常の培養では不可能な継代数に達する延命細胞を回収した(HEMOsis細胞)。これら

の卵巣チョコレート嚢腫上皮延命細胞は軟寒天培地上でのコロニー形成能もなく、ヌードマウスでの造腫瘍能も持たない。したがって癌化形質は獲得していない。現在までのところ、100世代以上にわたって培養可能である。この様な結果から、卵巣チョコレート嚢腫上皮細胞に特定のgenetic factorを導入することにより世界で初めてその不死化細胞の作成に成功したと考えている。本研究では症例数を増やしてこれらの不死化細胞の作成法を確立するとともに、その性状をさらに解析し、様々な遺伝子操作を加えて癌化細胞の作成をも試みる。最終的には得られた癌化細胞を用いて診断、治療に有用な分子標的を同定することまでを目的とした。

## 3. 研究の方法

卵巣チョコレート嚢腫から発生した卵巣癌の遺伝子解析の結果、ARID1Aの遺伝子異常が極めて高率(40-50%)に発見されている。またそれに次いで高率なものとしてPTEN遺伝子変異およびK-ras遺伝子変異などが明らかになってきている。近年、ARID1Aがクロマチンremodeling factorとして機能する際にp53を共役因子として使うことが明らかとなってきた。実際に、臨床材料による検討ではARID1Aの遺伝子変異とp53の遺伝子変異は互いに排他的で、互いの機能がクロマチンremodeling factorとして必須であることが示唆されている。すなわち、p53の異常は、卵巣チョコレート嚢腫から発生した卵巣癌の癌化に重要な働きをしている可能性がある。そこで、まずはp53の機能を抑制するためにdominant negative p53遺伝子を過剰発現させる。次いで、PTEN遺伝子変異をmimicするためにするためにHEMOsis細胞にshRNA-PTENを導入する。あるいは、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。さらには一部の内膜症合併卵巣癌に報告のあるc-mycの過剰発現、PIK3CAの遺伝子変異、さらにはリン酸化AKTの過剰発現などについても遺伝子操作によりmimicし、細胞のphenotypeを観察する。

## 4. 研究成果

(1) dominant negative p53およびoncogenic K-ras alleleは、各々単独、または両者を同時に導入しても、癌化形質は認められなかった。一方、両者の導入に加え、c-mycの過剰発現で高率に癌化形質を獲得した。さらには dominant negative p53およびoncogenic K-ras alleleに加え、PIK3CAの変異導入またはリン酸化AKTの過剰発現にて同様に癌化形質を獲得した。一方、dominant negative p53およびc-myc overexpressionの導入あるいはoncogenic K-ras alleleおよびc-myc overexpressionの導入のみでは癌化形質の獲得には至らなかった。

(2) 内膜症 チョコレート嚢腫 を合併する

卵巣癌症例のパラフィン包埋切片による免疫組織学的検討ではp53, c-mycの過剰発現が各々約40%, 20%に認められ、p53の特に強陽性の症例ではいずれもc-myc が強発現し、局在も一致していた。

以上の結果から、卵巣チョコレート嚢腫からの癌化のステップとして、p53の不活化とK-rasシグナルに加え、3<sup>rd</sup> stepとしてc-mycの過剰発現が重要であると思われた。

dominant negative p53およびc-myc overexpressionの導入では癌化は起こらず、c-mycの効果発現にはK-rasシグナルが必要と考えられたが、これはras signalingがc-mycのリン酸化を通じてc-mycの安定性を高め、結果的にc-mycの過剰発現を誘導することが知られており、同様の機構が存在するものと思われた。またp53の不活化はARID1A の遺伝子変異を同等の効果をもたらすことが予測されるが、ARID1Aの遺伝子ノックダウンは当研究室では十分には成功しておらず、本研究での実証は不可能であった。一方、PIK3CAの変異導入またはリン酸化AKTの過剰発現にても癌化形質を獲得したが、これらはPI3K-AKT pathwayに存在するシグナル活性化因子であり、下流にはc-mycが存在し、リン酸化を亢進する。したがって、PIK3CAの遺伝子変異およびリン酸化AKTの過剰発現はc-mycの活性化と本質的には同等の経路にあることが予測される。これらの多段階発癌機構の解析は、内膜症の癌化を予防あるいは治療する観点から重要な分子標的の検索につながる可能性がある。

#### 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 18 件)

1. Nakamura M, Takakura M, Fujii R, Maida Y, Bono Y, Mizumoto Y, Zhang X, Kiyono T and Kyo S. The PRB-dependent FOXO1/IGFBP-1 axis is essential for progesterin to inhibit endometrial epithelial growth. *Cancer Lett.* 査読有 336: 68-75, 2013.
2. Itoh F, Komohara Y, Takaishi K, Honda R, Tashiro H, Kyo S, Katabuchi H, Takeya M. Possible involvement of signal transducer and activator of transcription-3 in cell-cell interactions of peritoneal macrophages and endometrial stromal cells in human endometriosis. *Fertil Steril.* 査読有 99:1705-1713, 2013.
3. Zhou K, Koike C, Yoshida T, Okabe M, Fathy M, Kyo S, Kiyono T, Saito S, Nikaido T. Establishment and Characterization of Immortalized Human Amniotic Epithelial Cells. *Cell Reprogram.* 査読有 15: 55-67, 2013.
4. Kyo S. Endometrial cancer stem cells: Are they a possible therapeutic target? *Curr. Obstet. Gynecol. Rep.* 査読有 2:1-10, 2013.
5. Yokoyama T, Enomoto T, Serada S, Morimoto A, Matsuzaki S, Ueda Y, Yoshino K, Fujita M, Kyo S, Iwahori K, Fujimoto M, Kimura T and Naka T. Plasma Membrane proteomics identifies bone marrow stromal antigen 2 as a potential therapeutic target in endometrial cancer. *Int. J. Cancer.* 査読有 132: 472-484, 2013.
6. Teng Z, Yoshida T, Okabe M, Toda A, Higuchi O, Nogami M, Yoneda N, Zhou K, Kyo S, Kiyono T, Nikaido T. Establishment of Immortalized Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant.* 査読有 22: 267-278, 2013.
7. Takakura M, Kyo S, Nakamura M, Maida Y, Mizumoto Y, Bono Y, Zhang X, Hashimoto Y, Urata Y, Fujiwara T and Inoue M. Circulating tumor cells detected by a novel adenovirus-mediated system may be a potent therapeutic marker in gynecologic cancers. *Br. J. Cancer.* 査読有 107: 448-454, 2012.

8. Shinohara A, Kutsutake M, Takahashi M, Kyo S, Tachikawa E and Tamura K. Protease-activated receptor-stimulated interleukin-6 expression in endometriosis-like lesions in an experimental mouse model of endometriosis. *J.Pharmacol. Sci.* 査読有 19: 40-51, 2012.
9. Kyo S, Takakura M, Nishida S, Ozaki S, Oda M and Inoue M. Massive hemothorax due to diaphragmatic endometriosis after a laparoscopic cystectomy of an ovarian endometrioma in a patient without a history of thoracic endometriosis. *Arh.Gynecol.Obstet.* 査読有 286: 411-414, 2012.
10. Bono Y, Kyo S, Takakura M, Maida Y, Mizumoto Y, Nakamura M, Nomura K, Kiyono T and Inoue M. Creation of immortalized epithelial cells from ovarian endometrioma. *Br.J.Cancer.* 査読有 103: 1205-1213, 2012.
11. Mita S, Shimizu Y, Notsu T, Imada K, Kyo S. Dienogest inhibits Toll-like receptor 4 expression induced by co-stimulation of lipopolysaccharide and high-mobility group box 1 in endometrial epithelial cells *Fertil.Steril.* 査読有 96:1485-1489, 2011.
12. Ohno S, Takano F, Ohta Y, Kyo S, Myojo S, Dohi S, Sugiyama H, Ohta T, Inoue M. Frequency of myeloid dendritic cells can predict the efficacy of wilms' tumor 1 Peptide vaccination. *Anticancer Res.* 査読有 31:2447-2452, 2011.
13. Dohi S, Ohno S, Ohno Y, Takakura M, Kyo S, Soma G, Sugiyama H, Inoue M. WT1 Peptide Vaccine Stabilized Intractable Ovarian Cancer Patient for One Year: A Case Report. *Anticancer Res.* 査読有 31:2441-2445, 2011.
14. Kyo S, Maida Y and Inoue M. Stem cells in endometrium and endometrial cancer: Accumulating evidence and unresolved questions. Review article. *Cancer Letters* 査読有 308: 123-133, 2011.
15. Ohno S, Sumiyoshi Y, Hashine K, Shirato A, Kyo S, and Inoue M. Phase I Clinical Study of the Dietary Supplement, *Agaricus blazei* Murill, in Cancer Patients in Remission. *Evid Based Complement Alternat Med*, 査読有 vol. 2011, Article ID 192381, 9 pages, 2011. doi:10.1155/2011/192381
16. Mizumoto Y, Kyo S, Kiyono T, Takakura M, Nakamura M, Maida Y, Mori N, Bono Y, Sakurai H and Inoue M. Activation of NF- $\kappa$ B is a novel target of *KRAS*-induced endometrial carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* 査読有 17: 1341-1350, 2011.
17. Shimizu Y, Mita S, Takeuchi T, Notsu T, Mizuguchi K, Kyo S. Dianogest, a synthetic progestine, inhibits prostaglandin E2 production and aromatase expression by human endometrial epithelial cells in a steroid culture system. *Steroids*, 査読有 76:60-67, 2011.
18. Kyo S, Sakaguchi J, Kiyono T, Shimizu Y, Maida Y, Mizumoto Y, Mori N, Nakamura M, Takakura M, Miyake M, Sakamoto M and Inoue M.

Forkhead transcription factor FOXO1 is a direct target of progestin to inhibit endometrial epithelial cell growth. **Clin.Cancer Res.** 査読有 17: 525-537, 2011.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 京 哲  
卵巣チョコレート嚢胞の in vitro 癌化モデルの作成と癌化経路の解析  
第 13 回婦人科癌分子標的研究会  
米子 平成 26 年 3 月 15 日
2. 保野由紀子、京哲、高倉正博、中村充宏、  
水本泰成、宮川純奈、藤原浩  
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  
第 3 5 回エンドメトリオーシス学会  
鹿児島 平成 26 年 1 月 25 日
3. 京 哲  
子宮内膜症細胞の安定培養系の確率とその研究応用  
第 34 回日本エンドメトリオーシス学会  
イブニングセミナー  
宇都宮 平成 25 年 1 月 18 日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織  
(1)研究代表者

京 哲(KYO, Satoru)  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号：50272969

(2)研究分担者

高倉 正博(TAKAKURA, Masahiro)  
金沢大学・大学病院・助教  
研究者番号：20313661

(3)連携研究者

( )

研究者番号：