

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293341

研究課題名(和文) 微小環境EMTが誘導する腹腔内細胞コミュニケーションを狙った卵巢癌治療の新展開

研究課題名(英文) New strategy of treatment for ovarian cancer aiming intraperitoneal cell-cell communication induced by microenvironmental EMT

研究代表者

吉川 史隆(Kikkawa, Fumitaka)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40224985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題の目的は卵巢癌細胞によって活性化された癌関連中皮細胞が、いかに腫瘍細胞の腹膜親展に加担しているかを、微小環境EMTが誘導する腹腔内細胞コミュニケーションの観点から解明し、新規卵巢癌治療戦略の端緒とするものである。本課題は以下の3項目から成り立つ。(1)中皮由来のmiR-200 familyやVEGF経路に着目した腹腔内、癌-腹膜中皮の細胞コミュニケーションを伴う腫瘍腹膜進展機序の解明、(2)再発卵巢癌におけるEMT誘導転写因子ZEB1の機能解析とTGF- β シグナル経路活性化とEMT誘導転移能亢進のメカニズム、(3)卵巢癌における包括的細胞骨格制御システムの解析。

研究成果の概要(英文)：The TGF- β -mediated alteration of the tumor microenvironment plays a crucial role in tumor progression. Mesothelial cells are the primary components of the tumor microenvironment for ovarian cancer cells (OC). We show that TGF- β -stimulated human primary mesothelial cells (HPMCs) are able to promote cancer cell attachment and proliferation and the activation of the promoter activities of MMP-2 and MMP-9, which are metalloproteinases necessary for tumor invasion. Expression of the miR-200 family was down-regulated in HPMC by TGF- β stimulation, and restoration of the expression of miR-200 family members in HPMC suppressed cancer cell attachment and proliferation. Down-regulation of the miR-200 family by TGF- β induced fibronectin 1 production, which promoted cancer cell attachment to HPMC. Finally, we demonstrated that the delivery of the miR-200s to mesothelial cells in mice inhibited ovarian cancer cell implantation and dissemination.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巢癌 腹膜播種 腹膜中皮細胞 細胞コミュニケーション 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

上皮性卵巣癌は腹膜転移を起こしやすく、婦人科悪性腫瘍の中でも予後不良な癌種の一つである。癌細胞は抗癌剤や放射線などにさらされると、大部分はアポトーシスを生じ死滅したとしても、その一部は上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition : EMT) を生じることによって、よりストレスのない組織環境へ「逃避 (転移)」していく。抗癌剤や放射線、低酸素、および活性酸素などの微小環境ストレスが「転移原性ストレス」となり EMT をリクルートして、より “Metastatic” に、そしてより “ストレス抵抗性” に変化する構図が見えてくる。特に卵巣癌細胞はこの EMT を利用することによって本来、生体に「防御的」であった、腹膜中皮細胞を自身の腹膜進展に都合のように変貌させ、この「逃避」を成し遂げるアウトラインが浮かび上がってくる。

2. 研究の目的

本研究の目的は卵巣癌細胞により腹膜中皮細胞が活性化し、中皮自身にも EMT を生じるこの活性化した中皮細胞 (cancer-associated mesothelial cells: CAM) (図 1) がいかに癌細胞の腹膜親展に

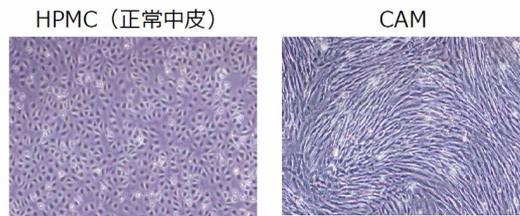


図 1

加担するかを、液性因子、microRNA、さらに癌 - 中皮相互作用などの側面から明らかにすることである。また、本課題は以下の「研究の方法」に述べる 4 つの観点から、卵巣癌における微小環境 EMT が誘導する腹腔内細胞コミュニケーションのメカニズムを解明し、新規卵巣癌治療戦略の端緒とするものである。

3. 研究の方法

研究方法の概略として以下の 4 項目が具体的、実験内容となる。(1) 中皮由来の mir-200 family に着目した腹腔内、癌-腹膜中皮の細胞コミュニケーションを伴う腫瘍腹膜進展機序の解明、(2) 再発卵巣癌における EMT 誘導転写因子 ZEB1 の機能解析と TGF-β シグナル経活性化と EMT 誘導転移能亢進の相乗効果的メカニズムの解明、(3) もう一方の、癌-腹膜中皮の細胞コミュニケーションとして、CAM からの VEGF 発現亢進に伴う癌性腹膜炎の悪化メカニズムの解明。さらに VEGF antagonist による CAM 化の抑制と、引き続き癌性腹膜炎の沈静化作用の探求、(4)

卵巣癌における包括的細胞骨格制御システムを解析し、卵巣癌のもつ癌-腹膜中皮相互 EMT モデルの関連性を追求する。

正常中皮細胞に、卵巣癌症例の癌性腹水、卵巣癌細胞株の培養上清、TGF-β (transforming growth factor-β) を添加することにより CAM が誘導された。しかしながら、CAM は大網由来ヒト中皮細胞の初代培養を通じて作成していたが、検体に応じて様々なバリエーション細胞が存在するため、均一 phenotype を持つ新たな CAM 化再現可能な細胞株の構築が急務であった。今回は中皮細胞に hTERT/SV40 発現ベクターを stable 発現させた新規 HPMC-pGLO 細胞の樹立に成功した。HPMC-TERT はこれまでの不死化中皮細胞と異なり特有の敷石状細胞・上皮細胞形態を保持しており、TGF-β で誘導される中皮の EMT 化 (CAM の実験的模倣) を再現できた世界で初めての細胞株である。

4. 研究成果

以下に本課題の成果を前述項目別に列記する。

(1)【卵巣癌-腹膜中皮の細胞コミュニケーションと microRNA】

癌性腹膜炎形成時の卵巣癌-中皮間細胞コミ

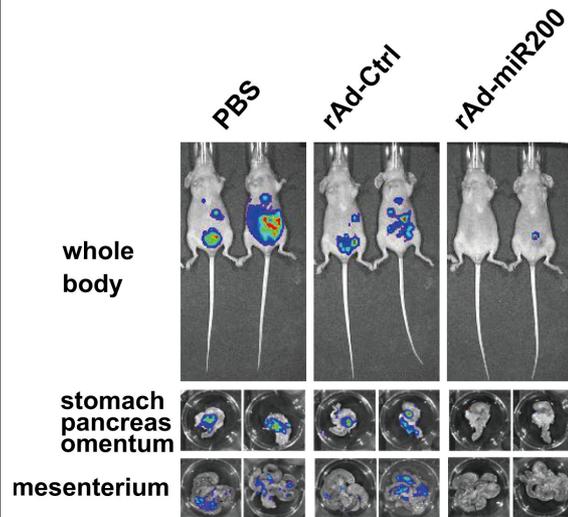


図 2

ュニケーションにおける microRNA を介するメカニズムを解明した。CAM では MMP-2 のプロモーター活性上昇を通じて腫瘍-CAM の接着性・浸潤性が亢進していた。また、腫瘍が正常中皮を癌関連中皮細胞に変化させ、中皮の miR200 ファミリーの発現減少、ファイブロネクチンの発現亢進から接着能、浸潤能・増殖能を増強させる結果を明らかにした。また、adenovirus ベクターを用いた miR200 の回復が動物モデルで著明な腹膜播種形成の減少に寄与した (業績 5 : Sugiyama K, Mol Cancer Ther (2014) : 図 2)。本項目が本課題の主たる成果である。

(2)【再発卵巣癌における EMT 誘導転写因子 ZEB1 の機能解析と TGF- β シグナル経路活性化と EMT 誘導転移能亢進のメカニズム】
 腫瘍-中皮細胞間の双方向性細胞コミュニケーションに基づく局所的 TGF- β リッチな微小環境の存在をすでに明らかにしている。その環境下では腹腔内で広範囲な CAM 化が生じており、TGF- β により、パクリタキセル耐性卵巣癌細胞では ZEB1 誘導性に TGF- β シグナル経路の活性化と EMT が誘導され、二次的に転移能が亢進するメカニズムを解明した。その際の局所 TGF- β accumulation が ZEB1 ノックダウンで抑制されることを明らかにした。CAM では、E-cadherin が低下、N-cadherin が上昇、SMA が蛋白レベルで上昇した。また、中皮の CAM 化は、TGF- β 受容体キナーゼにより抑制され、TGF- β 誘導性であることを確認した。CAM の培養上清は、卵巣癌細胞の浸潤能を有意に亢進させた。また real time PCR においても CAM において、TGF- β 、VEGF-A、IGF-1-2、MMP-2-9 の発現上昇が認められ、時間依存性・濃度依存性を有していた。TGF- β は中皮の CAM 化だけでなく、薬剤耐性卵巣癌細胞 (ROC) における EMT を誘導した。すなわち、TGF- β 添加により、ROC では E-cadherin 発現が減少、Vimentin、N-cadherin 発現の亢進が観察され、p-smad2 および TGF- β -R1 発現の亢進を認めた。すなわち、ROC では、TGF- β 刺激によりさらに TGF- β シグナル経路が活性化され、EMT の誘導から、転移能が亢進することが示唆された。これらより、腫瘍由来の TGF- β が CAM を誘導し、CAM からの二次的な TGF- β を促して、それらが微小環境で相乗効果的に ROC の転移浸潤性を亢進させるメカニズムを解明することができた。

(3)【CAM からの VEGF 発現亢進による癌性腹膜炎悪化のメカニズム】
 中皮細胞の培養上清を用いヒト臍帯静脈内皮細胞 human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) の遊走、血管形成の変化をそれぞれ migration assay, tube formation assay にて評価した。その結果、HUVEC の遊走が、CAM の培養上清を用いた場合において有意に亢進していた。同様に HUVEC の管腔形成の亢進を認めた。腹膜中皮細胞は、癌細胞によって線維芽細胞様に形態変化し VEGF 産生が亢進した。また CAM は、血管内皮細胞に作用し遊走や血管新生を促進することでさらなる癌の進展に寄与する可能性が示唆された。さらに VEGF antagonist の添加によって CAM 化を抑制し、引いては癌性腹膜炎の沈静化につながることを in vitro の系で解明した。

(4)【卵巣癌における包括的細胞骨格制御システムを解析】
 GFP-fascin を発現した ES2 細胞が中皮細胞に

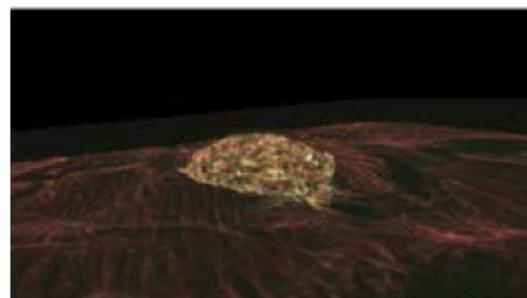
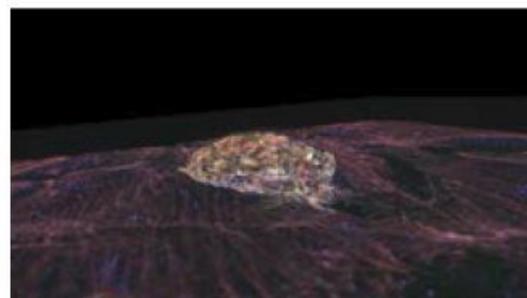
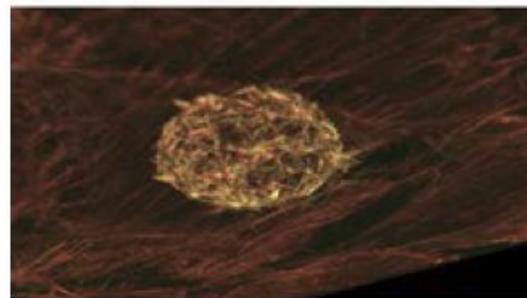
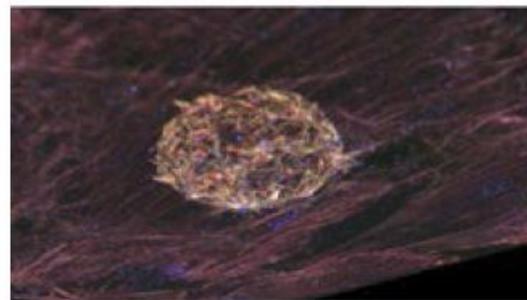


図 3

潜り込む際に、積極的に filopodia を出すことは観察された (図 3)。Human mesothelial cells を用いた中皮間隙 intercalation assay おいて、Fascin / Myosin X のダブルノックダウンが intercalation を有意に阻害し、中皮間隙への腫瘍の intercalation に重要な一役担うことが示された。また、Cortactin, CSPG4, および HS1 のノックダウンを用いた腫瘍運動の抑制系実験の結果、中皮細胞間隙への intercalation は、細胞運動

能とは非依存的に、Fascin, Myosin X による独立した制御系を介することが判明した。さらに、Fascin 強制発現 OC による、FITC-gelatin degradation assay の結果、対照比較で、約 5 倍の OC が、FITC-gelatin の分解能を有することが判明した。

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 6 件)

Utsumi F, Kajiyama H, Nakamura K, Tanaka H, Mizuno M, Toyokuni S, Hori M, Kikkawa F. Variable susceptibility of ovarian cancer cells to non-thermal plasma-activated medium. *Oncol Rep*. 2016 (in press) 査読有

Yoshikawa N, Kajiyama H, Nakamura K, Utsumi F, Niimi K, Mitsui H, Sekiya R, Suzuki S, Shibata K, Callen D, Kikkawa F. Variable susceptibility of ovarian cancer cells to non-thermal plasma-activated medium. *Oncol Rep*. 2016;35(5):2543-52. 査読有

Maeda O, Miyata-Takata T, Shibata K, Kajiyama H, Mizuno M, Tamakoshi K, Shimoyama Y, Nakamura S, Kikkawa F. Comparison of prognoses according to non-positive and positive spectrin α II expression detected immunohistochemically in epithelial ovarian carcinoma: a retrospective study. *Cancer Med*. 2016 (in press) 査読有

Yuan H, Kajiyama H, Ito S, Chen D, Shibata K, Hamaguchi M, Kikkawa F, Senga T. HOXB13 and ALX4 induce SLUG expression for the promotion of EMT and cell invasion in ovarian cancer cells. *Oncotarget*. 2015; 30;6(15):13359-70. 査読有

Sugiyama K, Kajiyama H, Shibata K, Yuan H, Kikkawa F, Senga T. Expression of the miR200 family of microRNAs in mesothelial cells suppresses the dissemination of ovarian cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2014 Aug;13(8):2081-91. 査読有

Sekiya R, Maeda M, Yuan H, Asano E, Hyodo T, Hasegawa H, Ito S, Shibata K, Hamaguchi M, Kikkawa F, Kajiyama H, Senga T. PLAGL2 regulates actin cytoskeletal architecture and cell migration. *Carcinogenesis*. 2014 Sep;35(9):1993-2001. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

第 68 回日本産科婦人科学会学術総会
2016 年 4 月 22 日(東京国際フォーラム、東京都、港区)

卵巣癌腹膜播種における癌細胞, 腹膜中皮細胞および血管内皮細胞の相互作用の検討 藤掛佳代, 柴田清住, 三井寛子, 内海 史, 関谷龍一郎, 鈴木史朗, 梶山広明, 吉川史隆

第 74 回日本癌学会学術講演会

2015 年 10 月 7 日(名古屋国際会議場、愛知県、名古屋市)

Expression of the miR-200 family in mesothelial cells suppresses the dissemination of ovarian cancer cells 梶山広明, 吉川史隆

第 67 回日本産科婦人科学会学術総会
2015 年 4 月 11 日(パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市)

PLAGL2 は卵巣癌細胞において Rac1 の活性化により細胞遊走能を制御する 関谷龍一郎, 三井寛子, 鈴木史朗, 水野美香, 梶山広明, 柴田清住, 吉川史隆

第 67 回日本産科婦人科学会学術総会
2015 年 4 月 11 日(パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市)

卵巣癌腹膜播種における腹膜中皮細胞と卵巣癌細胞間の相互作用 藤掛佳代, 柴田清住, 内海 史, 関谷龍一郎, 三井寛子, 鈴木史朗, 水野美香, 梶山広明, 吉川史隆

第 73 回日本癌学会学術講演会

2014 年 10 月 27 日(パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市)

PLAGL2 は卵巣癌細胞において Rac1 の活性化により細胞遊走能を制御する。 関谷龍一郎, 三井寛子, 鈴木史朗, 水野美香, 梶山広明, 柴田清住, 吉川史隆

第 56 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
2014 年 7 月 17 日(栃木県総合文化センター、栃木県、宇都宮市)

薬剤耐性卵巣癌における EMT 転写因子 ZEB1 および誘導因子 TGF- β の関与。 坂田 純, 梶山広明, 関谷龍一郎, 三井寛子, 鈴木史朗, 梅津朋和, 水野美香, 柴田清住, 吉川史隆

〔産業財産権〕

取得状況(計 5 件)

名称: 抗癌剤および輸液とそれらの製造方法ならびに抗癌物質

発明者: 水野 正明, 堀 勝, 吉川史隆, 梶山広明, 内海 史, 中村香江, 石川 健治, 竹田圭吾, 田中宏昌, 加納浩之

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2015/006419

出願年月日：2015年12月23日
国内外の別：国際

名称：抗腫瘍水溶液とその製造方法
発明者：堀 勝、倉家尚之、水野正明、吉川史隆、梶山広明、中村香江、石川健治、田中宏昌
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特願 2015-47884
出願年月日：2015年3月11日
国内外の別：国内

名称：プラズマ照射点滴とその製造法
発明者：水野正明、堀 勝、吉川史隆、梶山広明、内海 史、中村香江、石川健治、竹田圭吾、田中宏昌、加納浩之
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特願 2014-261364
出願年月日：2014年12月24日
国内外の別：国内

名称：プラズマ発生装置および抗腫瘍水溶液の製造方法
発明者：堀 勝、水野正明、吉川史隆、豊國伸哉、丸山彰一、田中宏昌、加納浩之
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特願 2014-180463
出願年月日：2014年9月4日
国内外の別：国内

名称：抗腫瘍水溶液および抗癌剤とそれらの製造方法
発明者：堀 勝、水野正明、吉川史隆、梶山広明、中村香江、内海 史、石川健治、竹田圭吾、田中宏昌、加納浩之
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特願 2014-122088
出願年月日：2014年6月13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/obgv/>

6. 研究組織

(1) 吉川 史隆 (KIKKAWA, Fumitaka)
名古屋大学・大学医学系研究科・教授
研究者番号：40224985

(2) 研究分担者

柴田 清住 (SHIBATA, Kiyosumi)
名古屋大学・大学医学系研究科・准教授
研究者番号：90335026

梶山 広明 (KAJIYAMA, Hiroaki)
名古屋大学・大学医学系研究科・准教授
研究者番号：00345886

(3) 連携研究者

千賀 威 (SENGA, Takeshi)
名古屋大学・大学医学系研究科・准教授
研究者番号：80419431