

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462620

研究課題名(和文) 卵巣がん腹膜転移におけるMETおよび播種に関わる新規分子の解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel molecules involved in the MET and disseminated in ovarian cancer peritoneal metastasis

研究代表者

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

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)：卵巣癌が腹膜播種病巣を形成する過程で、腹膜中皮細胞の防御機構の破綻が起こり、いわゆる「ミルクスポット」と呼ばれる腹膜中皮の欠損および中皮下組織の露出がおこるとされている。卵巣癌の腹膜播種において、卵巣癌細胞から分泌されるHGF(hepatocyte growth factor)がパラクライン的に作用し、腹膜中皮細胞のMMT(mesothelial-mesenchymal transition)を引き起こすことで卵巣癌細胞の腹膜播種が惹起されることを明らかにし報告した(Gynecologic Oncology 139: 345-354, 2015)

研究成果の概要(英文)：A current working model for the metastatic process of ovarian carcinoma suggests that cancer cells are shed from the ovarian tumor into the peritoneal cavity and attach to the layer of mesothelial cells that line the inner surface of the peritoneum, and several studies suggest that hepatocyte growth factor (HGF) plays an important role in the dissemination of ovarian cancer. The in vivo and in vitro experimental models revealed that HGF secreted by ovarian cancer cells induces the MMT and stimulates the invasion of mesothelial cells. Furthermore, manipulating the HGF activity affected the degree of dissemination and ascites formation. Finally, we demonstrated that HGF secreted by ovarian cancer cells plays an important role in cancer peritoneal implantation (Gynecologic Oncology 139: 345-354, 2015).

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 腹膜播種 MMT EMT HGF

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんの罹患者数は近年増加傾向にあり、死亡率に関しては子宮癌が大きく減少しているのに対して卵巣癌は肺癌、乳癌とともに増加傾向にある。卵巣癌は婦人科癌の中でも特に進行例では難治性である事が知られている。卵巣癌の進展経路は血行性およびリンパ行性はもちろんのこと、腹腔内臓器であるがゆえに広範囲にわたる腹膜播種が頻繁に起こり、それにより optimal 手術が困難となり、III 期以上の進行例での治癒率低下につながっていることは明白である。言い換えれば、腹膜播種の制御が可能となれば組織型に関わらず卵巣癌全体の治癒率は劇的に向上することは明らかである。

2. 研究の目的

卵巣がんが腹膜播種病巣を形成する初発段階である原発巣からの離脱に上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) と逆の現象 (mesenchymal-epithelial transition: MET) が関与しているのか否かを解明するとともに腹膜中皮細胞の中皮間葉転換 (mesothelial-to-mesenchymal transition: MMT) を介した腹膜中皮細胞の破壊および腹膜中皮下組織と卵巣がん細胞の接着・浸潤にかかわる因子を抽出し、腹膜播種成立の過程を明らかにすることにより播種形成の初期段階に関与する因子の同定およびそれを制御するメカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

1) 大阪医科大学産婦人科で治療をおこなった原発性上皮性卵巣癌患者のうち、書面にて同意を得られた 165 名を対象とし、外科的に摘出した組織の一部を採取し、ホルマリンにて固定後 Tissue microarray を作成した。卵巣癌上皮細胞の HGF 発現を比較するために、抗 HGF 抗体にて染色し、染色強度および染色面積を HGF スコアとして定量化した。組織型、進行期 (FIGO 分類)、血清 CA125 値、再発の有無における HGF スコアを比較し、患者背景との関連を検討した。

2) 卵巣癌腹膜播種モデルマウス作成に際し、4 種類の卵巣癌細胞株を準備した。漿液性腺癌 A2780 と SkOV3、粘液性腺癌 CaOV3、そして明細胞腺癌 RMG-1 において、HGF の分泌を mRNA 量は RT-PCR 法にて、蛋白量は Western blotting 法と ELISA 法にて定量化した。後述する結果 (研究成果 2)) により、HGF 非分泌卵巣癌腹膜播種モデルには A2780 を、HGF 高分泌卵巣癌腹膜播種モデルには CaOV3 を用いることとした。

3) 腹膜中皮細胞の浸潤過程を検討するため、Matrigel を用いた Cell invasion assay をおこなった。96well chamber の upper well に Matrigel をコーティングし、DMEM

serum-free medium、CaOV3 を 48 時間培養した上清 medium または A2780 を 48 時間培養した上清 medium に混和した腹膜中皮細胞株 MES-F 細胞を撒いた。Lower chamber には 10 % FBS-DMEM medium を満たし、48 時間培養した。Matrigel を well からはがし、HE 染色ののち顕微鏡で観察し、MES-F 細胞の Matrigel への浸潤能を定量化した。同時に MES-F 細胞の Matrigel への浸潤の際の MMT 現象を検討するために E-cadherin、N-cadherin、cytokeratin、Vimentin の発現変化を Western blotting 法にて検討した。

4) 卵巣癌腹膜播種マウスモデルの作成: 6 週令のヌードマウス (BALB/c Slc-nu/nu) に PBS で懸濁させた CaOV3 A2780 を 10 万個腹腔内へ注入した。HGF 高発現の CaOV3 群をさらに 2 群に分け、一方には PBS を、一方には HGF 中和抗体を腹腔内に投与した。HGF 低発現の A2780 群も 2 群に分け、一方には PBS を一方には HGF を腹腔内に投与した。以上 4 群のモデルマウスを作成し、毎週腹囲の測定を行い、腹水産生量を測定した。4 週間には安楽死ののち解剖し、腹膜播種部分の重量および腹水量を測定し、卵巣癌の腹膜播種における HGF の役割を検討した。

5) 上記マウスのうち、CaOV3 群における腹膜播種巣をホルマリン固定ののちパラフィン切片を作成し免疫染色を行ない、腹膜中皮細胞の MMT 化 (cytokeratin 減弱、E-cadherin 減弱、N-cadherin 増強) を確認した。

4. 研究成果

1) 卵巣癌組織 tissue microarray による HGF 発現比較:

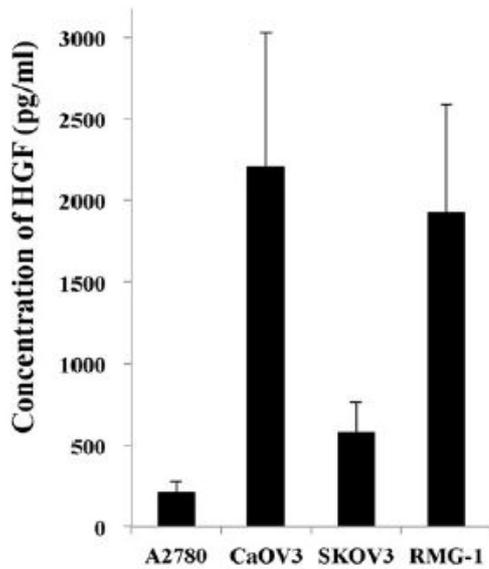
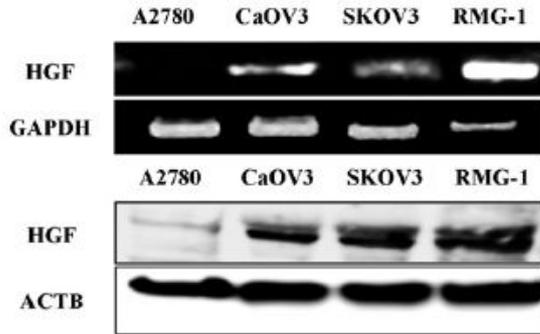
Results of immunohistochemistry of all ovarian cancer patients.

Variables	All	HGF low (%)	HGF high (%)	p-Value
Number of patients	165	46	119	
Age (years, mean) (± S.D.)	54.9 ± 11.0	54.3 ± 11.0	55.1 ± 11.0	0.5591
Histology				<0.0001
Serous	82	9 (11.0)	73 (89.0)	
Endometrioid	31	9 (29.0)	22 (71.0)	
Clear	34	17 (50.0)	17 (50.0)	
Mucinous	18	11 (61.1)	7 (38.9)	
FIGO stage				<0.0001
I	50	38 (76.0)	12 (24.0)	
II	14	0 (0)	14 (100)	
III	84	7 (8.3)	77 (91.7)	
IV	17	1 (5.9)	16 (94.1)	
Dissemination				<0.0001
Positive	115	8 (7.0)	92 (93.0)	
Negative	50	37 (74.0)	27 (26.0)	
CA125 (U/ml, mean) (± S.D.)	1953 ± 8691	459.3 ± 1531	2538 ± 10160	<0.0001
<35 U/ml	35	18 (51.4)	17 (48.6)	
≥35 U/ml	130	28 (21.5)	102 (78.5)	
CA19-9 (U/ml, mean) (± S.D.)	1852 ± 15001	883.9 ± 2881	2242 ± 17675	0.004
<37 U/ml	105	21 (20.0)	84 (80.0)	
≥37 U/ml	60	25 (41.7)	35 (58.3)	
CEA (ng/ml, mean) (± S.D.)	3.34 ± 8.17	4.54 ± 10.1	2.46 ± 5.83	0.2279
<10 ng/ml	155	43 (27.7)	112 (72.3)	
≥10 ng/ml	10	3 (30.0)	7 (70.0)	
Survival				0.0493
Alive	102	44 (43.1)	68 (56.9)	
Dead	63	13 (20.6)	50 (79.4)	
Recurrence				0.0012
-	75	31 (41.3)	44 (58.7)	
+	90	16 (17.8)	74 (82.2)	

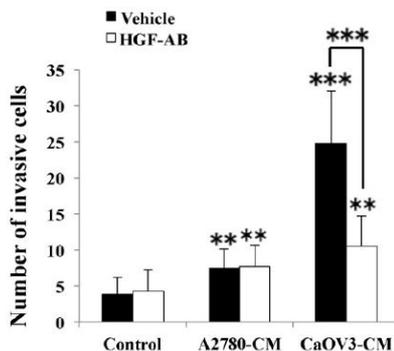
漿液性卵巣癌は他の組織型 (類内膜、明細胞、粘液性) と比較して HGF スコアが有意に高く、

Stage I は Stage II 以上の進行期と比較して HGF スコアが有意に低かった。HGF スコア高値群において血清 CA125 値および血清 CA19-9 値が高値であった。

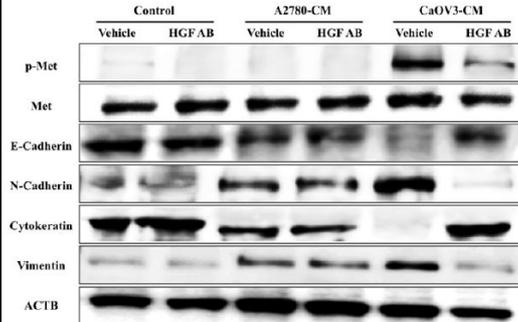
2) 漿液性腺癌の細胞株 A2780 における HGF 産生は、mRNA、蛋白量ともに CaOV3, SkOV3, RMG-1 と比較して有意に低かった。よって本研究では、HGF 非分泌卵巣癌腹膜播種モデルには A2780 を、HGF 高分泌卵巣癌腹膜播種モデルには CaOV3 を用いることとした。



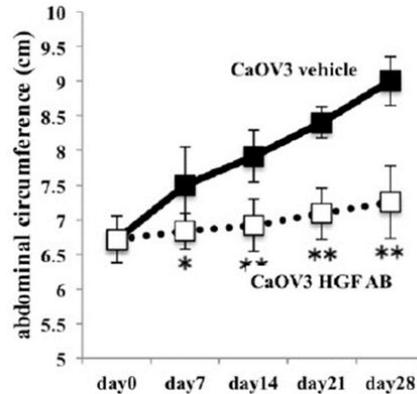
3) HGF 高分泌 CaOV3 細胞上清 (CaOV3-CM) で培養した MES-F 細胞の Matrigel への浸潤は、DMEM control medium と HGF 非分泌 A2780 細胞上清 (A2780-CM) で培養した場合と比較して有意に増加していた。この現象は HGF 中和抗体を添加することで抑制されたことより、腹膜中皮細胞の MMT 現象は卵巣癌細胞株から分泌された HGF 依存性であることが判明した。



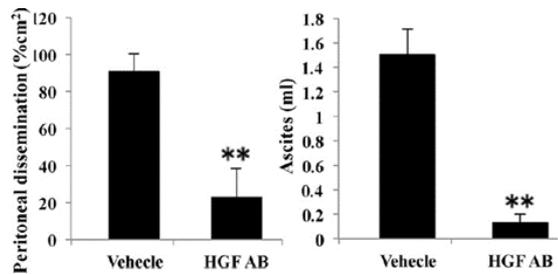
また、MES-F 細胞は CaOV3-CM で培養することで E-cadherin 発現低下、N-cadherin の発現増加、cytokeratin の発現低下、Vimentin の発現増加をみとめ、HGF 中和抗体にて抑制されたことより、MES-F 細胞における MMT 現象は卵巣癌細胞株から分泌された HGF 依存性であることが判明した。



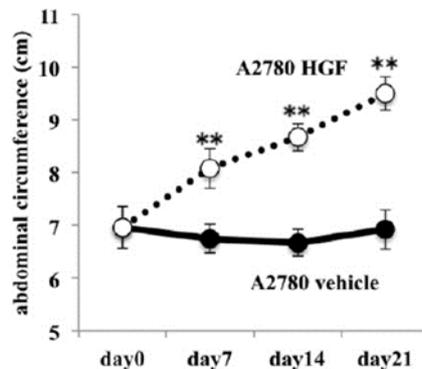
4) 腹膜播種モデルのうち、HGF 高発現 CaOV3 群の腹囲増加を検討したところ、Vehicle (PBS) 群と比較し、HGF 中和抗体群では有意に腹囲増加が抑制されていた。



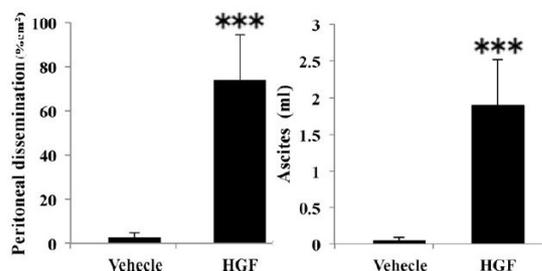
また、播種病巣の重量、および腹水量ともに HGF 中和抗体群で有意に抑制されていた。



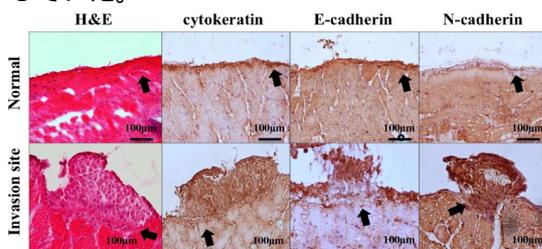
さらに、HGF 低発現 A2780 群の腹囲増加を検討したところ、Vehicle (PBS) 群と比較し、HGF 投与群では有意に腹囲増加が亢進していた。



また、播種病巣の重量、および腹水量ともに HGF 投与群で有意に亢進していた



5)CaOV3 群の腹膜播種巣における腹膜中皮の MMT 化を免疫染色で検討したところ、播種巣では cytokeratin 減弱、E-cadherin 減弱、N-cadherin 増強が確認され、MMT 化を起していた。



以上より、卵巣癌から分泌された HGF は、腹膜中皮細胞に作用し中皮細胞を MMT 化することで、腹膜播種巣形成に重要な役割を果たしていることが示された。

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 2 件)

1) Nakamura M, Ono YJ, Kanemura M, Tanaka T, Hayashi M, Terai Y, Ohmichi M. Hepatocyte growth factor secreted by ovarian cancer cells stimulates peritoneal implantation via the mesothelial- mesenchymal transition of the peritoneum. *Gynecol Oncol*. 2015 Nov;139(2):345-354. (査読あり)

2) Ono YJ, Hayashi M, Tanabe A, Hayashi A, Kanemura M, Terai Y, Ohmichi M. Estradiol-mediated hepatocyte growth factor is involved in the implantation of endometriotic cells via the mesothelial-to-mesenchymal transition in the peritoneum. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015 Jun 1;308(11):E950-E959. (査読あり)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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

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

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

恒遠 啓示 (Tsunetoh Satoshi)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：70388255

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