

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15604

研究課題名(和文) 卵巣癌における細胞骨格制御システムが織りなす腹膜播種の新規機序と包括的治療の構築

研究課題名(英文) A novel mechanism of the peritoneal dissemination via multiple network among cellular skeleton-related molecules in ovarian cancer

研究代表者

梶山 広明 (Kajiyama, Hiroaki)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00345886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は卵巣癌をとりまく微小環境において、腹膜中皮細胞(MC)を起源とする間質細胞集団を同定しており、それらを癌関連中皮細胞(CAM)と定義した。本課題ではCAMが担う卵巣癌の腹膜播種のメカニズム及び新規治療戦略の開発を目的とした。卵巣癌細胞を蛍光標識した後に、MC及びCAMと共培養させ、さらにシスプラチンを添加し、癌細胞の生存をフローサートメトリーにて観察した。その結果、MCに比較して、CAMとの共培養において生細胞の有意な増加を認めた。さらにCAMとの共培養下では、癌細胞はより間葉系形質を獲得することを示した。CAMからの刺激が卵巣癌細胞のプラチナ耐性に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Epithelial ovarian carcinoma (EOC) is believed to cause peritoneum dissemination through microenvironmental cell-to-cell communication between the tumor and mesothelium, leading to the further acquisition of progressive and metastatic potentials. In the present study, we aimed to determine the role of cancer-associated mesothelial cells (CAMCs) in the maintenance of cisplatin-resistance. Normal mesothelium (MC) showed an epithelial morphology with a cobblestone appearance. When MCs were co-cultured with malignant ascites from patients with advanced EOC, a dramatic morphologic change was noted from an epithelioid pattern to a-SMA-positive fibroblastic, mesenchymal pattern. Our findings indicate the possible involvement of CAMCs in the maintenance of cisplatin-resistance, resulting in being "seeds of recurrence". The novel mechanism of CAMCs as a facilitator of EOC progression is displayed through microenvironmental cell-to-cell communication between EOC and the mesothelium.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 腹膜播種 腹膜中皮細胞

1. 研究開始当初の背景

上皮性卵巣癌は進行期で発見させることが多く、予後不良の悪性腫瘍の一つである。特徴的な転移様式として腹膜播種があり、進展の過程や初回治療後の再発の場として、腹膜が重要な役割を担うと考えられる。今からおよそ130年前に提唱された「種と土壌」仮説では、癌細胞が至適な微小環境で発育する臨床的事実に準えており、上皮性卵巣癌においては、腹膜が「土壌」としての役割を果たすと考えられる。腹膜の表面は組織学的に一層の腹膜中皮細胞で構成されており、腹膜播種においては、経腹水的に拡散する卵巣癌細胞のファーストコンタクトの場となり、上皮性卵巣癌の微小環境を構成する一要素である。癌細胞と腹膜中皮細胞との関連を研究することで、癌の進展におけるそれらの相互作用を解明し、現状に置いて予後不良な卵巣癌への新規治療戦略が浮かび上がる可能性を秘めていると考える。

2. 研究の目的

癌の微小環境を構成する細胞は様々あるが、癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast: CAF) は、その中でも癌の生存維持や化学療法耐性に関与するとされるが、その起源は明確ではない。我々は、上皮性卵巣癌の周辺微小環境において、腹膜中皮細胞 (mesothelial cells: MC) を起源とする間質細胞集団を同定しており、それらを癌関連中皮細胞 (cancer-associated mesothelial cells: CAM) と定義した。腹膜中皮細胞が担う上皮性卵巣癌の進展における役割を解明することで、腹膜播種のメカニズム及び新規治療戦略の開発へとつなげる。

3. 研究の方法

(1) 手術検体の大網組織から、腹膜中皮細胞を抽出し、癌細胞から分泌される液性因子との関連を検討するため、*in vitro* における定性実験を行った。(2) 液性因子の中で重要と考えられた TGF- β 1 の上皮性卵巣癌での作用を検討するため、腹水中での濃度を定量し、腹膜中皮細胞への影響を検討するために各種機能実験を行い、TGF- β 1 により刺激された腹膜中皮細胞は、CAM へと変化することを確認した。(3) CAM の卵巣癌細胞の影響を、接着、増殖の観点から *in vitro* で評価し、また大網組織を直接用いた *ex vivo* でも同様に検証した。(4) CAM との共培養で、卵巣癌細胞に化学療法耐性が誘導されるかを検証した。

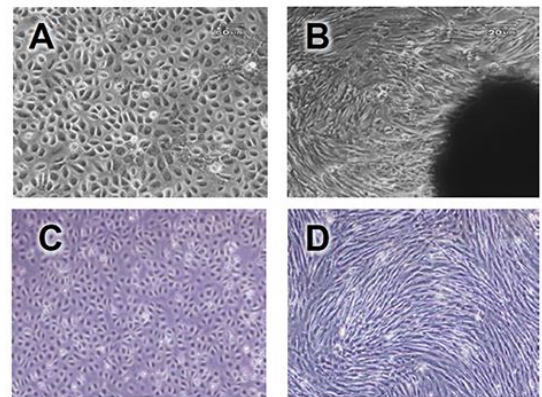
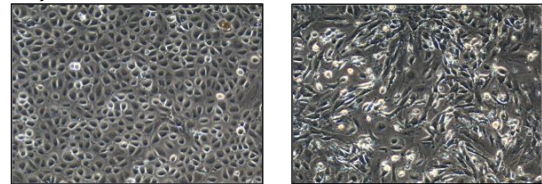
4. 研究成果

以下に本課題の成果を項目別に列記する。

【1】卵巣癌-腹膜中皮の細胞コミュニケーションと薬剤耐性維持機構の解明】

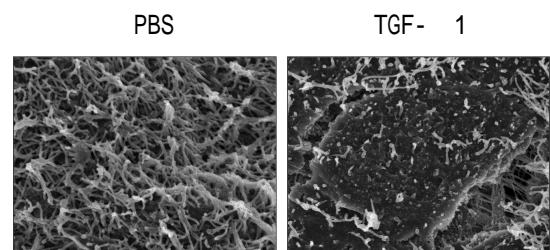
卵巣癌細胞株、悪性卵巣癌患者の術中腹水を、MC へ添加すると、敷石上の上皮性であった形態が、紡錘形の間葉系形態へと変化した。一方で、TGF- β 1 receptor inhibitor を添加したものでは変化が抑制された。これらの間葉系の形態を示した細胞は、CAF のマーカーである fibronectin や α -SMA 陽性となり、smad2 の上昇を認めたことから、TGF- β 1 依存性に上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) を引き起こしているものと推察された。

正常腹膜中皮細胞 CAM (ES-2 上清添加)

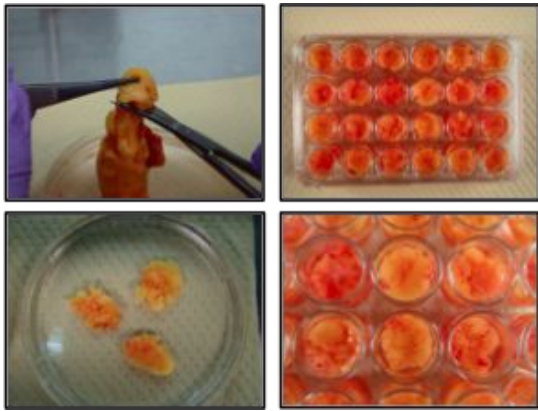


A: HPMCs, B: HPMCs cocultured with cancer tissue, C: HPMCs, D: HPMCs cocultured with malignant ascites

TGF- β 1 は良性卵巣腫瘍患者と比較し、悪性卵巣腫瘍患者の術中腹水内により高濃度に存在していた。TGF- β 1 で刺激した中皮は、CAM と考えられ、MC と比較して MMP-2、MMP-9 の分泌が亢進し、浸潤能の上昇を認めた。マウスの腹腔内にマウス由来の TGF- β 1 を投与し、壁側腹膜を走査型顕微鏡で観察すると、腹膜表面の微絨毛構造の減少及び細胞間接着の過疎化が認められた。

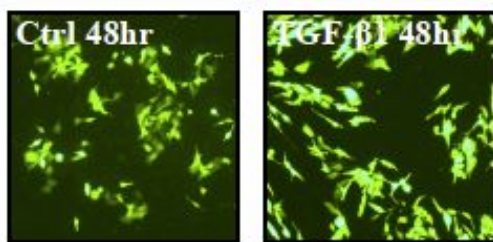


上皮性卵巣癌細胞株である ES-2 に GFP



及び luciferase を導入し、MC、CAM それぞれに添加して中皮細胞上での接着・増殖の変化を定量したところ、MC に比較して CAM との共培養で ES-2 の接着及び増殖が亢進することを確認した。手術検体から得た大網組織上でも、同様に TGF- β 1 刺激を行い、ES-2 の接着及び増殖の変化を luciferase 活性により定量したところ、*in vitro*と同様に、TGF- β 1 で刺激した大網組織上で両者ともに上昇していることが判明した。

上皮性卵巣癌細胞株である SKOV-3 を蛍光標識し、MC 及び CAM と共培養させ、代表的な上皮性卵巣癌治療薬であるプラチナ製剤（シスプラチン）を添加し、癌細胞の生存をフローサートメトリーにて観察したところ、MC に比較して、CAM との共培養で生細胞の増加を認めた。さらに CAM との共培養では、癌細胞の形態がより紡錘形となり、CAM からの刺激が、卵巣癌細胞のプラチナ耐性に寄与している可能性が示唆された。



(2)【卵巣癌における包括的細胞骨格制御システムを解析】

卵巣癌が腹膜播種を形成する際に、腫瘍細胞が中皮細胞へ接着し、さらにその間隙を透過していく過程は重要な成立構成要素の一つである。本課題は filopodia 形成に重要な fascin (FSCN1) と myosin X (MYO10) の二つの分子に着目し、卵巣癌細胞が中皮細胞を透過する (trans-mesothelial intercalation: TMI) メカニズム解明を主眼とした研究を行った。主立った結果は下記である。

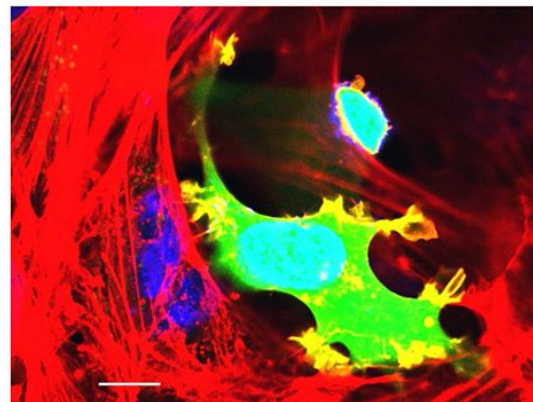
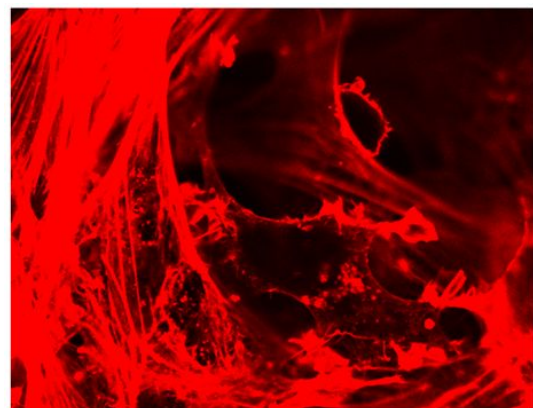
FSCN1 あるいは、MYO10 のノックダウンにより、TMI 効率は有意に抑制された。

FSCN1、または MYO10 の発現抑制によって、細胞表面の filopodia の数、長さ、寿命を減少した。さらに卵巣癌細胞の TMI においては、lamellipodia より filopodia の方がよりそれら分子のはたす役割の重要性が高いと考えられた。

N-WASP 阻害剤 wiskostatin (10 μ M) あるいは汎 MMP 阻害剤 (GM6001) の添加は、卵巣癌細胞の TMI に影響を及ぼさないことが判明した。

内在性の FSCN1 より GFP-FSCN1 を数倍量強制発現させた SKOV3 細胞では、GFP のみ発現させたコントロール細胞に比べて、播種 2 時間後の時点において 2 倍以上の TMI 効率の上昇が観察された。FSCN1 の強制発現により TMI 効率の上昇の結果が認められ、少なくとも FSCN1 は、癌細胞の TMI において重要な役割を担うことが結論された。MYO10 のノックダウンの効果、N-WASP 阻害剤の効果を加味すると、この過程においては、lamellipodia より filopodia の方が重要であると示唆された。

中皮間隙をインターカレーションを行っている卵巣癌細胞 (赤: F アクチン線維を染色した中皮細胞、黄緑: FSCN1 強制発現した卵巣癌細胞)



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 13 件)

Sakata J, Kajiyama H, Suzuki S, Utsumi F, Niimi K, Sekiya R, Shibata K, Senga T, Kikkawa F. Impact of positive zeb1 expression in patients with epithelial ovarian carcinoma as an oncologic outcome-predicting indicator. *Oncol Lett* 2017 (in press). 査読有

Liu W, Kajiyama H, Shibata K, Koya Y, Senga T, Kikkawa F. Hematopoietic Lineage Cell-Specific Protein 1 immunoreactivity indicates increased risk of poor overall survival in patients with ovarian carcinoma. *Oncol Lett* 2017 (in press). 査読有

Nakamura K, Kajiyama H, Utsumi F, Suzuki S, Niimi K, Sekiya R, Sakata J, Yamamoto E, Shibata K, Kikkawa F. Does secondary cytoreductive surgery improve oncologic outcome of patients with recurrent uterine sarcomas? *Mol Clin Oncol* 2017 (in press). 査読有

Yokoi A, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ishikawa M, Ikeda SI, Kato T, Kiyono T, Takeshita F, Kajiyama H, Kikkawa F, Ochiya T. Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer. *Nat Commun.* 2017 6;8:14470. doi: 10.1038/ncomms14470. 査読有

Sekiya Y, Yamamoto E, Niimi K, Nishino K, Nakamura K, Kotani T, Kajiyama H, Shibata K, Kikkawa F. c-Rel Promotes Invasion of Choriocarcinoma Cells via PI3K/AKT Signaling. *Oncology.* 2017 92(5):299-310. doi: 10.1159/000458529. 査読有

Kajiyama H, Utsumi F, Nakamura K, Tanaka H, Toyokuni S, Hori M, Kikkawa F. Future perspective of strategic non-thermal . *J Clin Biochem Nutr.* 2017 60(1):33-38. doi: 10.3164/jcfn.16-65. 査読有

Hattori S, Kajiyama H, Fuji U, Furui Y, Ishibashi Y, Hattori Y, Takahashi N, Kikkawa F, Misawa T. Clinical characteristics of primary peritoneal carcinoma patients: a single-institution experience involving 8 patients. *Nagoya J Med Sci.* 2016 78(4):407-414. doi:

10.18999/nagjms.78.4.407. 査読有

Suzuki S, Sakata J, Utsumi F, Sekiya R, Kajiyama H, Shibata K, Kikkawa F, Nakatsura T. Efficacy of glypican-3-derived peptide vaccine therapy on the survival of patients with refractory ovarian clear cell carcinoma. *Oncoimmunology.* 2016 30;5(11):e1238542. doi: 10.1080/2162402X.2016.1238542. 査読有

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 35(6):3169-77. doi: 10.3892/or.2016.4726. 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 5(6):1081-92. doi: 10.1002/cam4.683. 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. PRIMA-1MET induces apoptosis through accumulation of intracellular reactive oxygen species irrespective of p53 status and chemo-sensitivity in epithelial ovarian cancer cells. *Oncol Rep.* 2016 35(5):2543-52. doi: 10.3892/or.2016.4653. 査読有

Yoshida K, Kajiyama H, Utsumi F, Mitsui H, Shibata K, Kikkawa F. Radiotherapy for persistent malignant transformation from mature cystic teratoma of the ovary. *J Obstet Gynaecol Res.* 2016 May;42(5):584-588. doi: 10.1111/jog.12936. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

平成 28 年度文部科学省がんプロフェッショナル養成基盤推進プラン採択事業がんプロ講演会 2016 年 11 月 1 日(岩手医科大学 岩手県盛岡市)「婦人科がんに対する妊孕性温存治療の現状と課題 ~ 妊孕性温存を希望す

る初期卵巣がん患者に対する機能温
存手術～」梶山広明

The 40th World Congress of the
International College of Surgeons.
~Recent advances in gynecologic cancer
surgery: Sparing Fertility (Symposium)~
2016年10月26日(京都国際会館 京
都府京都市) Current Status and Future
Perspective of Fertility-sparing Surgery
in Patients with Epithelial Ovarian
Cancer. Kajiyama H

第54回日本癌治療学会学術集会 ワー
クショップ「卵巣がん手術療法」2016
年10月21日(パシフィコ横浜 神奈
川県横浜市) A recurrence-predicting
prognostic factor for patients with
early-stage epithelial ovarian cancer
undergoing fertility-sparing surgery」梶山
広明

Gynecologic Cancer Meeting 2016, ~East
Saitama Cancer Board~ 2016年10月13
日 (埼玉ロイヤルパインズホテル
埼玉県さいたま市)「いま、改めて卵
巣癌の腹膜進展を考える」梶山広明

The 6th International Conference on
Plasma Medicine. (2016/9/7 Brastirava
Slovenia) Plasma-irradiated liquid
therapy suppresses intraperitoneal
metastasis of chemoresistant ovarian
cancer. Kajiyama H, Utsumi F, Nakamura
K, Tanaka H, Hori M, Kikkawa F

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68回日本産科婦人科学会学術総
会2016年4月24日(東京国際フォー
ラム、東京都、港区)いま、改めて卵
巣癌の腹膜進展を考える～基礎と臨
床、腹腔内細胞コミュニケーションの
視点から～ 梶山広明

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

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 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

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/obgy/>

6. 研究組織

(1) 梶山 広明 (KAJIYAMA, Hiroaki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教
授
研究者番号: 00345886

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

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