

令和 3 年 4 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08703

研究課題名(和文) 子宮癌肉腫の癌幹細胞化の誘導・維持機構における癌肉腫・間質相互作用のダイナミズム

研究課題名(英文) S100A4/non-muscle Myosin II Signaling Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Stemness in Uterine Carcinosarcoma

研究代表者

三枝 信 (Saegusa, Makoto)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：00265711

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)：本研究では、子宮癌肉腫(UCS)におけるS100A4とその関連分子の役割を検索した。S100A4を過剰発現している細胞は癌幹細胞(CSC)の特性を有し、細胞増殖能の減少と移動能の増加を示した。この変化は、S100A4のノックダウンにより消失した。ショットガンプロテオミクス解析でS100A4は非筋細胞ミオシン(NM)を密接に関連した。プレビスタチンによりNMを特異的に阻害すると、S100A4の過剰発現が誘導され、線維芽細胞様変化が惹起された。以上から、UCSではS100A4/NMシグナル経路はEMT/CSCを誘導して、癌成分からの肉腫成分の派生や増殖・移動能の変化に関与する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

極めて予後不良の子宮癌肉腫の発生の分子機構の1つにS100A4/NMIIA経路が関与することを立証したことに学術的意義がある。次のステップとして、この経路に対して抑制的に作用する小化学分子化合物を網羅的に検索して、子宮癌肉腫の新規治療法の開発に繋げることに社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of S100A4 and related molecules in uterine cancer sarcoma (UCS). Cells overexpressing S100A4 had the characteristics of cancer stem cells (CSC), showing decreased cell proliferation and increased migration. This change disappeared by knockdown of S100A4. In shotgun proteomics analysis, S100A4 was closely associated with non-muscle myosin II (NMII). Specific inhibition of NMII by brevistatin induced overexpression of S100A4 and induced fibroblast-like changes. From the above, in UCS, the S100A4 / NMII signaling pathway induces EMT / CSC and is involved in the derivation of sarcoma components from cancer components and changes in growth and migration ability.

研究分野：分子病理学

キーワード：子宮癌肉腫 S100A4 ミオシン9 癌幹細胞 上皮間葉転換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮癌肉腫 (UCS) は高悪性度の単クローン性腫瘍で、癌成分と肉腫成分は共通の起源から発生する。

(2) 上皮・間葉転換 (EMT) は上皮細胞が間葉系の特性を獲得することで、癌幹細胞化の活性化と維持に密接に関係する。癌幹細胞 (CSC) は、自己複製能と多様な癌腫に分化する能力を有するが、EMT は幹細胞化を促進することから、CSC 様細胞が肉腫に分化する前駆細胞になりうる。

(3) S100A4 は Ca 結合タンパクである S100 ファミリーの 1 種で、p53 や非筋性ミオシン II (NM) などと相互作用を示す。グリオーマは S100A4 は EMT や CSC 化に関与する。

2. 研究の目的

UCS でもグリオーマと同様に S100A4 が UCS の発生過程に EMT/CSC 化を介して関与する作業仮説を立案した。本研究は、この仮説を立証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 子宮内膜癌培養細胞を用いて分子病理学的に、トランスフェクション、RT-PCR 法、ウェスタンブロットと免疫沈降法、フローサイトメトリーと Aldefluor アッセイ、免疫蛍光染色、老化関連 ガラクトシダーゼ (SA-β-gal) と老化様細胞、細胞移動能、共免疫沈降とショットガンプロテオミクスを行った。

(2) 子宮癌肉腫の臨床検体を用いて、免疫組織化学的に解析を行った。

(3) 統計解析は Mann-Whitney の U 検定と Spearman 補正を行った。

4. 研究成果

(1) 子宮内膜癌での S100A4 発現制御

S100A4 は炎症反応と関係するため、子宮内膜癌で 2 つの炎症関連サイトカインである TNF-α と TGF-β1 との S100A4 発現の関係を検索した。その結果、S100A4 は NF-κB/p65 経路により制御され、細胞周期で変動した。

(2) 子宮内膜癌における S100A4 発現と増殖および移動能の関係

子宮内膜癌において、S100A4 発現が細胞増殖能と関係を明らかにするために、S100A4 を過剰発現させた 2 つの Hec6 細胞と、S100A4 を特異的に阻害した Ishikawa 細胞を作製した。その結果、子宮内膜癌の増殖能や移動能は S100A4 発現により促進されることが明らかになった。

(3) 子宮内膜癌における S100A4 発現と癌幹細胞化性質との関係

子宮内膜癌における S100A4 と癌幹細胞化との関係を検索した。S100A4 発現は、子宮内膜癌における癌幹細胞化を促進することが判明した。

(4) S100A4 子宮内膜癌において NM II との関係

S100A4 と関係するタンパク質を同定するために、ショットガンプロテオミクスを行った。その結果、S100A4 結合タンパクとして NM II A (MYH9) と NM II C が同定できた。

(5) 子宮内膜癌における、NM II と上皮間葉転換・癌幹細胞化の特徴との関係

プレビスタチン (ミオシン I, V, X を阻害せずに、NM II の ATPase 活性を可逆的に阻害する) を用いて、子宮内膜癌での NM II の機能を評価した。その結果、プレビスタチンによる NM II の機能抑制により EMT/CSC が惹起され、また子宮内膜癌の移動能亢進が明らかになった。これは、S100A4 を過剰発現させた Hec6 細胞で得られた結果と合致した。

(6) 子宮癌肉腫での免疫染色の所見

子宮癌肉腫において、S100A4 スコアの平均値は、ALDH1, Slug, ALDH1 スコアと正の相関を示した。一方、Ki-67 とは負の相関を示した。また、ビメンチン, Slug, ALDH1 間でも正の相関がみられたが、NM A と pp65 との相関関係はみられなかった。

(7) 考案

子宮内膜癌において S100A4 は TNF- α /p65 経路による転写制御された、一方 TGF- β 1/Smad2 経路の影響はみられなかった。このことは、以下の実験結果から説明できる。第一に、Ishikawa 細胞を TNF- α と TGF- β 1 で処理すると、S100A4 が過剰発現し、pSmad2 と核の p65 発現も伴う。第二に、p65 のトランスフェクションにより S100A4 の mRNA 発現が亢進する。第三に、Smad2 ではなく、p65 の過剰発現により子宮内膜癌では S100A4 プロモーター活性が亢進する。子宮癌肉腫で、S100A4 と pp65 との免疫染色像に相関がないため、なぜ p65 が S100A4 を活性化させるかは不透明である。核での p65 の安定した発現のもと、TGF- β 1 依存性に S100A4 が発現していることから、TGF- β と NF- κ B 経路には相互作用がある可能性がある。S100A4 を過剰発現させた Hec6 細胞では、増殖能が低下し、移動能が亢進し、G2/M 期細胞が増え、pRb, cyclin A2, p21^{waf1} の発現が亢進していた。これは S100A4 欠損 Ishikawa 細胞での結果とは反対であった。G2/M 期の S100A4 mRNA 発現とタンパク発現より、特に G2/M 期で細胞周期を停止させる機能を S100A4 が有する可能性がある。このことは、子宮癌肉腫にて S100A4 と Ki-67 が負の相関を示すことと一致する。興味深いことに、cyclin B1-Cdk1 活性化に先行して、S100A4 は cyclin B1 を紡錘体へ誘導する可能性がある。また、腫瘍の中心部では、遊走細胞の増殖能が低いことがわかり、増殖能と移動能とが逆相関にあることが示された。共免疫沈降とショットガンプロテオミクスの結果から、S100A4 は MYH9 および MYH14 を含む NM と強固に結合した。さらに、NM を特異的に阻害するプレビスタチンを投与すると、S100A4 を過剰発現させた Hec6 細胞から得られた結果と類似した結果となった。つまり、S100A4 は NM の重蔵を効果的に阻害するといえる。S100A4 の過剰発現は癌幹細胞化の誘導と密に関係する。子宮内膜癌において、複数の幹細胞化マーカーの発現を亢進させ、形態学的に球形とし、ALDH1 発現細胞を増加させる。対照的に、S100A4 欠損細胞にはこういった幹細胞化の特徴が完全に欠落している。本研究でえられた結果は、膠芽腫や頭頸部癌でみられる自己再生能や生存に S100A4 が関与するという報告と合致する。細胞増殖と移動能という現象に加え、細胞周期の G2/M 期での停止が原因と思われる老化様細胞の増加は Hec6 および Ishikawa 細胞にみられたものの、Hec6 細胞 (Ishikawa 細胞には生じなかったが) にプレビスタチン処理をすると、EMT 様形態を呈し、さらに癌幹細胞化の特徴がみられた。様々な癌腫で上皮間葉転換は幹細胞化と関連していることが知られていることから、子宮癌肉腫において、S100A4 による NM 阻害により上皮間葉転換/癌幹細胞化が誘導され、形態的にも間葉系細胞を呈する可能性がある。子宮癌肉腫の特に肉腫成分で、免疫染色上 S100A4 と ALDH1, Vimentin, Slug などの上皮間葉転換/癌幹細胞化マーカーとの関連がみられたこともそれを支持する。Hec6 細胞と比べて Ishikawa 細胞にプレビスタチン処理をしても上皮間葉転換/癌幹細胞化がさほどみられなかったことについては、S100A4 が NM を阻害するには細胞自体の特性が関与している可能性があり、今後検討が必要である。

(8) 結論

TNF- α や TGF- β 1 や他因子により NF- κ B が活性化されると S100A4 発現が亢進し、S100A4 による NM 阻害により上皮間葉転換/癌幹細胞化が誘導され癌成分から肉腫成分が派生する。更には、細胞の増殖能と移動能が変化する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tochimoto M, Oguri Y, Hashimura M, Konno R, Matsumoto T, Yokoi A, Koderu Y, Saegusa M.	4. 巻 100
2. 論文標題 S100A4/non-muscle Myosin II Signaling Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Stemness in Uterine Carcinosarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lab Invest	6. 最初と最後の頁 682 - 695
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-019-0359-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiruta A, Oguri Y, Yokoi A, Matsumoto T, Oda Y, Tomohiro M, Hashimura M, Jiang Z, Tochimoto M, Nakagawa M, Saegusa M	4. 巻 190
2. 論文標題 S100A4/Nonmuscle Myosin IIA/p53 Axis Contributes to Aggressive Features in Ovarian High-Grade Serous Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Pathol	6. 最初と最後の頁 2304-2316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2020.07.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栃本 昌孝, 三枝 信
2. 発表標題 子宮癌肉腫のS100A4/非筋細胞ミオシンII系による肉腫成分誘導機構の解明
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蛭田愛、小栗康子、横井愛香、三枝 信
2. 発表標題 卵巣漿液癌の進展過程におけるS100A4/Myosin9系の果たす役割
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------