

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11303

研究課題名(和文) 子宮体がんにおける新規アディポカインFABP4を介したがん微小環境制御機構の解明

研究課題名(英文) Research for cancer microenvironment via FABP4 in endometrial cancer

研究代表者

佐々木 浩 (Sasaki, Hiroshi)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：80432491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：子宮体癌において脂肪細胞やマクロファージから分泌される脂肪酸結合タンパク4 (FABP4) がアディポカインとしてのがん微小環境を調節している可能性があり、そのメカニズムを解明することを目的とした。

子宮体がん細胞株を用い、FABP4が外因性に子宮体がん細胞内へ移行することを確認し、さらに子宮体癌症例196例を検討したところ、肥満が脈管侵襲及びリンパ節転移の有無との関連を認めた。また内臓脂肪/皮下脂肪比が高いとG3・類内膜癌以外の組織型を多く認めた。本研究によって子宮体がんの微小環境制御に内臓脂肪細胞や皮下脂肪が関連していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メタボリック症候群における子宮体がん発症のメカニズムは未知な部分が多い。そこで我々はメタボリック症候群の発症に関連している新規アディポカインであるFABP4に着目し、FABP4が子宮体がん細胞内に存在し、FABP4が高い内臓脂肪が多い患者ではより悪性度の高いがん組織型であることがわかった。また内臓脂肪だけでなく皮下脂肪にもがん発症に関連することが示唆された。今後さらにこのメカニズムを解明することにより、メタボリック症候群による子宮体がん発症予防につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to determine whether Fatty acid-binding protein (FABP4) secreted from adipocytes or a macrophage in endometrial cancer maintained the tumor micro-environment.

We first confirmed the expression of FABP4 in endometrial cancer cell, and FABP4 transferred into cytoplasm exogenously. we confirmed relation obesity to invasion and lymph node metastasis. Furthermore, We measured in computed tomography and visceral fat / subcutaneous fat ratio before cancer therapy to investigate the relation histological type or prognosis to fat. We confirmed the patient with high ratio of fat/subcutaneous fat ratio was endometrial cancer of G3, serous, clear cell carcinoma. It was suggested to the cancer micro-environment of endometrial cancer may relate with visceral fat cell and subcutaneous fat.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：癌関連繊維芽細胞 子宮体がん 肥満

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮体がんにおける我が国の罹患率は 1975 年の時点で 1.8 人 (10 万対) であったのが 2012 年の時点で 20.8 人 (10 万対) と急激な増加傾向にある。その原因の一つとして生活習慣の変化によるメタボリック症候群の増加の関与が考えられている。メタボリック症候群の病態は内臓脂肪蓄積とそれに伴うインスリン抵抗性が基盤とされる。その分子メカニズムの一つとして脂肪細胞やマクロファージから分泌される脂肪酸結合タンパク 4 (fatty acid-binding protein: FABP4) が細胞内脂質代謝に深く関わっていることが知られている。FABP4 は膵臓のランゲルハンス島において IL-1, TNF を活性化させインスリン感受性を低下させ、肝臓においては Caspase-1 や IL-1 ファミリーのサイトカインを活性化させることによりインスリン抵抗性を上昇させ糖尿病が発症するとされている。さらに FABP4 は AGE(advanced glycation end products)形成を促進し細胞表面受容体である RAGE と結合することにより、血管内膜アテローム形成を促進し動脈硬化を発症させる。このように FABP4 はメタボリック症候群において重要な役割を果たしている。近年、FABP4 がメタボリック症候群への関与だけでなく脂肪細胞由来の生理活性物質 (アディポカイン) として働き、膀胱癌、前立腺癌、肺癌および乳癌の生命予後に関連していることが報告されている。しかしそのメカニズムに関しては明らかではない。

最近、がんの浸潤・転移には、がん細胞を取り巻く微小環境が重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。その調節因子としてのマクロファージは線維芽細胞や血管内皮細胞などとともに、がん微小環境を形成し腫瘍随伴マクロファージ (Tumor-associated macrophage: TAM) とよばれ、乳がん、食道がん、肝細胞がん、悪性リンパ腫などの多くのヒトの腫瘍においてがん細胞の増殖を促進する作用があることがわかっている。マクロファージは、活性化の様式から大別して M1 型と M2 型に分けられ、M1 型マクロファージに比べて M2 型マクロファージは IL-10, TGF- β , Prostaglandin E2 などの抗炎症性因子の産生や制御性 T 細胞の浸潤を促すことで抗腫瘍免疫を抑制する。また VEGF, IL-8, HGF などの血管新生因子の産生によって新生血管を誘導することで、がん細胞の増殖における微小環境を制御していることが知られている。この M2 型マクロファージの性格を有しているものが腫瘍随伴マクロファージ (TAM) と呼ばれている。我々は以前より子宮体がんにおける上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) 現象について検討し、子宮体がん患者 (354 例) の組織マイクロアレイ標本作製した上で、がんの浸潤における EMT 関連蛋白である Snail, Slug, E-cadherin の発現を免疫染色にて検討し、EMT 関連蛋白の発現が子宮体がんの予後に関連することを報告した。近年この EMT 現象の促進において TAM が関連しているとの報告があり、さらに TAM の分化・誘導にメタボリック症候群関連蛋白である FABP4 が関与していることが報告された。また、がん微小環境において重要なもう一つの因子として組織の間質に存在するがん関連線維芽細胞 (CAFs) がある。CAFs は炎症性サイトカインである IL-6 を介して細胞外マトリックス (Extracellular matrix: ECM) のリモデリングを促進し浸潤能が亢進するとされている。この IL-6 の発現は FABP4 により上昇することが知られていることから、FABP4 が CAFs を介した ECM のリモデリングを制御している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

子宮体がんにおいて FABP4 がアディポカインとしてのがん微小環境を調節している可能性があり、そのメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) FABP4 の発現と臨床的背景および組織学的変化について検討

子宮体がん患者血清および組織を用いて FABP4 の発現およびメタボリック症候群（糖尿病、脂質異常症、高血圧）BMI などの臨床的背景との関連および予後に関して比較検討：倫理委員会の承認のもと患者の同意を得た上で子宮体がん患者血清を採取し ELISA 法にて FABP4 の発現量を測定した。FABP4 の発現量とメタボリック症候群、BMI などの臨床的背景との関連について比較検討した。次に子宮体がん組織における FABP の発現を real-time PCR 法にて検定し組織中における FABP4 の発現と臨床的背景を検討した。同時に血清中の FABP4 の発現と組織中の FABP4 の発現に相関があるか検討した。

組織マイクロアレイを用いて FABP4 の発現および上皮間葉系マーカーの発現について検討：我々が作製した子宮体がん 354 例の組織マイクロアレイ標本を用い、FABP4 抗体を用いて免疫染色を行い、その発現において陰性群、弱陽性群、強陽性群に分けて無病生存期間および全生存期間について検討した。次に EMT 関連蛋白（Snail、Slug、E-cadherin）の抗体を用いて免疫染色し FABP4 の組織における局在および EMT 関連蛋白との関連について検討した。

(2) FABP4 による TAM の分化・誘導についての検討

組織マイクロアレイを用いて TAM の発現と予後の関連について検討：組織マイクロアレイ標本を用い、CD14、80、163、206 抗体にて免疫染色を行い、M1 型マクロファージ（CD14+CD80+CD163- CD206+）および M2 型マクロファージ（CD14+ CD80- CD163+ CD206+）の分布及び比率について解析し、次にマクロファージの分布・比率が子宮体がんにおける転移、臨床的予後に関連するかについて検討を行っている。さらにマクロファージの分布・比率の違いと臨床的背景（高血圧、糖尿病、脂質異常症）との関連について解析しメタボリック症候群と TAM との関連について検討中である。

FABP4 による M1 型 M2 型マクロファージ分化能についての検討：ヒト末梢血 CD14+単球に recombinant FABP4 を添加し CD80 抗体(M1 型マクロファージ)、CD163 抗体(M2 型マクロファージ)を用いて FACS にて細胞数を測定し FABP4 による M2 型マクロファージへの分化・誘導を検討した。

子宮体癌細胞株および TAM 共培養による細胞増殖効果およびマクロファージの遊走能についての検討：CD14+単球に recombinant FABP4 を添加し 6 日間培養した後にマトリゲルを敷いた dish に再度撒き、下段の子宮体癌細胞株 dish と共培養し 48 時間後に以下の検討を行った。

a) 子宮体癌細胞株における viability を MTS assay および cell count 法にて行った。次にそれぞれの細胞群において蛋白を抽出し EMT 関連蛋白（Snail、Slug、E-cadherin）抗体を用いて Western blotting 法にて解析した。b) 上段および下段の細胞を回収し CD80 抗体、CD163 抗体を用いて FACS にて細胞数を測定し FABP4 による M2 型マクロファージへの分化・誘導を検討した。

(3) FABP4 によるがん関連繊維芽細胞（cancer-associated fibroblasts; CAFs）への影響

外科的に切除した子宮体がん組織を滅菌したはさみにて 2mm 程度に細かく切断し、10cmdish に播種させる。次に組織片が繊維芽細胞に取り囲まれるまで 2 日に 1 回 Medium（-MEM、10%FBS、1%penicilin/streptomycin）を交換。2 週間後に子宮体がん組織を取り除き、細胞を 0.05% Trypsin/EDTA にて剥がし回収し以下の実験に用いた。

FABP4 による IL-6 の発現についての検討：

CAF と子宮体癌細胞株を共培養し FABP4 および PBS(control)を添加し 24 時間後の上清を回収

し ELISA 法にて IL-6 の発現について検討した。

細胞外基質(ECM)を含むゲルを用いて癌の浸潤能の検討:

I 型コラーゲン細胞外基質(ECM)を含むゲルを用いて下層に CAFs、上層に子宮体癌細胞株を培養した。FABP4 および PBS(control)を添加し 24 時間後の supporting mesh を通過した細胞を回収し、細胞数を cell count 法にて解析し浸潤能について検討した。

FABP4 ノックアウトマウスを用いて子宮体癌細胞および CAFs におけるがん浸潤の影響についての検討:

a)FABP4 添加 CAF のマウスでの局在を調べる目的で CAFs-GFP を作成した; 293T cell に GFP 発現レンチウイルスベクターを pGPVector、pE-eco Vector を用いて transfection しウイルスを抽出した。抽出したウイルスを濃縮した上で分離培養した CAFs に感染させた後、抗生剤にて selection し CAFs-GFP 細胞を作成した。b)CAFs-GFP および子宮体癌細胞株を共培養し recombinant FABP4 および PBS (control)を添加後に 5-7 週齢野生型および FABP4 -/-マウスに移植し腫瘍を形成させた。約 4 週間後炭酸ガスにてマウスを安楽死させた後、腫瘍を摘出し重量を測定した。次に解剖し播種の有無について検討した。c) 摘出した腫瘍を 4% paraformaldehyde で固定し、パラフィン切片を作成した。HE 染色および EMT 関連蛋白(Snail、Slug、TWIST、E-cadherin)で免疫染色しがんの浸潤の違いおよび EMT 蛋白の発現の違いについて検討した。さらに CAFs-GFP の局在を調べる目的で細胞骨格(アクチン)および核(DAPI)を蛍光染色しがん浸潤における CAFs-GFP の局在の変化について検討中である。

4 . 研究成果

子宮体がん細胞株を用いて FABP4 の発現および FABP4 添加時の細胞内への移行に関して Western blotting および IHC を用いて検討し、FABP4 が外因性に子宮体がん細胞内へ移行することを確認した。さらに過去 4 年間治療した子宮体癌症例 196 例を対象とし、肥満が子宮体がんの進行期、組織型、リンパ節転移および脈管侵襲の有無に関与するか検討し脈管侵襲及びリンパ節転移の有無との関連を認めた。さらに FABP4 と内臓脂肪の関連を検討する目的で術前 CT にて内臓脂肪と皮下脂肪を測定したところ内臓脂肪/皮下脂肪比が高いと G3・類内膜癌以外の組織型を多く認めた。本研究によって子宮体がんの微小環境制御に内臓脂肪細胞と皮下脂肪が関連していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Keisuke Ashihara, Yoshito Terai, Tomohito Tanaka, Yoshimichi Tanaka, Satoe Fujiwara, Kazuya Maeda, Satoshi Tunetoh, Hiroshi Sasaki, Masami Hayashi, Masahide Ohmichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Pharmacokinetic Evaluation and Antitumor Potency of Liposomal Nanoparticle Encapsulated Cisplatin Targeted to CD24-positive Cells in Ovarian Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 1872-1880
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.11279.	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 Kazuya Maeda, Hiroshi Sasaki, Shoko Ueda, Shunsuke Miyamoto, Shinichi Terada, Hiromi Konishi, Yuhei Kogata, Keisuke Ashihara, Satoe Fujiwara, Yoshimichi Tanaka, Tomohito Tanaka, Masami Hayashi, Yuko Ito, Yoichi Kondo, Takahiro Ochiya, Masahide Ohmichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Serum Exosomal microRNA-34a as a Potential Biomarker in Epithelial Ovarian Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Ovarian Res.	6. 最初と最後の頁 47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13048-020-00648-1.	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 Kogata Y, Tanaka T, Ono Y, Hayashi M, Terai Y, Ohmichi M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Foretinib (GSK1363089) induces p53-dependent apoptosis in endometrial cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 22769-22784
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25232	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸岡寛、佐々木浩、大道正英
2. 発表標題 内臓脂肪は卵巣癌の生命予後に影響するか
3. 学会等名 第34回日本女性医学学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸岡寛、佐々木浩、大道正英
2. 発表標題 内臓脂肪および皮下脂肪が腹腔鏡下子宮体癌手術に及ぼす影響に関する検討
3. 学会等名 第59回日本産婦人科内視鏡学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸岡寛、佐々木浩、大道正英
2. 発表標題 内臓脂肪と子宮体癌の臨床病理学的特徴の関係
3. 学会等名 第33回日本女性医学学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木浩、丸岡寛、大道正英
2. 発表標題 子宮内膜症合併卵巣がんと脂質異常症は関連しているか？
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木浩、丸岡寛、大道正英
2. 発表標題 生活習慣病からみた子宮体がんの臨床病理学的特徴
3. 学会等名 第69回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2017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
研究分担者	林 正美 (Hayahi Masami) (00551748)	大阪医科大学・医学部・准教授 (34401)	
研究分担者	大道 正英 (Ohmichi Masahide) (10283764)	大阪医科大学・医学部・教授 (34401)	
研究分担者	田中 良道 (Tanaka Yoshimichi) (10625502)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	恒遠 啓示 (Tsunetoh Satoshi) (70388255)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	田辺 晃子 (Tanabe Aiko) (70454543)	大阪医科大学・医学部・非常勤講師 (34401)	
研究分担者	俞 史夏 (Yu Saha) (80625674)	大阪医科大学・医学部・非常勤医師 (34401)	
研究分担者	寺井 義人 (Terai Yoshito) (90278531)	大阪医科大学・医学部・非常勤講師 (34401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	田中 智人 (Tanaka Tomohito) (90411363)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	
研究 分 担 者	藤原 聡枝 (Fujiwara Satoe) (90707960)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	