

令和 2 年 9 月 14 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11307

研究課題名(和文) 子宮頸がんの微小環境解析 -がん微小環境細胞の制御をめざして-

研究課題名(英文) Elucidation of cervical cancer microenvironment - aiming to suppress cancer cell behavior affected by stromal cells

研究代表者

村田 卓也 (Takuya, Murata)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20714207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸がん関連線維芽細胞において発現上昇している膜タンパク質TM4SF1と膜タンパク質Xの両方の発現を最も抑制する転写因子阻害分子としてChb-PIP-Tを同定した。ヌードマウスの皮下に子宮頸がんの培養細胞ME180株と子宮頸がん関連線維芽細胞の初代培養細胞CCF-1株を共移植し、リンパ節転移を高率の起こす系において、Chb-PIP-T(100 µg)投与群と非投与群を比較解析した。非投与群では11匹中5匹で縦郭リンパ節や腋窩リンパ節に転移を起こしたが、Chb-PIP-T投与群では、9匹中すべてのマウスで転移は観察されなかった(p=0.020)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移抑制剤が開発されれば、子宮頸がんの予後が著しく改善され、子宮頸がんの進行や再発に苦しむ患者さんにとって大きな福音となる。

研究成果の概要(英文)：Trans membrane protein TM4SF1 and protein X was upregulated in cervical cancer-associated fibroblast (CAF) that had ability to induce cervical cancer cell line ME180 metastasize to the lymph node in nude mouse xenograft model. We screened Chb-PIP library and Chb-PIP-T strongly inhibited transcription of both TM4SF1 and protein X genes. We found that Chb-PIP-T inhibited the lymph node metastasis of ME180 in nude mouse co-transplantation xenograft model with statistical significance (p=0.020).

研究分野：婦人科がん

キーワード：転移 がん関連線維芽細胞 子宮頸がん

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん関連線維芽細胞はがんの増殖や転移に関与することが報告されていた。しかし、詳細な分子メカニズムは不明であった。我々は、子宮頸がんのがん関連線維芽細胞の初代培養細胞 CCF-1 株を樹立していた。この CCF-1 と子宮頸がん培養細胞 ME180 株をヌードマウスの皮下に共移植すると、ME180 細胞は鼠経リンパ節、腋窩リンパ節、縦郭リンパ節に転移することが明らかとなっていた。

2. 研究の目的

がん関連線維芽細胞ががん細胞のリンパ節転移を誘発するメカニズムを解明し、リンパ節転移を阻止する薬剤を開発することにより、子宮頸がん患者のがんの進行を阻止し、予後を改善することを目的とする。

3. 研究の方法

GFP 標識した子宮頸がん培養細胞 ME180 株と子宮頸がんのがん関連線維芽細胞の初代培養細胞をヌードマウスの皮下に共移植し、10 週間後の全身への転移を GFP の緑色蛍光を観察することにより解析した。緑色蛍光を発した組織はホルマリン固定の後、パラフィン包埋切片を作製し、HE 染色を行ない、顕微鏡で観察した。4 種類の線維芽細胞 (3 種類の子宮頸がん関連線維芽細胞および 1 種類の正常子宮頸部の線維芽細胞) の 1 細胞遺伝子発現解析を行なった。その他、全ゲノム配列解析、DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析、網羅的 microRNA 発現解析、Exome 解析を行なった。

4. 研究成果

CCF-1、NCAF-1 および CII (それぞれ別の患者さんから分離した子宮頸がん関連線維芽細胞)、NOF-1 (正常子宮頸部から分離した線維芽細胞) の 4 種類の線維芽細胞について 1 細胞遺伝子発現解析を行い比較検討した。その結果、転移誘導能を持つ CCF-1 のみが他の線維芽細胞と異なる遺伝子発現パターンを示した。そしてこの CCF-1 を特徴づける遺伝子として 86 遺伝子が抽出された。

がん関連線維芽細胞には、突然変異がないことが一般的な共通認識となっている。転移誘導能を有する CCF-1 についても突然変異がないかどうかを明らかにするため、CCF-1、CII、NOF-1 とは別の患者の正常子宮頸部から分離した線維芽細胞の初代培養細胞 F について全ゲノム配列解析を行い比較解析した。その結果、いずれの線維芽細胞においても P53 遺伝子に変異は認められず、それ以外にも特異的な突然変異は見つからなかった。こうしたことから、がん関連線維芽細胞は、がん細胞やその微小環境内でエピジェネティックな変化を起こすか、もしくは別の場所でエピジェネティックな

変化を起し、その細胞ががん微小環境に移動してがん細胞の悪性性質の発現に関与していることが示唆された。

子宮頸がん細胞を転移させる能力を持つ CCF-1 と、CCF-1 を不死化したことにより転移させる能力を喪失した CCF-TT の両細胞について網羅的遺伝子発現解析を行ない比較解析した。その結果、10 倍以上の発現上昇を認めた 558 遺伝子が見いだされた。さらに不死化による遺伝子変動の影響を相殺し、186 遺伝子を抽出した。このうち膜タンパクに注目し、最も上昇していた 膜タンパク遺伝子 X と Y について、子宮頸がん 5 症例の免疫組織染色を行った。その結果、X はがん部と間質の線維芽細胞が染色された。また、Y は、間質の線維芽細胞の一部が染色された。この両者を阻害する薬剤として DNA 塩基配列特異的結合化合物であるブチル化ピロールイミダゾールポリアミド化合物(Chb-PIP)と中和抗体薬の開発を計画した。Chb-PIP のライブラリーについてリアルタイム PCR 法により遺伝子発現量を定量的に解析した。その結果、X と Y の遺伝子発現を共に強く抑制する Chb-PIP を発見した。これをヌードマウスの皮下共移植系で解析した結果、Chb-PIP 非投与群のマウス 3 例では、2 例でリンパ節転移が認められたのに対して、投与群では、マウス 3 例のすべてで転移が認められなかった。さらに Chb-PIP-XY 投与群・非投与群にそれぞれ 11 匹・10 匹を割り当て解析した結果、Chb-PIP-XY 投与群では、解析できた 6 匹すべてでリンパ節転移を認めなかったのに対して、Chb-PIP-XY 非投与群では、解析できた 8 匹中 3 匹でリンパ節転移を認めた。リンパ節転移場所は、縦郭リンパ節、腸間膜リンパ節、腋窩リンパ節であった。血行性の転移は解剖したすべてのマウスで認めなかった。以前の結果と合わせて統計学的解析を行なった結果、Chb-PIP-XY 投与により有意にリンパ節転移が抑制された ($p=0.020$)。現在、Chb-PIP-XY の特許化に向けて手続き中である。

以上。

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 3件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Murata Takuya, Eisuke Mekada, Hoffman Robert M.	4. 巻 16
2. 論文標題 Reconstitution of a metastatic-resistant tumor microenvironment with cancer-associated fibroblasts enables metastasis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Cycle	6. 最初と最後の頁 533-535
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15384101.2017.1281486	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 該当する

1. 著者名 Murakami T, Murata T, Kawaguchi K, Kiyuna T, Igarashi K, Hwang HK, Hiroshima Y, Hozumi C, Komatsu S, Kikuchi T, Lwin T M, DeLong JC, Miyake K, Zhang Y, Tanaka K, Bouvet M, Endo I, Hoffman RM.	4. 巻 37
2. 論文標題 Cervical Cancer Patient-Derived Orthotopic Xenograft (PDOX) Is Sensitive to Cisplatin and Resistant to Nab-paclitaxel.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 61-65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873	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 該当する

1. 著者名 Miyake Kentaro, Murata Takuya, Murakami Takashi, Zhao Ming, Kiyuna Tasuku, Kawaguchi Kei, Igarashi Kentaro, Miyake Masuyo, Lwin Thinzar M., Hozumi Chihiro, Komatsu Shin, Kikuchi Takashi, Bouvet Michael, Shimoya Koichiro, Singh Shree Ram, Endo Itaru, Hoffman Robert M.	4. 巻 299
2. 論文標題 Tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R overcomes nab-paclitaxel resistance in a cervical cancer PDOX mouse model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Gynecology and Obstetrics	6. 最初と最後の頁 63-69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00404-019-05147-3	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村田卓也
2. 発表標題 子宮頸癌関連線維芽細胞の癌増殖促進遺伝子解析
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～2018年

1. 発表者名 村田卓也
2. 発表標題 子宮頸癌の微小環境における癌関連線維芽細胞の作用
3. 学会等名 第38回癌免疫研究会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 村田卓也
2. 発表標題 ヌードマウス皮下移植系において癌関連線維芽細胞は子宮頸癌細胞のリンパ節転移を促進する
3. 学会等名 第59回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 村田卓也
2. 発表標題 子宮頸癌関連線維芽細胞の網羅的遺伝子発現解析 癌細胞との共培養によりみえてきたもの
3. 学会等名 第32回日本生殖免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 村田卓也
2. 発表標題 Establishment of a patient-derived orthotopic Xenograft model of HER-2-positive cervical cancer expressing the clinical metastatic pattern.
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 村田卓也
2. 発表標題 The significance of Patient-Derived Orthotopic Xenograft (PDOX) mouse model in gynecological cancers.
3. 学会等名 1st International Symposium on Leading Technologies for Personalized Precision Medicine for Cancer. (招待講演)
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hoffman RM., Hiroshima Y., Murakami T. and Murata T.	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 296
3. 書名 Cervical Cancer PDOX Models. Patient-Derived Mouse Models of Cancer.	

〔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	中村 隆文 (Nakamura Takafumi) (20303969)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	
研究分担者	下屋 浩一郎 (Shimoya Koichiro) (40291950)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	