

平成21年 4月 15日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591820

研究課題名（和文） ケモカイン遺伝子の RNA 干渉による子宮癌リンパ節転移のリアルタイム解析

研究課題名（英文） Real time analysis of chemokine effect to lymph node metastasis in uterine cancer by utilizing RNA interference

研究代表者

新倉 仁 (NIIKURA HITOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80261634

研究成果の概要：

ケモカインの1つであるミッドカイン（MK）は mRNA およびタンパク質量共に正常子宮内膜組織と比較して子宮体癌組織で有意に高発現していることを明らかにした。また子宮体癌患者と血清中 MK 濃度は婦人科良性疾患患者のそれと比べ有意に高く、予後因子のマーカーとしての有用性が示唆された。さらに MK 強制発現細胞株を作製しマウスに移植することで、MK が癌増殖促進的に働く傾向を示した。またマウス移植実験において RNAi 試験を施行するため MK shRNA を発現するウイルスを作製し、現在リアルタイム in vivo イメージングシステムを用いた MK の腫瘍への影響を追跡調査することを計画している。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

研究分野：産婦人科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮体癌、ミッドカイン、リンパ節転移

## 1. 研究開始当初の背景

リンパ節転移は極めて重要な予後因子であり、リンパ節転移を制御することは臨床腫瘍学の最重要課題の1つである。特にリンパ節への微小転移は術前の画像診断や術中の触診では診断不可能であるためその早期検出法がトピックスとなっている。われわれは婦人科癌、特に子宮頸癌と子宮体癌を対象としてセンチネルリンパ節の同定法を世界に先駆けて確立し臨床応用に成功している

(Niikura, Gynecol Oncol 94,528-32, 2004; Niikura, Gynecol Oncol 92,669-74, 2004)。これにより我々の研究の指向性は、リンパ節転移の早期診断から、発見した微小転移の治療へと向かっている。

ケモカインはリンパ球のホーミング現象や炎症時の白血球の浸潤に密接に関与することが知られている。我々は以前、子宮体癌細胞と正常子宮内膜細胞の RNA を抽出し、網羅的なマイクロアレイ遺伝子発現解析を

行った。この時、ケモカインの1つであるミッドカイン (MK) が子宮体癌細胞で正常子宮内膜細胞と比較して有意に高発現していることを発見した。MK はヘパリン結合性の分泌タンパク質で、Wilms'腫瘍、肺癌、乳癌、神経芽細胞腫、膀胱癌、卵巣癌、膠芽腫、大腸癌、前立腺癌、食道癌など他の多くの癌組織においても高発現していることが知られている。また、その機能は血管新生作用、抗アポトーシス作用、抗がん剤抵抗性の獲得への寄与など多岐に渡って腫瘍細胞増殖促進的作用を示すことが報告されている。しかしながら、子宮体癌における発現やその機能について検討した報告は無い。

## 2. 研究の目的

(1) そこで我々はまず、MKの臨床学的意義を検討することを目的とした。

(2) (1) の研究からMKが*in vivo*において子宮癌のリンパ節転移および予後に関連する因子であることを見出した。そこで、MKの子宮体癌細胞での機能解析を第二の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 検体

PCR に用いた子宮体癌検体 20 例 (高分化型類内膜腺癌 10 例、低分化型類内膜腺癌 10 例) および免疫組織化学染色法に用いた子宮体癌検体 85 例 (高分化型類内膜腺癌 37 例、中分化型類内膜腺癌 25 例、低分化型類内膜腺癌 23 例; I 期 55 例、II 期 16 例、III 期 11 例、IV 期 3 例) は 1996 年 4 月から 2004 年 3 月までに東北大学病院婦人科で子宮体癌と診断され子宮全摘術を施行した例を用いた。正常内膜は良性婦人科疾患のため子宮全摘術を施行した例を用いた。免疫染色に用いた症例の観察期間の中間値は 60 ヶ月 (2~140 ヶ月) で、2004 年 12 月に観察を打ち切った。

血清サンプル 120 例 (高分化型類内膜腺癌 66 例、中分化型類内膜腺癌 16 例、低分化型類内膜腺癌 12 例、類内膜腺癌以外の組織型 26 例; I 期 80 例、II 期 11 例、III 期 17 例、IV 期 12 例) は、2003 年 4 月から 2004 年 3 月までの間に東北大学病院婦人科で子宮体癌または良性婦人科疾患と診断された患者の、手術施行前の血清を用いた。いずれも術前治療は行われなかった。なお、本実験で用いられた組織検体および血清は、東北大学病院においてインフォームドコンセント後、文書にて同意が得られたもののみを使用した。なお、本研究を施行するに当たり、研究開始前に機関の倫理委員会の承認を得た。

### Real-time PCR

プライマーは下記のとおりである。ミッド

カイン; 5'-CCA AGA CCA AAG CAA AGG-3' と 5'-GGC AGG GCA TGA TTG ATT-3'、RPL13A; 5'-CCT GGA GGA GAA GAG GAA AGA GA-3' と 5'-TTG AGG ACC TCT GTG TAT TTG TCA A-3'。

### MKの免疫組織化学染色

一次抗体としてチキン抗ミッドカイン抗体 (名古屋大学生化学教室門松先生より分与) を用いた。染色強度は全く染まらない場合を 0 点、5%未満を 1 点、5~25%を 2 点、25~50%を 3 点、50%以上を 4 点とした。

### 血清MK濃度の測定

MK 濃度は ELISA 法にて測定した。ELISA 法は、池松らの方法に従った。

## (2)

### 細胞と細胞培養

HEC1-A および RL95-2 は 10% FCS (Tissue Culture Biologicals, Turala, CA, USA) および 1%ペニシリン/ストレプトマイシン (BIBCO, MD, USA) 含有 RPMI 1640 培地 (GIBCO, NY, USA) で、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### MK強制発現Hec1-A細胞の作出

pRC/CMV-MK を HEC1-A 細胞へ MIRUS TransIT-LT1 (MIRUS, WI, USA) を用いて導入し、MK が安定導入された各クローン細胞株を Hec1-A-MK (MK1 および MK2) と名付けた (図 1)。また、この対象株として pRC/CMV を安定導入した HEC1-A 細胞を作出し、これを Hec1-A-C (C1 および C2) と名付けた (図 1)。

### ヒトMKのRNAi発現ベクターの構築とRNAi発現レンチウイルスの作出

RL95-2 の内因性のMKを安定的にノックダウンさせるためにレンチウイルスベクターを用いたMK のRNAiベクターを構築した。細胞増殖試験

足場依存性細胞増殖試験は Cell Counting Kit-8 (DOJINDO, Kumamoto, Japan) を用いて行った。足場非依存性細胞増殖はまず低層として 0.8%低融点アガロース、10% FCS と 1%ペニシリン/ストレプトマイシン含有 RPMI1640 培地を 24 穴プレートの各穴に 300  $\mu$ l 添加、ゲル化したのを確認した後その上層に 0.4%低融点アガロース、10% FCS と 1%ペニシリン/ストレプトマイシン含有 RPMI1640 培地、300  $\mu$ l 中  $1 \times 10^4$  の細胞を懸濁したものを、各穴 300  $\mu$ l 添加し、3 週間後顕微鏡下で細胞塊の数を計測した。

### 細胞遊走能および浸潤能試験

細胞遊走能は膜のポアサイズが 0.8  $\mu$ m の 24 穴用インサートセル (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) を用いて行った。

浸潤能解析はポアサイズ 0.8  $\mu$ m の膜上面がコラーゲンコートされた 24 穴用インサートセル (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) を

用いて行った。

#### 免疫不全ヌードマウスへの細胞移植

MK1、MK2、C1、C2の各細胞を、それぞれ2匹のヌードマウス (BALB/c-nu/nu) の背側の両側後肢付け根皮下に、細胞数  $5 \times 10^6$  を計4箇所移植した。MK1 および MK2 を移植した4箇所の長径の和と、C1 および C2 の4箇所の長径の和を比較した。

#### 4. 研究成果

##### (1)

れわれは大規模マイクロアレイにより (アジレントテクノロジー社、Human 1A version 2)、正常子宮内膜と比べ子宮内膜類内膜腺癌で1.5倍以上高く発現している遺伝子を24個見出し一つにMKを認めた。そこでマイクロアレイの結果を確認するため、正常子宮内膜の10例、子宮体癌20例 (高分化型類内膜腺癌10例、低分化型類内膜腺癌10例) におけるMK mRNAの発現量を、リアルタイムPCR法を用いて検討した。その結果、MK mRNAの発現量はマイクロアレイの結果と同様に子宮体癌では高分化型、低分化型ともに正常内膜より有意 ( $P < 0.001$ ) に高いことが判明した (図1)。また高分化型と低分化型との間には、発現量に有意差は認めなかった。

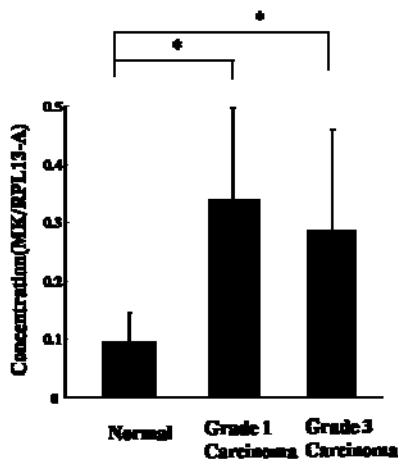


図1. 正常子宮内膜および子宮体癌におけるMK mRNAの発現

タンパク質レベルでMK発現量が正常内膜と比較し子宮体癌で増加しているかを確認するため、免疫組織化学染色法によるMKタンパク質の染色を行った。免疫染色によるMKタンパク質発現を表1に示すが、全例に

おいてMKは細胞質で強く発現しており、核での発現はわずかであった。また内膜間質におけるMKタンパク質の発現は、正常内膜および癌、共にわずかであった。正常内膜増殖期および分泌期では、両者ともMKタンパク質の発現は機能層よりも基底層で有意に強く発現しており ( $P < 0.001$ ) (表1、図2c-f)、機能層と内膜間質とでは有意差は認めなかった。基底層におけるMKタンパク質の発現は、増殖期よりも分泌期で高い傾向を示したが有意差は認めなかった ( $P = 0.09$ )。

子宮体癌症例ではMKタンパク質の発現は表層部では弱く、浸潤境界部で強いことが判明した (表1、図2g-2k)。いずれの組織分化度においても、MKタンパク質の発現は表層部と比べ浸潤境界部において有意に高かった ( $P < 0.001$ )。

癌の浸潤境界部と正常内膜の基底層とを比較した場合、浸潤境界部におけるMKタンパク質の発現は正常内膜基底層よりも有意に高いことが判明した ( $P < 0.001$ )。

癌におけるMKタンパク質発現量と臨床病理学的因子 (分化度、進行期、筋層浸潤の深さ、脈管侵襲の有無、リンパ節転移の有無、予後) との間には有意な相関関係は認められ

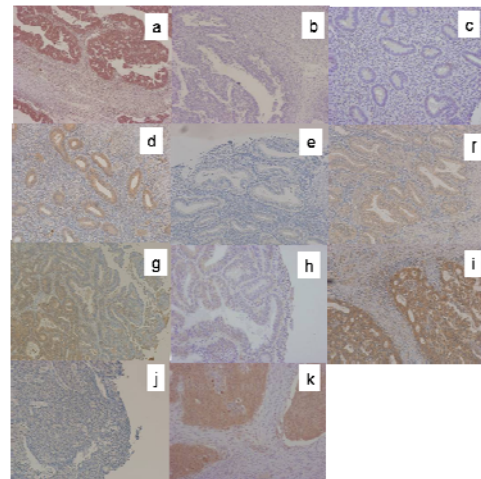


図2. 正常子宮内膜および子宮体癌におけるMKタンパク質の発現

なかった。

さらに我々は子宮体癌患者と良性婦人科疾患患者における血清中MK濃度をELISA法によって比較検討した。子宮体癌患者の血清MK濃度の値は  $86 \pm 152$  pg/mL であり、婦人科良性疾患患者の血清MK濃度の値  $39 \pm 61$  pg/mL と比べ、有意に血清中MK濃度が高いことが判明した ( $P = 0.001$ 、図3)。

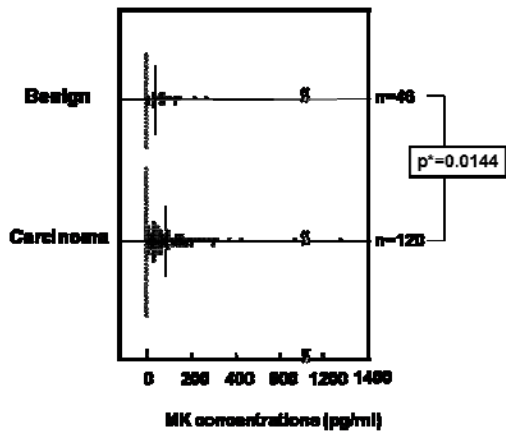


図3. 婦人科良性疾患患者と子宮体癌患者の血清中MK濃度

さらに、表 2 に示すように子宮体癌の血清 MK 濃度と進行期、リンパ節転移の有無、予後などの臨床病理学的因子との関連を検討した。その結果、リンパ節転移のある群はリンパ節転移の無い群と比べ、有意に血清 MK 濃度が高いことが判明した ( $P=0.008$ )。また予後不良群 (再発および死亡群) の血清 MK 濃度は予後良好群 (再発のない生存群) と比べ有意に高いことが判明した ( $P=0.009$ )。

表2. 子宮体癌患者における臨床病理学的因子別の血清MK濃度

Clinicopathological factors	N (%)	MK concentrations (Mean $\pm$ SD)	P-value	
Age	50-	25 (21)	104 $\pm$ 253	0.111
	50<	95 (79)	81 $\pm$ 113	
Histology	G1	46 (55)	82 $\pm$ 169	0.453
	G2	16 (13)	64 $\pm$ 97	
	G3	12 (10)	144 $\pm$ 112	
	Others	26 (22)	76 $\pm$ 143	
Stage	I-II	91 (76)	71 $\pm$ 157	0.854
	III-IV	29 (24)	133 $\pm$ 139	
Myometrial invasion	None	19 (16)	46 $\pm$ 76	0.672
	< 1/2	38 (45)	79 $\pm$ 178	
	$\geq$ 1/2	48 (33)	188 $\pm$ 130	
	Unknown	5 (4)	183 $\pm$ 201	
Vascular invasion	Negative	83 (69)	75 $\pm$ 153	0.72
	Positive	35 (29)	98 $\pm$ 139	
	Unknown	2 (2)	400 $\pm$ 33	
Lymph node metastasis	Negative	103 (86)	73 $\pm$ 142	0.688
	Positive	5 (4)	233 $\pm$ 246	
	Unknown	12 (10)	131 $\pm$ 161	
Prognosis	Non-recurrence	102 (85)	71 $\pm$ 142	0.669
	Recurrence or death	18 (15)	172 $\pm$ 184	

\*P-value, Mann-Whitney test

(2)



図1. ウェスタンブロッティングによるHec1-A-MK培養上清中MKの検出

我々は *in vitro* における MK の機能解析を試みた。非 MK 発現ヒト子宮体癌細胞株

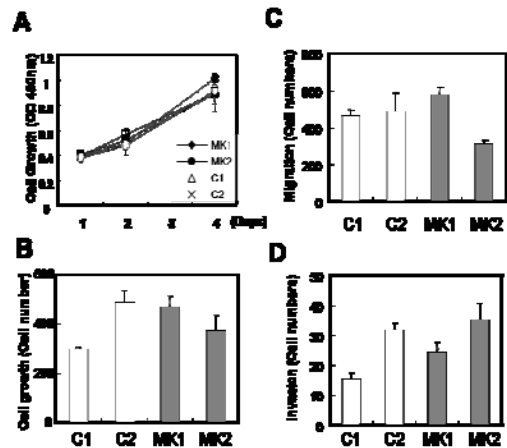


図2. *In vitro* におけるMK強制発現細胞株の機能解析

- A: 足場依存性増殖能
- B: 足場非依存性増殖能
- C: 遊走能
- D: 浸潤能

Hec1-A にヒト子宮体癌細胞株 RL95-2 由来の MK 遺伝子を導入した MK 強制発現 Hec1-A (Hec1-A-MK) を樹立した。MK は分泌タンパク質であり、Hec1-A-MK において培養液中に MK が分泌されることも確認した (図 1)。Hec1-A-MK を用いて、足場依存性増殖能、足場非依存性増殖能、遊走能、浸潤能試験を行った。しかしながら、いずれにおいても非 MK 発現細胞と MK 強制細胞の間に有意差を認めなかった (図 2)。

一方、Hec1-A-MK を BALB-nu/nu マウス皮下に移植したところ、非 MK 発現 Hec1-A と比較して増殖が促進される傾向が示され、*in vivo* において MK が腫瘍増殖促進的に働くことが示唆された (図 3)。

また MK の RNAi 発現ウイルスベクターを作製し、RL95-2 に導入することで、MK がウイルスベクター量依存的に減少することを確認した (図 4)。現在、MK 強制発現用プラスミドおよび MK RNA 干渉用レトロウイルスベクターにルシフェラーゼ遺伝子を搭載、リアルタイム *in vivo* イメージングシステムを用いて MK の腫瘍への影響を追跡調査しようとしている。

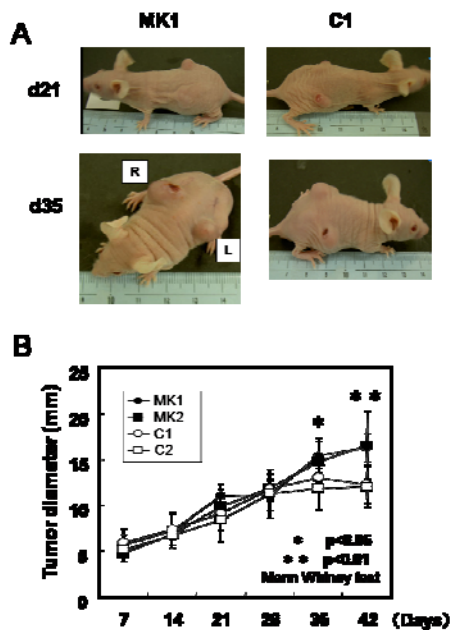


図3. *In vivo*におけるMK強制発現細胞株の機能解析  
A:MK強制発現株移植後、21日目、35日目の写真  
B:移植後の腫瘍長径の推移

MK はシスプラチンによる腎炎等への関連も報告されており、マウス移植後はリアルタイム *in vivo* イメージングシステムの利点を活かし薬剤投与時におけるMKの腫瘍への影響も合わせて観察できることから、本研究の成果はリンパ節転移を制御する遺伝子治療に直接的に結びつくトランスレーショナルリ

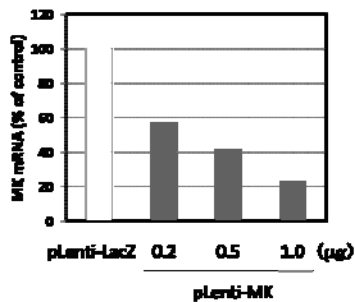


図4. Real-time PCRによるMK mRNA発現レシテウイルスベクター干渉効率の確認

サーチとして発展する可能性が高いと考える。

#### 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 27 件)

①Tanabe K, Niikura H, Ito K, et al. Midkine and its clinical significance in endometrial carcinoma. *Cancer Sci.* 2008, 99:1125-1130. 査読有

②Tanabe K, Niikura H, Yaegashi N, et al. Expression of retinoic acid receptors in human

endometrial carcinoma. *Cancer Sci.* 2008, 99:267-271. 査読有

③Kakuta Y, Niikura H, et al. Case-control study of green tea consumption and the risk of endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Cancer Causes Control.* 2008. On line 査読有

④Fujita M, Ito K, Niikura H, et al. Smoking, earlier menarche and low parity as independent risk factors for gynecologic cancers in Japanese: a case-control study. *Tohoku J Exp Med.* 2008, 216:297-307. 査読有

⑤Takenaka A, Niikura H, et al. Understanding Anatomy of "Hilus" of Detrusor Nerves to Avoid Bladder Dysfunction After Pelvic Surgery: Demonstration Using Fetal and Adult Cadavers. *Urology.* 2008. On line 査読有

⑥Kato M, Niikura H, et al. Histotopography of the female cavernous nerve: a study using donated fetuses and adult cadavers. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2008 19:1687-1695. 査読有

⑦Tokunaga H, Ito K, Niikura H, et al. Clinicopathological significance of circadian rhythm-related gene expression levels in patients with epithelial ovarian cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008, 87:1060-1070. 査読有

⑧Niikura H, et al. Fetal development of the human gubernaculum with special reference to the fasciae and muscles around it. *Clin Anat.* 2008, 21:547-557. 査読有

⑨Koizumi T, Niikura H, Yaegashi N, et al. Case-control study of coffee consumption and the risk of endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Eur J Cancer Prev.* 2008 17:358-363. 査読有

⑩Matsumoto M, Niikura H, et al. Estrogen signaling ability in human endometrial cancer through the cancer-stromal interaction. *Endocr Relat Cancer.* 2008, 15:451-463. 査読有

⑪Yoshinaga K, Niikura H, Yaegashi N, et al. Expression of vasohibin as a novel endothelium-derived angiogenesis inhibitor in endometrial cancer. *Cancer Sci.* 2008, 99:914-919. 査読有

⑫Katahira A, Niikura H, et al. Vesicouterine ligament contains abundant autonomic nerve ganglion cells: the distribution in histology concerning nerve-sparing radical hysterectomy. *Int J Gynecol Cancer.* 2008, 18:193-198. 査読有

⑬Niikura H, et al. Surgical anatomy of intrapelvic fasciae and vesico-uterine ligament in nerve-sparing radical hysterectomy with fresh cadaver dissections. *Tohoku J Exp Med.* 2007, 212:403-413. 査読有

⑭Yaegashi N, Ito K, Niikura H. Lymphadenectomy for endometrial cancer: is

paraortic lymphadenectomy necessary? Int J Clin Oncol. 2007, 12:176-180. 査読無

⑮Ota K, Niikura H, Yaegashi N, et al. Expression of organic cation transporter SLC22A16 in human epithelial ovarian cancer: a possible role of the adriamycin importer. Int J Gynecol Pathol. 2007, 26:334-340. 査読有

⑯Niikura H, et al. Detection of micrometastases in the sentinel lymph nodes of patients with endometrial cancer. Gynecol Oncol. 2007, 105:683-686. 査読有

⑰Nagase S, Niikura H, et al. Vaginal tumors with histologic and immunocytochemical feature of gastrointestinal stromal tumor: two cases and review of the literature. Int J Gynecol Cancer. 2007, 17:928-933. 査読有

⑱Sakuma M, Niikura H, et al. Promoter methylation status of the Cyclin D2 gene is associated with poor prognosis in human epithelial ovarian cancer. Cancer Sci. 2007, 98:380-386. 査読有

⑲Sato N, Niikura H, Yaegashi N, et al. Expression of organic cation transporter SLC22A16 in human endometria. Int J Gynecol Pathol. 2007, 26:53-60. 査読有

⑳Yoshinaga K, Niikura H, et al. Phase I trial of concurrent chemoradiation with weekly nedaplatin in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Gynecol Oncol. 2007, 104:36-40. 査読有

㉑新倉 仁 婦人科癌治療における放射線療法の意味についての問題点, 癌の臨床, 2007, 53:431-437 査読無

㉒新倉 仁 術中自律神経電気刺激による神経の同定と神経温存の評価, 日本女性骨盤底医学会誌, 2007, 4:60-65 査読無

㉓Akahira J, Niikura H, et al. Prognoses and prognostic factors of carcinosarcoma, endometrial stromal sarcoma and uterine leiomyosarcoma: a comparison with uterine endometrial adenocarcinoma. Oncology. 2006, 71:333-340. 査読有

㉔Chisaka H, Ito K, Niikura H, et al. Clinical manifestations and outcomes of parvovirus B19 infection during pregnancy in Japan. Tohoku J Exp Med. 2006, 209:277-283. 査読有

㉕新倉 仁 子宮体癌のセンチネルリンパ節同定, 産婦人科の実際, 2006, 55:783-788 査読無

㉖新倉 仁 センチネルリンパ節, 産科と婦人科, 2006, 73 : 1112-1119 査読無

㉗新倉 仁 子宮体癌におけるセンチネルリンパ節同定の妥当性, 日本婦人科腫瘍学会雑誌, 2006, 24:105-109 査読無

〔学会発表〕(計 10 件)

①田辺康次郎, 新倉仁, 八重樫伸生ら : 子宮体

癌におけるミッドカインの発現と臨床的意義, 第 60 回日本産婦人科学会, 2008.4.11-15, 横浜市

②新倉 仁 : SNNSの婦人科領域への応用の現状と未来, 第 9 回SNNS研究会, 2007.11.16, 東京

③田辺康次郎, 八重樫伸生ら : 子宮内膜癌におけるミッドカインのマーカーとしての有用性, 第 66 回日本癌学会, 2007.10.3, 東京

④新倉 仁 : 子宮癌でも妊娠を望む人のための最近の治療法, 第 25 回日本受精着床学会, 2007.8.30, 仙台市

⑤新倉 仁 : 膀胱子宮靱帯後層周辺における自律神経の走行と神経節の分布—術中電気刺激の利用と解剖学的検討—, 第 42 回日本婦人科腫瘍学会 (教育シンポジウム), 2007.6.29, 東京

⑥新倉 仁 : センチネルリンパ節生検の子宮体癌治療への応用—現状と展望—, 第 3 回子宮体癌治療に関するシンポジウム, 2007.3.10, 東京

⑦新倉 仁 : 婦人科癌治療における放射線療法の意義についての問題点, 第 19 回日本放射線腫瘍学会 (シンポジウム), 2006.11.24, 仙台市

⑧新倉 仁 : 子宮体癌におけるセンチネルリンパ節の同定と微小転移の検討, 第 44 回日本癌治療学会 (ワークショップ), 2006.10.19, 東京

⑨新倉 仁 : 婦人科癌におけるセンチネルリンパ節と微小転移, 第 54 回北日本連合地方部会 (特別講演), 2006.9.1, 盛岡市

⑩新倉 仁 : 術中自律神経刺激による神経の同定と神経温存の評価, 第 8 回日本女性骨盤底医学会 (シンポジウム), 2006.6.24, 横浜市

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

新倉 仁 (NIIKURA HITOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号 : 80261634

### (2)研究分担者

伊藤 潔 (ITO KIYOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号 : 70241594

吉永 浩介 (YOSHINAGA KOSUKE)

東北大学・病院・助教

研究者番号 : 40343058

八重樫 伸生 (YAEGASHI NOBUO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 00241597

### (3)連携研究者

なし