

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16794

研究課題名（和文）子宮体部類内膜癌に対するFoxp4転写因子の増悪化誘導作用の検証とその機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the effect inducing disease progression and mechanism of Foxp4 transcriptional factor on endometrial endometriod carcinoma

研究代表者

小幡 武司（Obata, Takeshi）

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：70748615

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はFoxp4分子の子宮体部類内膜癌の悪性化に対する役割を解明することを目的として、病理組織、細胞株を用いて検討を行った。154例の手術症例に対してFoxp4の免疫染色を施行したところ、リンパ節転移・術後再発症例は全てFoxp4発現上昇が認められた。また、Foxp4をノックダウンさせた子宮内膜癌細胞株では細胞増殖能が有意に低下していることが確認された。さらに、Foxp4をノックダウンおよび過剰発現させた細胞株をマウスの皮下に移植したところ、Foxp4の発現亢進が腫瘍形成を促進していたことが確認された。これらの結果はFoxp4発現誘導が類内膜癌の増悪化に関与することを示唆する結果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は病理検体と臨床情報を詳細に再検討し、子宮体部類内膜癌の浸潤能や転移能の増悪化に対するFoxp4分子の役割に着目して実験を行った。手術検体を用いたFoxp4の免疫組織学的発現の結果そして、細胞実験の結果からはFoxp4の発現誘導が子宮体部類内膜癌の増悪化に関与していることを示唆している。これまで婦人科悪性腫瘍においてFoxp4の検討報告がなく、かつ本研究の成果として新しい子宮体部類内膜癌の増悪化のパラメータの提案や子宮頸部での新しい癌化機構の解明に繋がることが予想され、臨床的にも学術的にも発展性が期待できる試みと位置づけられる。

研究成果の概要（英文）：This study was examined using pathological tissue and cell lines for the purpose of elucidating the role of Foxp4 molecules on the progression of endometrial cancer. When immunostaining of Foxp4 was performed for 154 surgical cases, all cases of lymph node metastasis and postoperative recurrence showed increased immunohistochemical expression of Foxp4 protein. Further, it was confirmed that the cell proliferation ability is significantly reduced in endometrial cancer cells were knocked down Foxp4. Furthermore, when the cell lines that were knocked down and overexpressed Foxp4 was transplanted subcutaneously in mice, it was confirmed that the increased expression of Foxp4 was promoting tumor formation. These results suggest that Foxp4 expression induction is involved in the exacerbation of endometrial cancer.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮体癌 Foxp4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌は臨床および病理組織学そして分子生物学的に2つのタイプ(Type1とType2)に分類されている。Type1は、最も頻度の高い組織型である類内膜癌であり、病理学的形態から比較的悪性度が低いと考えられている症例においても、しばしば原発病変部の進行程度に比して予想に反するリンパ節転移や遠隔転移、あるいは再発をきたしてくる症例が存在し、臨床的に問題となっている。しかしながら現在術前に類内膜癌の悪性度を的確に予測できる臨床的に有効なパラメーターはない。これまで類内膜癌の悪性度を規定する因子として p53 遺伝子変異と予後との相関が報告されていたことから、後方視的に子宮体部類内膜癌の臨床データと p53 の免疫染色性および遺伝子変異との関連をあらためて解析したところ、p53 が癌細胞の 10-50%しか染色されない通常 p53 陰性と判定される群において、遺伝子変異はわずか 15%程度であったものの、p53 過剰発現群(80%以上陽性)と同様の頻度でリンパ節/遠隔転移・術後再発が確認された。以上から遺伝子変異以外の因子として「p53 蛋白の代謝カスケードの異常がもたらす意義を再評価する必要がある」との発想に至った。p53 蛋白の代謝カスケードに関係する可能性のある分子を探索したところ、リンパ節転移および術後再発症例において ERβが免疫組織学的に高発現していることを確認した。しかしながら、子宮体部類内膜癌の患者のほとんどが閉経後であることを考えると、類内膜癌の増悪化をエストロゲン依存機構で説明するのは疑問の余地があり、ERβに並行して発現変化する分子についてさらに検討したところ、転写因子の一つである Foxp4 に着目することとなった。Forkhead box (Fox) 転写因子は様々な臓器の悪性腫瘍と関連することが近年報告されているが、その発現がどのような機序で癌の発生・進展に寄与しているかは現時点で不明である。Foxp 遺伝子ファミリーには4つの subtype が同定されており、Foxp4 は最も新しく同定された Fox 転写因子であり、肺の分泌上皮細胞の分化・再生を調節していることが報告されている。しかしながら、Foxp4 の発現と婦人科臓器悪性腫瘍の発生・進展との関連を示した報告は現時点で見当たらない。

2. 研究の目的

本研究の目的は Foxp4 分子発現を病理組織、細胞株、遺伝子改変マウスを用いて検討して子宮体部類内膜癌の悪性化に関する有意義な情報を得ること、さらに婦人科悪性腫瘍全般に対する Foxp4 の関与について病理組織学的に検討して先駆的な知見を得ることである。本研究は、子宮体部類内膜癌の増悪化において新たなパラメーターの提案や他の婦人科悪性腫瘍の新しい癌化機構の解明につながる可能性を有しており、またその成果から Fox 転写因子を標的とした新たな治療戦略の提案に発展していくことが期待される。

3. 研究の方法

本研究は2年の研究期間中に Foxp4 分子に焦点をあて、子宮体部類内膜癌の臨床検体を用いた検証、子宮体癌細胞株を用いた検証、子宮頸癌における Foxp4 発現の検討、の3項目を施行した。の臨床検体を用いた検証では、術前に遠隔転移がないことを確認して手術で子宮全摘した子宮体部類内膜癌の各症例における代表的な腫瘍組織に対して Foxp4 の免疫組織学的発現を解析した。腫瘍組織における Foxp4 蛋白の局在は ABC 法における免疫染色にて確認した。Foxp4 免疫染色の判定基準は腫瘍細胞の核の染色領域が 10%未満を Low expression、10-49%を moderate expression、50%以上を High expression と規定し、臨床経過との関連を解析した。の細胞株を用いた検証では、ヒト子宮内膜癌細胞株を用いて Foxp4 をノックダウンし、proliferation assay、soft agar colony formation assay により増殖能を評価する。また、ヒト子宮内膜癌細胞株を用いて Foxp4 をノックダウンした細胞株およびマウス子宮内膜癌細胞株を用いて Foxp4 過剰発現させた細胞株をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍形成能を検討した。の子宮頸癌における検討では、正常子宮頸部、子宮頸部軽度異形成(CIN1)、中等度異形成(CIN2)、高度異形成(CIN3)、そして子宮頸癌の臨床検体を用いて Foxp4 の免疫組織学的発現を解析した。

4. 研究成果

子宮体部類内膜癌の臨床検体を用いた検証

本研究では154例の子宮体部類内膜癌手術症例に対して Foxp4 の免疫染色を施行した。リンパ節転移あるいは術後再発をきたした症例はそのうち30例あった。免疫染色の結果は、Foxp4 の Low expression が50例、moderate expression が54例、High expression が50例であった。臨床経過との関連を検討したところ、リンパ節転移・術後再発症例は全て moderate/high expression であった。また、Foxp4 の免疫組織学的発現が高度になるにつれて Disease free survival が有意に短くなることも確認された。

細胞株を用いた検証

ヒト子宮内膜癌細胞株を用いて Foxp4 をノックダウンし、proliferation assay、soft agar colony formation assay により増殖能を評価したところ、Foxp4 をノックダウンした細胞株では増殖能が有意に低下していることを確認した。子宮内膜癌細胞株を用いて Foxp4 をノックダウンおよび過剰発現させた細胞株をマウスの皮下に移植し、腫瘍形成能を検討したところ、Foxp4 ノックダウンした細胞株ではコントロールに比べて有意に腫瘍サイズが縮小していた。また、Foxp4 過剰発現させた細胞株ではコントロールに比べて有意に腫瘍サイズが増大していた。

子宮頸癌における検討

子宮頸部病変の臨床検体を用いて Foxp4 の免疫染色を施行した。正常子宮頸部よりも前癌病変である子宮頸部異形成で Foxp4 の発現強度が上昇しており、さらに子宮頸癌は子宮頸部異形成よりも Foxp4 の発現強度が上昇していることが確認され、この結果は子宮頸部の癌化に Foxp4 の発現上昇が関与している可能性を示唆する結果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----