

平成21年 4月 15日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890022

研究課題名（和文）

癌の転移制御に向けた、子宮癌肉腫をモデルとする上皮間葉移行関連遺伝子の探究

研究課題名（英文）The search for EMT-related genes using clinical specimens of the uterine carcinosarcoma

研究代表者

豊島 将文（TOYOSHIMA MASAFUMI）

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：70451581

研究成果の概要：

1. 臨床標本について上皮間葉移行(EMT)に関わると考えられる分子 Hrs の免疫染色を行った。免疫染色では関連は不明であったが、Hrs の中枢神経系での重要性を見出し論文発表した。
2. 子宮癌肉腫症例標本をレーザーマイクロダイセクションにて癌と肉腫部分に分けて RNA を抽出した。しかし研究期間中に十分な症例数が集まらずアレイ解析は不可能であった。
3. 低酸素環境と EMT の関連を解析した。子宮内膜癌細胞株を異なる酸素濃度下で培養し、低酸素濃度で間葉系細胞に類似する細胞形態変化と vimentin の増加を認めた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

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

キーワード：子宮癌肉腫、上皮間葉移行、間葉上皮移行、遠隔転移、マイクロダイセクション、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

癌患者の治療成績を向上させるためには原発巣からの遠隔転移の制御が大きな問題となるが、癌細胞が原発巣から遠隔転移するメカニズムは現在のところ十分に解明されていない。上皮系の癌細胞が遠隔転移する過程

は以下の3つの過程からなると考えられる。

1. 原発巣から癌細胞が浸潤性を持ち間質へ浸潤していく
2. 間質から脈管へと進入し、血流またはリンパ流によって循環系に入る
3. 脈管から間質へと進入し、遠隔転移巣を作る

これらのうち1の段階で、癌細胞が隣接する細胞と密に結合する上皮性増殖から移動能を持ち結合性が低下した間葉性形態へと変化する、上皮間葉移行 (EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition) と呼ばれる現象が起こる事が知られている。EMTの特徴は E-cadherin などの接着因子の減少と Vimentin などの間葉系マーカーの増加である。EMT を制御する転写因子として Twist, Snail などが知られており、最近では動物実験モデルを用いてこの EMT が癌の浸潤・転移に深く関与する事が分かってきた (reviewed by Christiansen JJ et al. Cancer Research 2006)。しかしヒト臨床検体で実際に EMT が生じているかを調べた研究は非常に少ない。一方、子宮に発生する悪性腫瘍のうち約 3-5% は肉腫であるが、そのほぼ半数は癌肉腫という癌腫成分と肉腫成分の両方が見られる腫瘍である。癌肉腫の組織発生については諸説があり、上皮組織と間質組織の同時悪性化による衝突腫瘍説や、上皮性悪性細胞の肉腫様変化によるとする上皮性腫瘍説、また多分化能をもった未熟な幹細胞から癌と肉腫が同時に発生したとする幹細胞由来説等が提唱されている。しかし最近では癌種成分と肉腫成分が同一クローンを起源とする事が明らかとなり、上皮性腫瘍説や幹細胞由来説が注目されている。我々は「子宮癌肉腫の肉腫成分は癌腫成分が組織内で間葉系への形態変化を起こした病態である」との仮説を立てた。

2. 研究の目的

- ・子宮肉腫をモデル疾患として EMT に関連する遺伝子群をスクリーニングする
- ・EMT に関連する遺伝子と癌転移との関連を解析する
- ・EMT に関わる環境変化を調べる

3. 研究の方法

- ・子宮癌肉腫の凍結標本をレーザーマイクロダイセクション法で癌種部分と肉腫部分に分けて採取する。採取した組織より RNA を抽出し、マイクロアレイ解析にて両方で発現量の大きく異なる遺伝子群をスクリーニングする。
- ・上記でスクリーニングされた遺伝子、およびその他の EMT に関わる新規分子について癌組織での発現を免疫染色法にて調べる。さらに細胞株を用いて *in vitro* での機能解析を行う。
- ・遺伝子変化のほかに、EMT を起こすような環境変化の有無について解析を行う。具体的には酸素濃度の変化が EMT と関連するかを調べる。

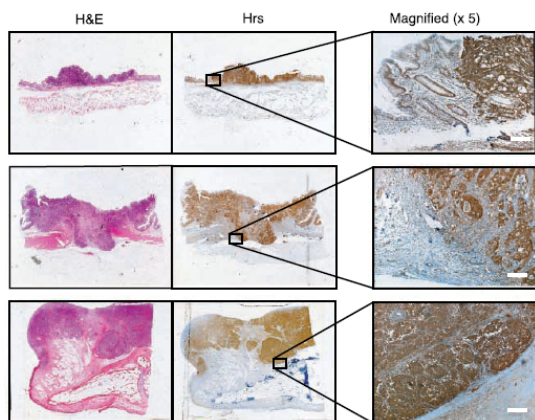
4. 研究成果

(1) 当科で開腹手術を受けた癌肉腫症例で、凍結標本の作製が可能であった例についてレーザーマイクロダイセクションにて癌部分と肉腫部分に分けて組織を採取し、それぞれから RNA を抽出した。凍結標本からの組織染色では間質部分の細胞密度が低く、肉腫領域の抽出が困難であった。癌種部分については認識も容易であり十分量の組織を採取できた。これらの抽出された RNA を用いてマイクロアレイ解析を予定していたが、臨床的に十分な症例数を確保できなかった。再現性のあるデータを得るために多数の臨床検体が必要と考えているが、まだ症例数が足りないためマイクロアレイ解析は準備中である。

(2) マイクロアレイ解析が症例数不足により研究期間内に出来なかったため、他の EMT に関わる候補分子について解析を行った。小胞輸送関連分子 Hrs は、細胞表面のリガンド結合受容体の細胞内輸送とその分解を制御す

ることシグナル伝達系において大きな役割を果たす。我々はこのHrsがヒト癌組織で強発現しており(図1)、遠隔転移を含む癌細胞の悪性形質に大きく関わることを報告した。その際にHrsがc-Metの分解を制御してHGFシグナルを増強させる事を見出しており、HrsはEMTにも関連する可能性を考えた。

図1

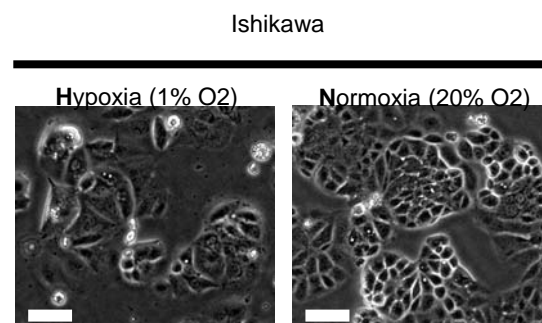


そこで、ホルマリン固定された臨床標本(癌肉腫 29 例、コントロールとして子宮肉腫の他の組織型である平滑筋肉腫 12 例、内膜間質肉腫 5 例)について、Hrs の免疫染色にてその発現量の検討を行った。しかし癌の部分だけでなく肉腫部分にも Hrs の染色を認め、Hrs の発現量と EMT の関連は明らかにはならなかった。しかし Hrs に関しては研究代表者が作成したノックアウトマウスにて中枢神経系での重要性を見出し、この成果を論文発表した。

(3)最近の論文で低酸素環境が EMT を促進することが報告された。生体内は細胞培養環境と比較すると非常に低酸素濃度であり、かつ腫瘍組織ではさらに低酸素濃度と考えられる。そこで子宮癌肉腫において同様の機構が生じているかを調べるため、子宮癌肉腫より樹立した癌細胞株である FU-MMT-1 と FU-MMT-3 と子宮内膜由来の癌細胞株である

Ishikawa をそれぞれ異なる酸素濃度下(20%O₂ と 1%O₂) で培養し増殖速度や形態変化を観察した。FU-MMT 細胞株では明らかな変化は認められなかったものの、Ishikawa 細胞では低酸素濃度で間葉系細胞に類似する細胞形態の変化(扁平化、細胞間結合の乱れ; 図2)が観察されるとともに、著明な vimentin (間葉系細胞のマーカー)の増加を認めた。以上の実験より、子宮内膜悪性腫瘍の病態において低酸素濃度が重要な役割を持つことが示唆された。現在卵巣癌では血管新生阻害剤が新しい抗癌剤として注目を集めているが、血管新生と腫瘍内酸素濃度は密接な関係にある。将来的には酸素濃度と子宮内膜悪性腫瘍の組織型との関係や、血管新生への影響について調べたいと考えている。

図2



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 5 件)

① Generation of a syngeneic mouse model to study the intraperitoneal dissemination of ovarian cancer with *in vivo* luciferase imaging.

Toyoshima M, Tanaka Y, Matumoto M, Yamazaki M, Nagase S, Sugamura K and Yaegashi N. *Luminescence* 2009 in press 査読有

② Loss of Hrs in the Central Nervous System Causes Accumulation of Ubiquitinated

Proteins and Neurodegeneration.

Tamai K, Toyoshima M, Tanaka N, Yamamoto N, Owada Y, Kiyonari H, Murata K, Ueno Y, Ono M, Shimosegawa T, Yaegashi N, Watanabe M, Sugamura K. Am J Pathol. 2008 Dec;173(6):1806-1817. 査読有

③The therapeutic strategy for the uterine body cancer.

Nobuo Yaegashi, Hitoshi Niikura, Masafumi Toyoshima. Focus on Oncology (2008)8:8-10 in Japanese. 査読無

④A diagnosis and treatment of the uterine body carcinoma.

Masafumi Toyoshima and Nobuo Yaegashi. Byori To Rinsho 26 (2008) 335-339 in Japanese. 査読無

⑤Inhibition of Tumor Growth and Metastasis by Depletion of Hepatocyte Growth Factor-Regulated Tyrosine Kinase Substrate (Hrs), a Key Regulator of Monoubiquitinated Protein Sorting: Hrs-Mediated Regulation of E-Cadherin and B-Catenin.

Masafumi Toyoshima, Nobuyuki Tanaka, Jun Aoki, Yoshinori Tanaka, Kazuko Murata, Masanao Kyuuma, Hideyuki Kobayashi, Naoto Ishii, Nobuo Yaegashi, Kazuo Sugamura. Cancer Research 67 (2007) 5162-5171 査読有

[学会発表] (計 1 件)

①子宮癌肉腫の病態とそれを踏まえた治療戦略

豊島将文

第44回日本婦人科腫瘍学会 シンポジウム 2008年7月17日 名古屋市

[図書] (計 1 件)

①婦人科がん標準化学療法の実際 子宮肉腫癌肉腫 豊島将文 金原出版社 2008年 188 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊島 将文 (TOYOSHIMA MASAFUMI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号 : 70451581

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし