

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791166

研究課題名（和文）転移性卵巣腫瘍における卵巣特異的転移機序及び癌・間質相互作用の研究

研究課題名（英文） The investigation of the mechanism of ovarian-specific metastasis and possible carcinoma-stroma interaction in ovarian metastatic tumors

研究代表者

三上佳子（MIKAMI YOSHIKO）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40349535

研究成果の概要（和文）：我々はマウス卵巣高転移モデルを樹立し、モデルを用いた検討から、E-cadherin の発現低下が卵巣特異的転移に関与していることを示した。さらに、転移性卵巣腫瘍症例における臨床病理学的検討により、E-cadherin の発現低下が転移性卵巣腫瘍における卵巣間質の増殖と有意な相関を示すことを明らかにした。胃癌など卵巣から遠隔の臓器からの転移において、E-cadherin の発現低下および、癌細胞と卵巣間質細胞との間の癌・間質相互作用は促進的に働くと考えられた。

研究成果の概要（英文）：We established an in vivo model of ovarian-specific metastasis, and showed that E-cadherin down-regulation may be involved in ovarian-specific metastasis. Our histological investigation of clinical ovarian-metastatic tumor cases showed a significant correlation between E-cadherin down-regulation and proliferation of ovarian stroma in the tumor. In the mechanism of ovarian metastasis from distant organs, such as stomach, may be require E-cadherin down regulation and carcinoma-stroma interaction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

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：婦人科腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

(1) 学術的背景

転移性卵巣癌は、本邦においては卵巣癌の17.8%を占める。原発部位は胃、膵、S状結腸、乳房、胆嚢、肺などで、消化器系が大半を占める(Yakushiji M *et. al.*: *Acta Obst Gynaec*

Jpn, 1987, Irving JA *et. al.*: *Am J Surg Pathol*, 2005)。逆に消化器癌の卵巣転移率は0.7%と決して高くはないが、胃粘膜癌でも卵巣転移の報告があることから(Kakushika N *et. al.*: *J Gastroenterol*, 2003)、卵巣に特異的に転移する性格を持つ

癌の存在が示唆される。

臓器特異的な転移については、乳癌の肺転移へのケモカイン CXCR4 の関与 (Muller A *et. al.*: *Nature*, 2001) や、前立腺癌の骨転移における骨髄特有の微小環境の関与 (Morrissey C *et. al.*: *J Cell Biochem*, 2007) などの知見が得られている。しかし卵巣への特異的転移については、基礎的な研究はほとんど報告されていない。そこで我々は、本研究において卵巣への特異的転移機序を明らかにすることを目的とした。

また、いわゆる Krukenberg 腫瘍という名称は転移性卵巣癌全体を指して用いられることも多いが、狭義では①卵巣悪性腫瘍 ②腫瘍性印環細胞における細胞内ムチン産生 ③卵巣間質細胞のびまん性肉腫様増殖 の3項を満たすものを指す。③の卵巣間質の増殖は、癌・間質相互作用による可能性がある。そこで本研究では、転移性卵巣腫瘍における癌・間質相互作用についても明らかにすることを目指した。

(2) 平成19年度までの研究成果

①Krukenberg 腫瘍を模倣する *in vivo* 卵巣高転移モデルの樹立

我々は種々の癌細胞株 (8 種類) を NOD/SCID マウスへ移植し、転移部位の検討を行った。静脈注射による移植では、低分化肺癌細胞株 RERF-LC-AI が高率に卵巣転移を示した。腹腔内移植では、3 種類の低分化胃癌細胞株及び RERF-LC-AI が低率ながら卵巣への転移を示した。

RERF-LC-AI の卵巣転移性腫瘍においては、Krukenberg 腫瘍における卵巣間質の肉腫様増殖を模倣するような、卵巣間質の著明な増殖が認められた。

②E-cadherin の卵巣特異的転移への関与の証明

卵巣転移を示した癌細胞株はいずれも低分化であった。低分化癌では E-cadherin の発現低下が高頻度で認められることが知られている。また、germ line における E-cadherin 遺伝子の異常を認める家系では、高率に diffuse type の胃癌や invasive lobular type の乳癌を発症することが知られており (Pharoah PD *et. al.*: *Gastroenterology* 2001)、一方これらの組織型の胃癌や乳癌は他の組織型に比べ卵巣転移を来しやすい (Kim NK *et. al.*: *Cancer* 1999, Gagnon Y *et. al.*: *Cancer* 1989)。そこで、移植に用いた 8 種類の癌細胞株について、western blot により E-cadherin の発現の有無を調べたところ、卵巣転移性を示した 4 種の細胞株および Krukenberg 腫瘍細胞株において E-cadherin の発現が消失していることが明らかとなった。

卵巣高転移性細胞株である RERF-LC-AI に

E-cadherin を強制発現させ、卵巣への転移性の変化を検討したところ、mock のクローンが高い卵巣転移性を示したのに対し、E-cadherin 発現クローンは全く卵巣転移を来さなかった。肺など他の臓器への転移性はいずれのクローンにおいても維持されており、E-cadherin 発現クローンの転移腫瘍では E-cadherin の発現が免疫染色にて確認し得た。これらから、E-cadherin の発現の消失が卵巣への特異的転移に関与していることが明らかになった。

2. 研究の目的

(1) 臨床検体における検討

転移性卵巣腫瘍の臨床検体を用いて、E-cadherin 発現の有無や間質の増殖性を評価し、臨床病理学的因子との相関を検討する。

(2) 卵巣特異的転移機序、および癌・間質相互作用の分子レベルにおける検討

卵巣高転移性癌細胞株と卵巣間質細胞との共培養を行い、各細胞の増殖能の変化や形態の変化を検討し、さらには卵巣特異的転移や癌・間質相互作用の鍵となる分子を見出す。

3. 研究の方法

(1) 転移性卵巣腫瘍症例における臨床病理学的検討

①E-cadherin 発現低下と種々の因子との相関の検討

転移性卵巣腫瘍の臨床症例 30 例 (慶應義塾大学病院における手術例および剖検例) において、E-cadherin の発現低下を免疫組織学的に評価し、間質細胞の増殖性及び種々の臨床病理学的因子との相関について検討を行った。

②p-Akt 発現の検討

上記臨床症例検体において、細胞の増殖や生存に関与するシグナル伝達系に作用する p-Akt の発現を免疫組織学的に評価した。

(2) 卵巣高転移性癌細胞株と卵巣間細胞との共培養における検討

①卵巣高転移性細胞株およびそのクローンの標識

接触培養下では、癌細胞株と卵巣間質細胞との鑑別が必要になるため、卵巣高転移性癌細胞株の E-cadherin 発現クローンおよび mock クローンを、GFP 遺伝子を導入し標識した。遺伝子の導入においては、GFP 搭載レトロウイルスベクター産生細胞を用い、導入細胞はセルソーターにかけ選別した。

②癌細胞株と卵巣間質細胞初代培養との共培養における各細胞の増殖能の検討

GFP 標識した RERF-LC-AI クローンを、マウス卵巣間質初代培養細胞 (以下 MOS) と共に接触・非接触条件下で共培養し、増殖能の変

化の有無を検討した。

非接触条件下での培養は、6 wel plate と insert wel を組み合わせて行い、各々からの回収細胞の計数により増殖能を検討した。接触条件下での培養においては、6 wel plate に MOS を各 wel 5×10^4 個播いた上、翌日 RERF-LC-AI の E-cadherin 導入クローン及び mock クローンを各々 3wel ずつ 5×10^4 個/wel 播き、2 日間共培養した。培養後、各 wel ごとに回収した細胞をフローサイトメーターにかけ、GFP 標識細胞の割合を算出し、回収細胞総数に乗じて癌細胞株クローンの細胞数とした。癌細胞株の GFP 標識率は 100% ではないため、当該クローンの GFP 標識率による補正も行った。接触・非接触培養とも、実験ごとに MOS および各癌細胞株クローンの単独培養を同時に行い、細胞数を計数してコントロールとした。

(3) Krukenberg 腫瘍細胞株を用いた卵巢高転移性細胞株の樹立

Krukenberg 腫瘍細胞株である HSKTC は、卵巢特異的転移機序の解明において重要な研究対象と考えられるが、NOD/SCID マウス体内における腫瘍形成能が著しく低く、細胞株としての卵巢転移能の評価が困難であった。そこで、HSKTC を大量にマウス皮下へ移植し、形成された腫瘍を培養して得た亜株をマウスへ腹腔内投与・静脈注射により移植を行い、卵巢転移能を検討した。

4. 研究成果

(1) 転移性卵巢腫瘍症例における臨床病理学的検討

①E-cadherin 発現低下と種々の因子との関連の検討

転移性卵巢腫瘍の臨床症例 30 例において、E-cadherin の発現低下は 14 例に認められ、かつ両側性・若年齢・低分化癌・原発が胃癌であること・卵巢間質の増殖などの因子と有意な相関を示した (表 1)。他の 16 例では、E-cadherin の強い発現が見られ、多くは高分化大腸癌が原発であり、腫瘍における卵巢間質の増殖はほとんど見られなかった。H.E 染色及び E-cadherin など免疫染色の代表的な所見を図 1 に示す。

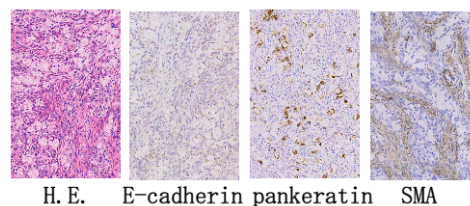
E-cadherin の発現低下が認められた腫瘍の原発部位はほとんどが胃もしくは乳腺であり、解剖学的に卵巢から離れた臓器であった。他方、E-cadherin 陽性症例のほとんどは結腸由来であり、卵巢と比較的近接した臓器からの転移とみなすことができる。従って、卵巢への転移には複数の機序があると推測される。解剖学的近接性によらない、比較的遠隔の臓器からの卵巢転移には、癌細胞の卵巢特異的な転移向性が関与しており、そこには E-cadherin 発現低下が必須である可能性

がある。E-cadherin の発現低下と卵巢間質の増殖とが有意に相関することから、このような機序の転移においては、癌細胞株と卵巢間質細胞との癌・間質相互作用が促進的に働いている可能性がある。

表 1. E-cadherin の発現による転移性卵巢腫瘍臨床症例の分類

	E-cadherin の発現		P 値
	陰性・弱陽性	陽性	
症例数	14	16	
平均年齢	48.6 (29-77)	59.2 (46-78)	0.014
原発臓器			0.028
胃	10	3	
大腸	2	13	
乳房	1		
不明	1		
転移性卵巢腫瘍の組織学的所見			
分化度			0.00002
高・中分化	0	12	
低分化	14	4	
卵巢間質の増殖			0.0002
あり	11	2	
なし	3	14	

A



B

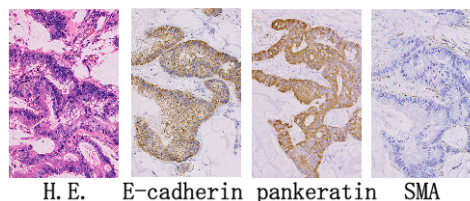


図 1. 転移性卵巢腫瘍臨床症例における代表的な所見 (A) E-cadherin 陰性症例 (B) E-cadherin 陽性症例。H.E. 染色及び E-cadherin、pankeratin (AE1/AE3)、SMA 免疫染色。(A)では E-cadherin 発現低下および間質の著明な増殖が認められる。(B)は E-cadherin 陽性の高分化腺癌の像を呈し、間質の増殖は比較的乏しい。

②p-Akt 発現の検討

転移性卵巢腫瘍臨床症例において p-Akt の発現を免疫組織学的に検討したところ、E-cadherin 発現低下と腫瘍細胞における p-Akt 発現とが相関する傾向を示した (表 2)。E-cadherin の発現低下は、p-Akt を介するシグナル伝達系に何らかの作用を及ぼし、卵巢転移に促進的に働くと推測される。

表 2. 転移性卵巣腫瘍臨床症例における
腫瘍細胞のp-Akt発現の検討

	E-cadherinの発現		P 値
	陰性・弱陽性	陽性	
症例数			
腫瘍細胞における p-Aktの発現			0.033
陽性	11	6	
陰性	3	10	

(2) 卵巣高転移性癌細胞株と卵巣間細胞との共培養における検討

①卵巣高転移性細胞クローンの標識

RERF-LC-AI の E-cadherin 導入クローンおよび mock クローンに、レトロウィルスを用いて GFP を導入し、フローサイトメーターにて導入率を確認したところ、14-18%であった。さらに、セルソーターによる選別を行ったところ、GFP 標識率は 93-95%となった。

②癌細胞クローンと卵巣間質細胞初代培養 (MOS) との共培養における各細胞の増殖能の検討

非接触条件下での共培養は 2 回施行したが、MOS・癌細胞クローンともに共培養による増殖能の有意な亢進はみられず、卵巣転移腫瘍における癌・間質相互作用には癌細胞・間質細胞の直接接触を要する可能性が示唆された。E-cadherin は接着分子であることから、癌・間質相互作用に E-cadherin が何らかの関与をもつことと矛盾しない結果と考えられる。

次に接触条件下での共培養実験を 5 回施行し、各実験において、各 well ごとに MOS および癌細胞クローンの細胞数を算出し、共培養と単独培養 (各 3 well) の結果を比較検討したところ、表 3 a, b の結果を得た。

表 3 a. 癌細胞株との接触共培養による MOS 増殖能の
変化の検討

	平均細胞数の比 (／MOS 単独培養) (P 値)	
	E-cadherin 導入クローン	mock クローン
1 回目	1.6 (0.022)	5.6 (0.0060)
2 回目	1.5 (0.027)	4.5 (0.0054)
3 回目	1.1 (0.26)	2.7 (0.014)
4 回目	1.5 (0.12)	4.4 (0.00032)
5 回目	1.5 (0.032)	1.5 (0.20)

表 3 b. MOS との接触共培養による癌細胞株増殖能の
変化の検討

	平均細胞数の比 (／各クローン単独培養) (P 値)	
	E-cadherin 導入クローン	mock クローン
1 回目	1.1 (0.58)	0.89 (0.54)
2 回目	1.1 (0.45)	0.60 (0.046)
3 回目	0.87 (0.42)	0.83 (0.48)
4 回目	1.0 (0.92)	0.70 (0.049)
5 回目	1.3 (0.085)	1.1 (0.39)

MOS の増殖能については、mock クローンとの接触共培養で亢進する傾向が見られたが、5 回の実験のうち 2 回でデータに大きなばらつきがみられ、有意な結果が得られなかった。E-cadherin 導入クローンとの接触共培養では、MOS の増殖能に大きな変化は見られなかった。また癌細胞クローンの増殖能について、MOS との接触共培養の有無による有意な変化は得られなかった。

本実験は、実験系が複雑であるため実験過程での細胞の喪失を生じ、有意な結果を得られなかった可能性がある。今回の結果より、少なくとも、マウス卵巣間質初代培養細胞 MOS は卵巣高転移性癌細胞クローンの接触下での作用により増殖能が亢進する可能性が示唆されるが、実験系に改善を加えた上でさらなる検討が必要と考えられる。

(3) Krukenberg 腫瘍細胞株を用いた卵巣高転移性細胞株の樹立

Krukenberg 腫瘍細胞株 HSKTC のマウス皮下移植腫瘍を in vivo で繰り返し継代することにより、腫瘍形成能を強化した亜株を得た。この亜株をマウスへ腹腔内投与もしくは静脈注射したところ、卵巣転移腫瘍を形成し、この腫瘍からさらに継代を繰り返した結果、静脈注射により高率 (約 70%) に卵巣転移を来す亜株を得ることができた。この卵巣高転移性亜株および親株の HSKTC においては、免疫染色及び western blot により E-cadherin 発現の消失を確認した。今後の本研究において、この卵巣高転移性亜株は有用であると考えられる。

(4) 今後の展望

今後は、卵巣高転移性をもつ 2 つの癌細胞株 RERF-LC-AI および HSKTC 亜株を用いて、マウス卵巣間質初代培養細胞 MOS との接触共培養下におけるそれぞれの増殖能・生存能・遊走能などを評価する系を改善・確立し、癌・間質相互作用の存在を明らかにしたい。さらに、共培養上清を解析し、癌・間質相互作用、ひいては卵巣特異的転移機序において重要な分子を見出したいと考えている。

E-cadherin の機能として、接着分子としての作用以外に、EGFR など種々の受容体型チロシンキナーゼの活性化阻害などが報告されている (Qian X *et. al.* : *The EMBO Journal*, 2004)。今後の本研究における分子レベルでの解析では、このような E-cadherin の新たな知見も手がかりとなると考えられる。

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 1 件）

- ① Kuwabara Y（三上佳子旧姓）, Yamada T, Yamazaki K, Banno K, Aoki D, Sakamoto M. Establishment of an ovarian metastasis model and possible involvement of E-cadherin down-regulation in the metastasis. Cancer Science 2008;99: 1933-1939. 査読あり

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 特に無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三上 佳子 (MIKAMI YOSHIKO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：40349535

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：