

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03822

研究課題名（和文）子宮がん自然発症マウスモデルを用いたがん発生を制御する上皮・間質の相互応答の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the interaction between epithelium and stroma that regulates cancer development using mouse models

研究代表者

大黒 多希子 (Daikoku, Takiko)

金沢大学・疾患モデル総合研究センター・教授

研究者番号：30767249

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究従事者らはこれまで子宮部位特異的にPten遺伝子を欠損させたマウスを用いて、子宮上皮過形成、子宮体癌や子宮肉腫を自然発症するマウスモデルを作出してきた。本研究ではこれらのマウスモデルを使用し、子宮・間質の相互応答に関わる卵巣ホルモン等の影響を解析するとともに、それぞれの間質及び上皮の遺伝子発現の相違を検討して、子宮上皮過形成や子宮体癌の発生に関わる間質因子の候補や、子宮肉腫の発生に関わる上皮因子の候補を見出すとともに、その作用機序の一部を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の浸潤・転移に間質細胞との相互作用が重要であることは広く知られているが、癌の発生における上皮・間質細胞間の相互応答の役割は不明な点が多く、また肉腫の発生・進展に対する上皮細胞の関与もほとんど報告がない。本研究で新たに発見された子宮がん発生・進展を促進あるいは抑制に関わると考えられる上皮もしくは間質の因子は、子宮がんの新たな治療ターゲットとなり、新規治療薬の開発につながると考えられ、社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The researchers in this study have so far created mouse models that spontaneously develop uterine epithelial hyperplasia, endometrial cancer, and uterine sarcoma using mice with site-specific deletion of the Pten gene. In this study, we used these mouse models to analyze the effects of ovarian hormones on the mutual response of the uterus and stroma. We also examined the differences in gene expression in the stroma or epithelium to find epithelial effectors for epithelial hyperplasia and endometrial cancers, and stromal factors for sarcoma. We found candidate stromal factors involved in the development of endometrial cancer and candidate epithelial factors involved in the development of uterine sarcoma, and clarified some of their mechanisms of action.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：マウスモデル

### 1. 研究開始当初の背景

癌の進展に間質細胞との相互作用が重要であることは広く知られているが、がんの発生における上皮・間質細胞間の相互応答の役割は不明な点が多い。申請者は子宮体癌の発生のメカニズムを解析するために、Pten 遺伝子を子宮内膜特異的 (Pten-PRcre) \ 子宮上皮特異的 (Pten-LTFcre) および子宮間質特異的 (Pten-AMHR2cre) に欠損するマウスを作製した結果、子宮体癌の発生には上皮細胞に加え間質細胞での Pten 遺伝子欠損も必須であることが明らかとなった。一方で上記マウスにプロゲステロンを投与したところ、子宮内膜特異的 Pten 欠損マウスにのみ子宮肉腫が発生することが観察され、子宮体癌とは逆に Pten 遺伝子の機能が保存されている上皮細胞が肉腫化を抑制している可能性を見出した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、子宮体癌及び肉腫の発生に関わる上皮・間質細胞の相互応答因子の探索とその分子機構の解明を行うことである。

### 3. 研究の方法

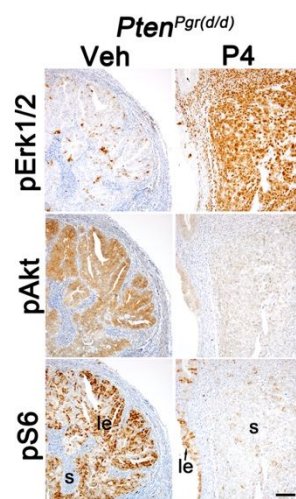
Pten 遺伝子を子宮内膜特異的 (Pten-PRcre) もしくは子宮上皮特異的 (Pten-LTFcre) および子宮間質特異的 (Pten-AMHR2cre) に欠損するマウスを用いて、上皮、間質細胞間の相互作用に重要な役割を行う卵巣ホルモン等が、子宮がん発生にどのような影響を与えるかについて検討し、変化があった系については、上皮、あるいは間質の遺伝子発現をマイクロアレイによって比較し、その分子機構について検討した。

### 4. 研究成果

Pten-PRcre マウスは、子宮上皮と間質で Pten が欠損しており、1ヶ月令で上皮が癌化する。このマウスを3週令で卵巣除去し、プロゲステロンを投与すると、癌化した上皮の細胞増殖は抑制するが、間質の細胞はがん化(肉腫化)する。一方で、Pten-LTFcre マウスは、子宮上皮で Pten が欠損し、間質の Pten は正常であり、2ヶ月令で上皮に癌前駆体である complex atypical hyperplasia が生じる。このマウスを2ヶ月令で卵巣除去し、プロゲステロンを投与すると、Pten-PRcre マウスと同様に上皮の細胞増殖は抑制されるが、間質はがん化しない。また、Pten-AMHR2cre マウスは、子宮上皮の Pten は正常であり、間質で Pten が欠損するが、同様の処置を行っても、上皮、間質とも正常を保つ。以上のことから、プロゲステロンによる Pten 欠損間質のがん化には上皮の Pten 欠損が関与していることが示唆された。一方で、Pten 欠損上皮のプロゲステロンによる癌化は、間質の Pten の有無に関わらず抑制されることを示している。そこで、Pten 欠損間質のがん化に関与する上皮因子と間質因子を見出すことを目指して、プロゲステロンで処置あるいは処置していない Pten-PRcre マウス子宮より上皮と間質を単離して、マイクロアレイを行った。

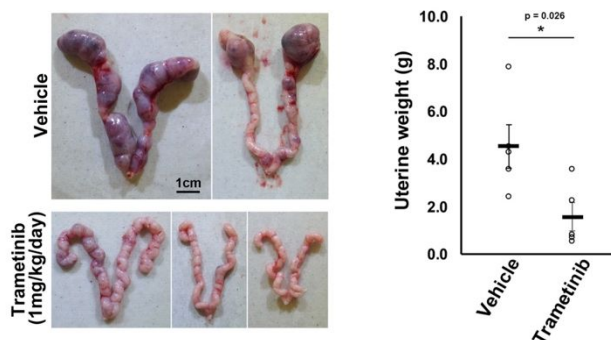
Pten 欠損間質のがん化には、Pten 欠損上皮からの刺激が必要であることから、プロゲステロンを処置した Pten-PRcre マウス子宮上皮で、処置していないマウス子宮上皮よりも発現が上昇している growth factor に注目した。その結果、Fgf2, Fgf22, Igf2, Efemp1 などの growth factor の発現量が上昇していた。一方で、プロゲステロンを処置した Pten-PRcre マウス子宮間質で、処置していないマウス子宮間質よりも発現が上昇している受容体に注目したところ、receptor type-protein tyrosine phosphatase や olfactory receptor のアイソフォームのいくつかが発現上昇していた。逆に、これらの受容体は別のアイソフォームではあるが、プロゲステロンを処置した Pten-PRcre マウスの子宮上皮で、処置していない子宮上皮よりも発現が減少していた。receptor type-protein tyrosine phosphatase は、PI3K-Akt-mTOR, MAPK などのさまざまなシグナル経路に関わっていることから、それぞれのシグナル経路の活性化を免疫染色で確認した。

通常、癌細胞では Pten 欠損によって PI3K-Akt-mTOR シグナル経路が活性化されることから、PI3K シグナルの活性化を示す phospho-Akt (pAkt) と mTORC1 のシグナル活性化を示す phospho-S6 (pS6) の免疫染色を行った。その結果、右図に示すように、プロゲステロン処置なしの場合、癌化した上皮では、pAkt, pS6 共に発現が高かったが、間質ではいずれも発現が認められなかった。またプロゲステロン処置ありの場合、癌化した上皮では、プロゲステロン処置なしに比べて pAkt, pS6 共に発現が低下した。一方で、間質では、プロゲステロン処置で、その発現はほとんど変化せず、pS6 ポジティブな細胞がいくつか認められるにとどまった。次に、MAPK の活性化を示す phospho-Erk (pErk) の免疫染色を行ったところ、右図

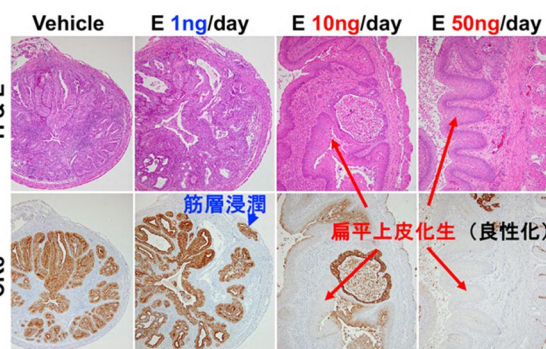


に示すように、プロゲステロン処置なしの場合、癌化した上皮でポジティブな細胞がいくつか認

められたが、間質ではその発現は認められなかった。一方で、プロゲステロン処置ありの場合、癌化した上皮では、プロゲステロン処置なしに比べて pErk の発現が低下するが、間質では、pErk の発現が顕著に増加した。そこで次に、MAPK シグナル阻害剤の効果を検討した (右図)。その結果、Pten-PRcre マウスにプロゲステロン及び Trametinib を投与した場合、間質のがん化が抑制された。以上の結果は、Pten 欠損した上皮で作られた growth factor が、Pten 欠損間質の receptor type-protein tyrosine phosphatase を介して MAPK シグナルを活性化していることを示唆している。

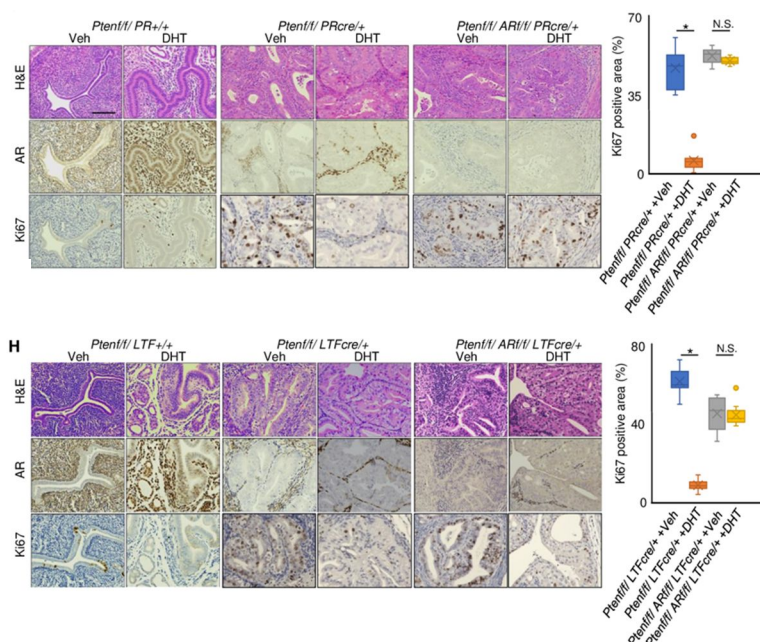


Pten-PRcre マウスは、3 週令で上皮に、癌前駆体である complex atypical hyperplasia が生じる。このマウスを 3 週令で卵巣除去し、エストロゲンを投与すると、投与濃度によって反応が異なっていた (右図)。エストロゲンはごま油で溶解した後にシリコンチューブに充填し、マウスの皮下に投与した。1 日 1ng 放出される系では、子宮上皮は子宮筋層に浸潤し、癌が進展していた。一方で、1 日 50ng 放出される系では、上皮が扁平上皮化しており、癌発生を抑制した。Pten-LTFcre マウスは、2 ヶ月令で上皮に癌前駆体である complex atypical hyperplasia が生じる。このマウスを 2 ヶ月令で卵巣除去し、エストロゲンを投与したが、1 日 50ng 放出される系



でも、ほとんどの上皮は complex atypical hyperplasia のままであり、一部のマウスの上皮の一部に扁平上皮化性が観察されたのみであった。以上のことから、生理学的に高い濃度であるエストロゲンが 1 日 50ng 放出される系において、Pten が KO された間質が、子宮上皮の扁平上皮化を促進する、つまり、癌化を抑制している可能性が示唆された。そこで、エストロゲン 1ng と 50ng 投与した Pten-PRcre の上皮を回収し、マイクロアレイによって遺伝子発現を比較した。その結果、エストロゲン 50ng 投与で、1ng 投与と比較して、扁平上皮のマーカである keratin5 及び 14、腔上皮の扁平上皮化に重要な役割を示す Runx1、Acvr1 などの因子の遺伝子が上昇していた。Runx1、Acvr1 は腔上皮に発現し、腔間質から放出される ActivinA によって活性化され、腔の重層扁平上皮化に関わることが知られている。したがって、Pten-PRcre マウスの Pten 欠損間質からも腔間質と同様に ActivinA などが放出され、Pten 欠損上皮の Acvr1 RunX1 経路を活性化して、扁平上皮化を誘導して、癌化を抑制している可能性が示唆された。

子宮体癌の発症・進展にはエストロゲンが優位に機能するといわれているが、子宮体癌の発症が多くの場合、エストロゲンが枯渇した閉経後に起こる。閉経後にはエストロゲンだけでなく、その前駆体のアンドロゲンの濃度も低下することから、アンドロゲンの子宮体癌への影響も検討した。Pten-PRcre マウスにおいて、体癌発症後の 6 週令で卵巣除去し、DHT を投与したところ、体癌において、細胞増殖が抑制された。Pten-PRcre マウスの子宮全体に AR の欠損を加えたところ、DHT の細胞増殖抑制効果は観察されなかった (右図)。次に、Pten-LTFcre マウスにおいて、complex atypical hyperplasia 発症後の 8 週令で卵巣除去し、DHT を投与したところ、上皮の細胞増殖が抑制された。さらに Pten-LTFcre マウスの上皮に AR の欠損を加えたが、DHT の細胞増殖抑制効果は AR 欠損



有無に関わらず観察された(全ページ、右図)。以上の結果は、子宮体癌あるいは complex atypical hyperplasia である上皮の細胞増殖は、上皮の AR のみならず間質の AR を介して抑制する可能性が示唆された。さらに AR の下流標的は FOXP4 であり、AR-DHT が FOXP4 の発現を抑制することによって、細胞増殖を抑制していることが示唆された。AR-DHT-FOXP4 の経路は、子宮頸部異形成においても抑制的に機能することも見出している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsumoto Takeo, Iizuka Takashi, Nakamura Mitsuhiro, Suzuki Takuma, Yamamoto Megumi, Ono Masanori, Kagami Kyosuke, Kasama Haruki, Wakae Koucho, Muramatsu Masamichi, Horike Shin-ichi, Kyo Satoru, Yamamoto Yasuhiko, Mizumoto Yasunari, Daikoku Takiko, Fujiwara Hiroshi	4. 巻 113
2. 論文標題 <scp>FOXP4</scp> inhibits squamous differentiation of atypical cells in cervical intraepithelial neoplasia via an <scp>ELF3</scp> dependent pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3376 ~ 3389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15489	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ono Masanori, Toyoda Natsumi, Kagami Kyosuke, Hosono Takashi, Matsumoto Takeo, Horike Shin-ichi, Yamazaki Rena, Nakamura Mitsuhiro, Mizumoto Yasunari, Fujiwara Tomoko, Ando Hitoshi, Fujiwara Hiroshi, Daikoku Takiko	4. 巻 23
2. 論文標題 Uterine Deletion of Bmal1 Impairs Placental Vascularization and Induces Intrauterine Fetal Death in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7637 ~ 7637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23147637	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mise Y, Hamanishi J, Daikoku T, Takamatsu S, Miyamoto T, Taki M, Yamanoi K, Yamaguchi K, Ukita M, Horikawa N, Abiko K, Murakami R, Furutake Y, Hosoe Y, Terakawa J, Kagabu M, Sugai T, Osakabe M, Fujiwara H, Matsumura N, Mandai M, Baba T	4. 巻 -
2. 論文標題 Immunosuppressive tumor microenvironment in uterine serous carcinoma via CCL7 signal with myeloid-derived suppressor cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgac032	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 -

1. 著者名 Kayahashi Kayo, Mizumoto Yasunari, Matsuoka Ayumi, Obata Takeshi, Iwadare Junpei, Nakamura Mitsuhiro, Daikoku Takiko, Fujiwara Hiroshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Mucinous, endometrioid, and serous ovarian cancers with peritoneal dissemination are potent candidates for P-cadherin targeted therapy: a retrospective cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-020-07737-w	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 -

1. 著者名 Fujiwara Tomoko, Ono Masanori, Mieda Michihiro, Yoshikawa Hiroaki, Nakata Rieko, Daikoku Takiko, Sekizuka-Kagami Naomi, Maida Yoshiko, Ando Hitoshi, Fujiwara Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Adolescent Dietary Habit-induced Obstetric and Gynecologic Disease (ADHOGD) as a New Hypothesis? Possible Involvement of Clock System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1294 ~ 1294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12051294	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Midori, Ono Masanori, Iizuka Takashi, Kagami Kyosuke, Fujiwara Tomoko, Sekizuka Kagami Naomi, Maida Yoshiko, Obata Takeshi, Yamazaki Rena, Daikoku Takiko, Fujiwara Hiroshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Hypertensive disorders of pregnancy are associated with dysmenorrhea in early adulthood: A cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 2292 ~ 2297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.14431	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kayahashi Kayo, Mizumoto Yasunari, Matsuoka Ayumi, Obata Takeshi, Iwadare Junpei, Nakamura Mitsuhiro, Daikoku Takiko, Fujiwara Hiroshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Mucinous, endometrioid, and serous ovarian cancers with peritoneal dissemination are potent candidates for P-cadherin targeted therapy: a retrospective cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-020-07737-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasan Nazmul, Nagata Naoto, Morishige Jun-ichi, Islam Md Tarikul, Jing Zheng, Harada Ken-ichi, Mieda Michihiro, Ono Masanori, Fujiwara Hiroshi, Daikoku Takiko, Fujiwara Tomoko, Maida Yoshiko, Ota Tsuguhito, Shimba Shigeki, Kaneko Shuichi, Fujimura Akio, Ando Hitoshi	4. 巻 49
2. 論文標題 Brown adipocyte-specific knockout of Bmal1 causes mild but significant thermogenesis impairment in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101202 ~ 101202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2021.101202	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakata Hiroki, Terakawa Jumpei, Horike Shin-ichi, Daikoku Takiko, Iseki Shoichi	4. 巻 381
2. 論文標題 The lack of terminal tubule cells in the submandibular gland of mice deficient in submandibular gland protein C	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 229 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-020-03205-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大黒多希子
2. 発表標題 マウスモデルを用いた子宮体癌発症・進展に対する女性ホルモンの影響についての解析
3. 学会等名 日本生殖内分泌学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 特許	発明者 2020	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-136995	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 特許	発明者 2022	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-077615	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	藤原 浩  (Fujiwara Hiroshi)  (30252456)	金沢大学・医学系・教授    (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	吉江 幹浩  (Mikihiro Yoshie)  (50434014)	東京薬科大学・薬学部・准教授    (32659)	
研究分担者	馬場 長  (Baba Tsukasa)  (60508240)	岩手医科大学・医学部・教授    (31201)	
研究分担者	三上 芳喜  (Mikami Yoshiki)  (90248245)	熊本大学・病院・教授    (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関