

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07413

研究課題名(和文) 子宮がん肉腫のS100A4/NMIIシグナルによるがん肉腫幹細胞化機構の解明

研究課題名(英文) Induction of stem cell features by S100A4/NMII signals in uterine carcinosarcoma

研究代表者

三枝 信 (Saegusa, Makoto)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：00265711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：正常子宮内膜組織と子宮内膜癌(Em Ca)におけるS100A1、p53、MDM2の発現を検証した。S100A1はEm Ca細胞株においてMDM2と相互作用したが、p53とは相互作用しなかった。p53/MDM2相互作用阻害剤により、p21waf1やBAXが増加した。S100A1の過剰発現は細胞遊走を亢進させ、アポトーシス作用を誘導した。正常子宮内膜では、S100A1の発現は分泌期および月経期の子宮内膜腺細胞で有意に増加した。高S100A1はMDM2およびp21waf1の発現、アポトーシスの状態と正の相関があり、Ki-67スコアとは逆相関があった。しかし、このような相関はEm Caでは認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、コロナ渦による研究環境の変化等に計画通りに進めることが困難となった。そこで、子宮がん肉腫の起源である子宮内膜癌を対象に、まずは、S100ファミリーメンバーが子宮内膜腺細胞の恒常性維持や発がんに関与する可能性について、S100A1とp53/MDM2との関連した結果、S100A1の発現は、正常子宮内膜組織の月経周期において、MDM2との相互作用を通じて細胞増殖、アポトーシス、移動を調節している。一方、子宮内膜癌では、このような機能相関が破綻していることを明らかにした。この研究成果は、子宮がん肉腫発生過程におけるS100ファミリーの機能を解明の第一段階で、今後は当初の研究目的を検証する。

研究成果の概要(英文)：S100A1 interacted with MDM2 but not p53 in endometrial cancer (Em Ca) cell lines. Treatment of cells stably overexpressing S100A1 with Nutlin-3A, an inhibitor of the p53/MDM2 interaction, increased expression of p53-target genes including p21waf1 and BAX. S100A1 overexpression enhanced cellular migration, but also sensitized cells to the antiproliferative and proapoptotic effects of Adriamycin, a genotoxic agent; these phenotypes were abrogated when S100A1 was knocked down using shRNA. In clinical samples from normal endometrium, S100A1 expression was significantly higher in endometrial glandular cells of the middle/late secretory and menstrual stages when compared to cells in the proliferative phases; high S100A1 was also positively correlated with expression of MDM2 and p21waf1 and apoptotic status, and inversely correlated with Ki-67 scores. However, such correlations were absent in Em Ca tissues.

研究分野：分子病理学

キーワード：S100A1 p53 MDM2 子宮内膜癌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜がん (Em Ca) は、発展途上国における女性生殖器の悪性腫瘍の中で最も多く見られる腫瘍である。Em Ca 患者の 15~20% は進行癌または再発癌であり、5 年生存率は 17% である。そのため、診断や治療のための新規バイオマーカーや治療標的の同定が急務となっている。

S100 タンパク質ファミリーは、EF-ハンド型のカルシウム結合タンパク質の多遺伝子からなり増殖、移動と浸潤、炎症、分化を含む多くの生物学的プロセスを調節する。これらの作用は、腫瘍抑制因子である p53 やその負の制御因子であるマウス二重微小染色体 2 (MDM2) などの様々な標的タンパク質と S100 タンパク質の相互作用を介する。

2. 研究の目的

本研究は、子宮がん肉腫のがん肉腫幹細胞の誘導・維持の分子機構を、カルシウム結合タンパク質の S100A4 とそのパートナー分子である非筋細胞ミオシン II により制御される上皮・間葉転換/がん幹細胞化機構とがん肉腫・間質相互作用の観点から解明することを目的とした。しかし、コロナ渦による研究環境の変化等に計画通りに進めることが困難となった。そこで、研究方針を変え、まずは、子宮がん肉腫の起源である子宮内膜癌を対象に、S100 ファミリーメンバーが p53/MDM2 軸の調節を通じて子宮内膜腺細胞の恒常性維持や発がんに関与する可能性を想定した。そこで、S100A1 と p53/MDM2 との関連に注目し、正常および悪性子宮内膜細胞における増殖、アポトーシス、移動に対する機能的影響を検証した。

3. 研究の方法

(1) プラスミドと細胞株

S100A1 cDNA を p3xFLAG-CMV14 ベクター (Sigma-Aldrich Chemicals) にクローニングした。S100A1 特異的のショートヘアピン RNA (shRNA) オリゴヌクレオチドは、RNAi-Ready pSIREN-RetroQ vector (Takara) の BamHI-EcoRI 部位にクローニングした。8 つの Em Ca 細胞株 (Hec1B, Hec6, Hec108, Hec116, Hec155, Hec251, Hec265, Ishikawa) を使用した。Hec6 および Ishikawa 細胞で S100A1 恒常的過剰発現クローンを樹立した。S100A を標的とした。Hec251 細胞で H251-S100A1-knockdown (KD) を作製した。

(2) 抗体

抗 FLAG M2 および抗アクチン抗体 (Sigma-Aldrich Chemicals)、抗 p21^{waf1}、抗サイクリン D1、抗 p53、抗 BCL2、および抗 Ki-67 抗体 (Dako)、抗 p27^{kip1} および抗 BAX 抗体 (BD Biosciences)、抗 MDM2 および抗 S100A1 (Abcam)、抗カスパーゼ 3 抗体および抗ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ 1 抗体 (PARP1) (Cell Signal)、抗サイクリン B1 抗体および抗サイクリン A2 抗体 (Santa Cruz Biotech) を購入した。

(3) 逆転写 (RT) -PCR

cDNA は 2g の total RNA から合成した。RT-PCR による増幅は、特定のプライマーを用いて同一の反応から合成した cDNA 同士の比較を可能にするため、指数関数的な段階で行った。

(4) ウェスタンブロットアッセイと免疫沈降法

RIPA buffer を用いて細胞内総タンパク質を分離した。細胞質画分および核画分は、ProteoExtract サブセルラープロテオーム抽出キット (Merck) を用いて調製した。タンパク質は SDS-PAGE で分離し、膜に移した後、ECL 検出システムした。免疫沈降は 1 mM CaCl₂ の存在下で

IP buffer で溶解させた。抗 FLAG M2、抗 p53 または抗 MDM2 抗体とインキュベートし、抗 FLAG M2 抗体、抗 p53 抗体、および抗 MDM2 抗体を用いてウェスタンブロットアッセイを実施した。

(5) フローサイトメトリー

細胞周期解析のために propidium iodide で染色した。BD FACS Calibur (BD Biosciences) と CellQuest Pro ソフトウェアバージョン 3.3 (BD Biosciences) で、フローサイトメトリーにより細胞を解析した。

(6) アポトーシス指数

HE 標本上、5 か所を無作為に選択し、高倍率フィールド (HPF) あたりのアポトーシス細胞の平均数をカウントして、アポトーシス細胞数を算出した。

(7) 免疫蛍光法

FLAG タグ付き S100A1 をトランスフェクションした後、細胞を抗 FLAG M2 抗体とインキュベートした。

(8) 創傷治癒アッセイ

200- μ l チップでスクラッチ傷をつけ、その面積を ImageJ ソフトウェアバージョン 1.41(NIH) により解析した。

(9) マイグレーションアッセイ

径 8 μ m の 24 ウェルトランスウェルチャンバーを用いて測定した。

(10) 症例

2007 年から 2020 年までの北里大学病院の Em Cas の子宮摘出標本を対象とした。グレード(G) 1 の 109 例、G2 の 51 例、G3 の 29 例を含む合計 189 例を検証した。また、正常子宮内膜組織の生検標本 89 例についても検討した。本研究は、北里大学医学部倫理委員会の承認を得た (B19-144)。

(11) 免疫組織化学(IHC)

IHC は、電子レンジ加熱法とポリマー免疫複合体(Envision, Dako)法の組み合わせで行った。IHC 所見の評価は、細胞質 / または核の陽性細胞を、その割合と免疫強度に基づいてスコアリングした。また、ランダムに選んだ 5 フィールドから少なくとも 1000 個の細胞をカウントし、ラベリング指数 (LIs) 算出した。

(12) TCGA データ解析

520 例の S100 ファミリーの mRNA 発現データ (RNA Seq V2 PSEM) をキャンサーゲノミクスバイオポータルから抽出し (<http://www.cbioportal.org/>)、全生存期間(OS)や無増悪生存期間(PFS)との相関を検討した。

(13) 統計情報

比較データは、Mann-Whitney U-test、Spearman の相関係数を用いて解析した。統計的有意差のカットオフは $P < 0.05$ とした。

4 . 研究成果

(1) 8 つの Em Ca 細胞株で S100A10 と S100A11 の mRNA が最も多く、S100A1、S100A2、S100A4、S100A9、S100A13 のレベルは中程度であった。S100A3、S100A5、S100A6、S100B、S100CA、S100P はほとんど発現していなかった。TCGA のデータを解析し、S100A1、S100A5、S100P mRNA の高発現症例は、OS および / または PFS が不良であった。上記の知見に基づき、正常および悪性子宮内膜細胞における S100A1 の機能的役割に着目した。

(2) S100A1 を安定的に過剰発現している細胞は、指数増殖期において低い増殖率を示した。

これは、MDM2 と p21^{waf1} の発現量の増加と同時に生じていた。一方、H251-S100A1-KD 細胞は、p21^{waf1} の減少とともに、より急速に増殖したが、MDM2 の発現は減少しなかった。

(3) Hec6 細胞で S100A1 を過剰発現させると、アドリアマイシン (ADR) 処理後にアポトーシス細胞数が増加した。これは、p53、MDM2、BAX、および切断型カスパーゼ-3 の発現の増加、および BCL2 の発現の減少とともに観察された。同様の所見は、ADR 処理した Ish-S100A1 細胞でも観察された。一方、S100A1 レベルを shRNA で減少させると、アポトーシス細胞数が減少した。

(3) S100A1 を過剰発現させると、創傷アッセイにおける細胞の移動速度が有意に増加した。一方、S100A1 をロックダウンすると、細胞の遊走能は有意に低下した。

(4) 正常子宮内膜の腺成分では、S100A1、MDM2、p21^{waf1} およびアポトーシス機能の平均 IHC スコアは、月経期および / または中・後期分泌期で他のステージより有意に高かった。一方、Ki-67 スコアは、増殖期から月経期にかけて有意な段階的減少を示した。平均 S100A1 スコアは MDM2 スコア、p21^{waf1} スコアおよびアポトーシス状態と正の相関を示し、S100A1 スコアは Ki-67 スコアと逆相関を示した。p53 スコアは Ki-67 スコアおよびアポトーシス状態と有意に相関し、一方 p21^{waf1} スコアは MDM2 スコアおよびアポトーシス細胞と有意に相関していた。Em Ca 組織において、S100A1、p53 スコア、Ki-67 LI、切断型 PARP1 陽性細胞は G1、G2 腫瘍に比べ G3 Em Ca で有意に高かったが、MDM2 スコアは後者で有意に高かった。S100A1 スコアの平均値は、検証したどのマーカーとも関連がなかったが、p53 スコアは Ki-67 LI および切断型 PARP1 陽性細胞と正の相関があった。S100A1 スコアといくつかの臨床病理学的因子との間には関連はなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakagawa M, Higuchi S, Hashimura M, Oguri Y, Matsumoto T, Yokoi A, Ishibashi Y, Ito T, Saegusa M	4. 巻 22
2. 論文標題 Functional interaction between S100A1 and MDM2 may modulate p53 signaling in normal and malignant endometrial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-022-09249-1.	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栃本 昌孝, 中川 茉祐, 橋村 美紀, 小栗 康子, 松本 俊英, 横井愛香, 石橋 侑, 伊藤 隆士, 三枝 信
2. 発表標題 子宮内膜ならびに子宮内膜癌におけるS100A1とMDM2の相互作用が p53機能に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 大12回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

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

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
---------	---------