

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月14日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592122

研究課題名（和文）癌幹細胞を標的とした卵巣癌における新しい分子標的治療の開発

研究課題名（英文）The new molecular targeting therapy against the cancer stem cell in ovarian cancers.

研究代表者

太田 剛 (TSUYOSHI OHTA)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：50375341

研究成果の概要（和文）：卵巣癌において癌幹細胞に関連する因子として Wilms' tumor 1 (WT1) 遺伝子に着目し、short hairpin RNA (shRNA) を用いて WT1 遺伝子を knockdown したところ、上皮間質移行 epithelial-mesenchymal transition (EMT) 様の変化を示し、また proapoptotic 蛋白である HtrA1 が誘導され、シスプラチンに対する感受性が増強する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We focused on the Wilms' tumor 1 (WT1) gene, which may be associated with the cancer stem cell in ovarian cancers. Short hairpin RNA (shRNA)-mediated stable downregulation of WT1, caused an epithelial-mesenchymal transition. We also demonstrated that WT1 could regulate HtrA1 and modulate cisplatin-mediated cytotoxicity using ovarian cancer cells transduced with WT1 shRNA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：癌幹細胞、Wilms' tumor 1、卵巣癌、薬剤耐性、分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣癌の化学療法は1st lineとしてプラチナとタキサン製剤の併用療法が確立されているが、当初抗癌剤に対して感受性を示しても再発時これらの薬剤に耐性となった症例では治療が困難となる。近年これを克服するため分子標的治療が注目された。ところが卵巣癌では臨床研究において血管新生因子を標的とした治療ではある程度の効果を認めたものの、分子標的治療薬の臨床効果は低く、当初期待していたほどの効果が得られ

ていないのが現状である (Clin Cancer Res 2005, Gynecol Oncol 2006)。そこで、我々は卵巣癌における再発と治療抵抗性獲得の機序として癌幹細胞に着目した。

(2) 癌幹細胞の概念は数十年以上も前から提唱されていたが、直接的な証明方法がなく広く受け入れられることはなかった。しかし幹細胞生物学・発生生物学の急速な進展により、癌にもまた正常組織同様のヒエラルキーが存在し、その頂点に位置する癌幹細胞のみ

が強い自己複製能と腫瘍形成能を有することが明らかにされた (Reya T. Nature 2001)。癌幹細胞は癌を形成する細胞の数%以下の比率であると言われ、様々な抗癌剤や放射線療法にも抵抗性を示し、癌再発の原因となる細胞であると報告されている (Bao S. Nature 2006)。癌幹細胞の治療抵抗性は、癌幹細胞が抗癌剤排出能力、中和能力、DNA修復能力を有していること、また特別な微小環境 (ニッチ) 内で休眠状態として存在するため、増殖する細胞を標的とする従来の癌治療には効果がないためと考えられる。近年、卵巣癌においても癌幹細胞の存在が報告され注目されている (Szotek PP. PNAS 2006)。

2. 研究の目的

(1) 抗癌剤は増殖能力の高い癌細胞には効果があっても、増殖能力の低い癌幹細胞には効果がなく残存し、再度癌細胞に分化していくことで再発、抗癌剤に対する抵抗性を示すようになるのではないかと考え、卵巣癌の癌幹細胞を同定、機能解析を行い、癌幹細胞を標的とする新たな分子標的治療を開発することを目的とした。

(2) 幹細胞が様々な phenotype を示す細胞に分化する過程において Wilms' tumor 1 (WT1) gene が重要な役割を果たすと最近報告された。また血液癌においては WT1 発現の変化により、癌幹細胞ががん細胞に分化していくと言われている。そこで我々は WT1 の発現変化により、卵巣癌細胞にどのような変化が起こるか、幹細胞の性質を示すようになるか否か、また薬剤感受性にどのような変化を来すかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

我々は卵巣癌細胞株における microarray 解析により幹細胞の分化に参与する WT1 が proapoptotic 蛋白である HtrA1 の発現を調節する可能性があることに着目し、以下の実験を行った。

(1) 卵巣癌細胞株 23 株における WT1, HtrA1 の発現を immunoblotting と real-time PCR 法により検討した。

(2) WT1 高発現細胞株には shRNA を導入して WT1 down-regulated cell を樹立し、上皮間質移行様の変化が起こるか、Immunoblotting により、E-cadherin, Vimentin の発現を検討した。

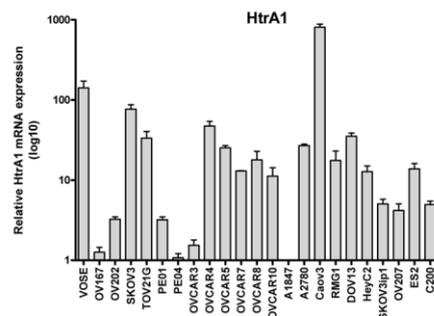
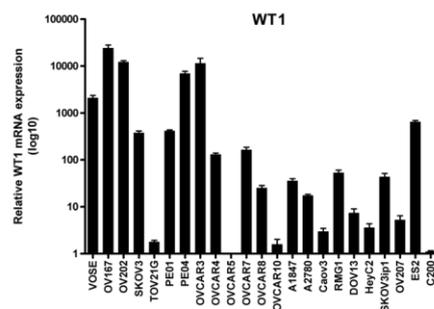
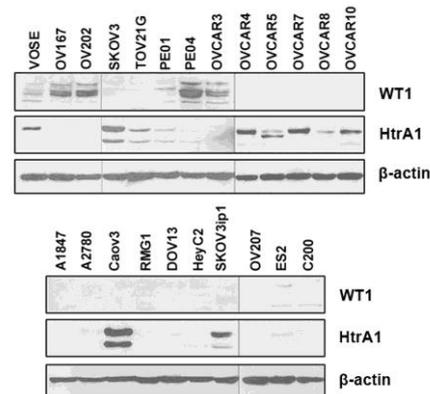
(3) WT1 down-regulated cell と WT1 未発現細胞株には lentivirus vector を導入して WT1 overexpressing cell を作成し、それぞれの対照細胞株 (non-targeting shRNA 導入

細胞、empty vector 導入細胞) との比較で HtrA1 の発現と cisplatin に対する感受性を検討した。

(4) ChIP assay, promoter assay により WT1 が HtrA1 promoter 領域に結合し、転写活性を変化させるかを検討した。

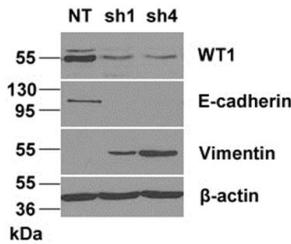
4. 研究成果

(1) 卵巣癌細胞株における WT1 と HtrA1 の発現を immunoblotting と Real Time-PCR 法で検討した。WT1 が高発現している卵巣癌細胞株、OV167, OV202, PEO4, OVCAR3 では HtrA1 の発現が低下していた。WT1 と HtrA1 の発現に inverse correlation を認めた。

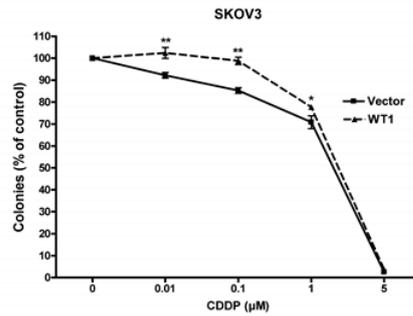
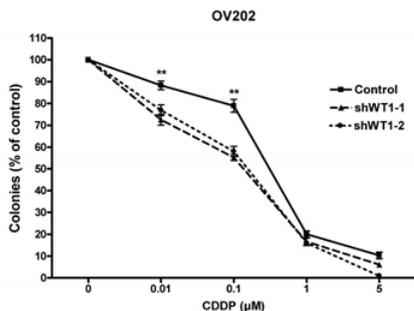
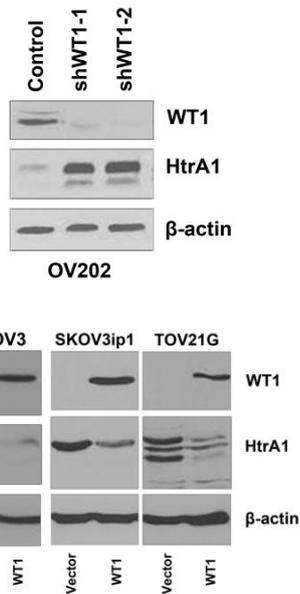


(2) OV202 細胞株において shRNA を用いて WT1 を knockdown させ、上皮間質移行様の変化を示すか否かについて検討した。

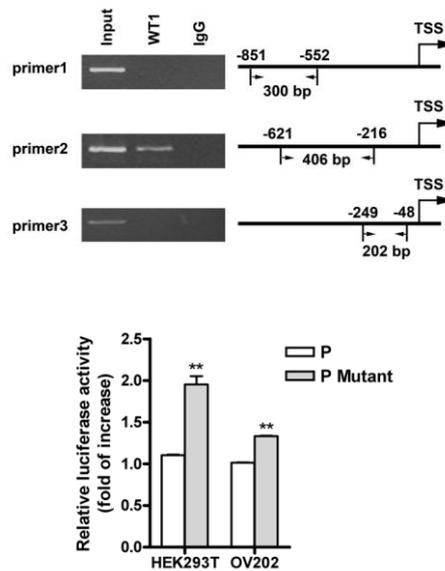
Immunoblotting により、E-cadherin, Vimentin の発現を検討したところ、WT1 knockdown cell において E-cadherin の消失、Vimentin の増強を認め、間葉系細胞の性質を獲得したと考えられた。



(3) WT1 の消失または過剰発現により、HtrA1 の発現がどのように変化するか、またシスプラチンの感受性に変化をもたらすか検討した。WT1 down-regulation で HtrA1 の発現が増強し、WT1 overexpression では HtrA1 の発現量が低下した。シスプラチンに対する感受性は、WT1 down-regulation で増強し、WT1 overexpression で低下した。



(4) ChIP assay より WT1 が3つある HtrA1 プロモーター領域の結合部位のうち WT1 binding site 2 (WTE2) に結合することが明らかになった。さらに WTE2 を含むレポータープラスミド(P)と、その WTE2 塩基配列に変異を起こしたもの(mutated P)を作成し、WT1 を発現している HEK293T, OV202 細胞に導入したところ、P 導入に比較して mutated P 導入時に、luciferase 活性が上昇したことより、WT1 は HtrA1 の negative regulator であることが示唆された。



以上の結果より、WT1 が消失するとは幹細胞の性質に近い間葉系細胞の特徴を持つようになる可能性があることが示唆された。また WT1 は HtrA1 の発現を調節することでシスプラチンに対する感受性を変化させ、卵巣癌治療における標的分子となり得る可能性が示唆された。この3年の研究期間内に行った研究成果は現在論文投稿中である。今後は幹細胞マーカーの発現が変化するかなども検討し、卵巣癌細胞からより癌幹細胞の性質をもった細胞株を樹立することを目的として研究を継続していきたい。

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 Ohta T, Takahashi T, Shibuya T, Amita M, Henmi N, Takahashi K, Kurachi H. Inhibition of the Rho/ROCK pathway enhances the efficacy of cisplatin through the blockage of hypoxia-inducible factor-1alpha in human ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2011;13(1):25-33、査読有り
- ② Takahashi K, Piao S, Yamatani H, Du B, Yin L, Ohta T, Kawagoe J, Takata K, Tsutsumi S, Kurachi H. Estrogen induces neurite outgrowth via Rho family GTPases in neuroblastoma cells. *Mol Cell Neurosci* 2011;48(3):217-224、査読有り
- ③ Henmi N, Takahashi K, Amita M, Takata K, Ohta T, Tsutsumi S, Takahashi T, Kurachi H. Effect of dienogest on estrogen-induced nitric oxide production in human umbilical vein endothelial cells and endothelium-dependent vasodilatation in postmenopausal women. *Menopause* 2010;17(3):615-621、査読有り
- ④ Amita M, Takahashi T, Tsutsumi S, Ohta T, Takata K, Henmi N, Hara S, Igarashi H, Takahashi K, Kurachi H. Molecular mechanism of the inhibition of estradiol-induced endometrial epithelial cell proliferation by clomiphene citrate. *Endocrinology* 2010;151(1):394-405、査読有り
- ⑤ Ohta T, Isobe M, Takahashi T, Saitoh-Sekiguchi M, Motoyama T, Kurachi H. (2009) The Akt and ERK activation by platinum-based chemotherapy in ovarian cancer is associated with favorable patient outcome. *Anticancer Res* 2009;29(11):4639-4647、査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ① Ohta T, Khurana A, Maguire J, He X, Chien J, Bible K, Shridhar V. Flavopiridol-induced upregulation of

HtrA1 is associated with suppression of its negative transcriptional regulator WT1 and with enhanced chemosensitivity. AACR, 2011, 4. 2-6, Orland, USA

- ② 太田剛、卵巣癌細胞における WT1 による HtrA1 の制御機構と薬剤感受性の関連、第 70 回日本癌学会、2011.10.3-5、名古屋国際会議場
- ③ 太田剛、卵巣癌細胞における HIF-1 阻害によるシスプラチンの抗腫瘍効果増強作用についての検討、第 61 回日本産科婦人科学会、2009.4.3-5、国立京都国際会館

[その他]

ホームページ等

http://www.id.yamagata-u.ac.jp/ObGyn/gyoseki_from2000.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 剛 (OHTA TSUYOSHI)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：50375341

(2) 研究分担者

倉智 博久 (KURACHI HIROHISA)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：40153366

吉田 隆之 (YOSHIDA TAKAYUKI)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：60466604

高田 恵子 (TAKATA KEIKO)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：70375343 (H21-H22)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：