

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20781

研究課題名（和文）若年者子宮内膜癌の癌細胞転位分化起点シグナルの同定と妊孕性温存療法への応用

研究課題名（英文）Identification of trans-differentiation origin signals and their application to fertility-preservation therapy in young endometrial carcinoma

研究代表者

横井 愛香 (Yokoi, Ako)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：90907148

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：PTENがmorule巢で高発現を示していたことから、PTEN過剰発現細胞株を作製した結果、Slugの発現増加、E-cadherinの発現低下を示し、線維芽細胞様への形態変化を認め、EMT化が示唆された。さらに、増殖能は低下しており、老化細胞の増加を認めた。また、ALDH1、CD44sの発現増加を示したことから、PTEN過剰発現はCSC様特徴を得ることが示唆された。その要因として、未分化の細胞周期と増殖の維持に関与するとされるCyclin D2が挙げられ、 $\beta$ -カテニンを介して制御されている可能性を得た。転位分化分子機構の一部を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、若年子宮内膜癌患者の妊孕性温存を目的とするMPA治療法の改良・確立を目指すことで、基礎研究と臨床研究の橋渡しの位置づけとなる。これは、臨床検体の詳細な解析結果と培養細胞を用いた関連分子の機能解析結果をハイブリッドすることにより、本治療法の分子基盤の一側面の解明が可能となる。最終的に、得られた成果を実臨床現場にフィードバックして、拳児希望の若年子宮内膜癌患者に対するMPA治療法の有益な効果判定や予後予測システムの構築を目指す。

研究成果の概要（英文）：Since PTEN was highly expressed in morules, PTEN-overexpressing cell lines were generated, which showed increased expression of Slug and decreased expression of E-cadherin, and morphological changes toward fibroblast-like cells, suggesting EMT. Moreover, the proliferative activity was decreased and the number of senescence cells increased. In addition, the increased expression of ALDH1 and CD44s suggested that PTEN overexpression gains CSC-like features. A possible factor was Cyclin D2, which is thought to be involved in the control of undifferentiated cell cycle and proliferation, and may be regulated via  $\beta$ -catenin. Part of the molecular mechanism of trans-differentiation was elucidated.

研究分野：医学

キーワード：子宮内膜癌 morule PTEN過剰発現 EBP50  $\beta$ -カテニン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### ・若年子宮内膜癌とホルモン (MPA) 療法の問題点

近年、女性の社会進出と晩婚化が進み、それに伴い妊娠・出産が高齢化している。また、食生活の欧米化等により 40 歳未満の子宮内膜癌の割合 (5.8%) が増加傾向を示す。一般に、若年者の子宮内膜癌患者で挙児希望がある場合、子宮温存を目的に MPA (メドロキシプロゲステロン) 療法が施行される。その奏効率は 57~76%、治療後の生児獲得率は 16~70% と報告されているが (Niwa K et al, BJOG, 2005)、奏功するまでに少なくとも 4 カ月以上の継続した治療が必要である。このため、1 カ月ごとに病変の治療効果判定のために子宮内膜組織診等が実施される。しかし、現時点でその効果判定の病理組織学的指標のガイドラインは制定されていない。加えて、病変が消失した後の再発例が 11~67% であることから、MPA 療法の有益な新規効果判定・予後予測システムの確立は喫緊の課題である。

#### ・MPA 療法による子宮内膜癌の morule 細胞への転位分化の意義

子宮内膜癌細胞は、MPA 療法により可逆的な分泌期様の形態変化と増殖抑制と共に、一部の癌細胞は morule 細胞 (桑実胚様外観) への転位分化を示す (Saegusa M et al, Cancer, 1998)。morule 細胞は  $\beta$ -カテニン遺伝子異常を伴う子宮内膜癌に高率に認められ、その特徴として低増殖能とエストロゲンレセプター  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) の発現欠如がある。これらの事実から申請者は、morule 細胞は、子宮内膜癌細胞の不可逆的な終末分化像である可能性を想定した。さらに、若年者子宮内膜癌では  $\beta$ -カテニン遺伝子異常が高率に検出され、MPA 療法により核内  $\beta$ -カテニンの異常集積を伴った morule 細胞巢の数およびサイズの増大が生じることから (Fei W et al, Cell Commun Signal, 2017) 子宮内膜癌細胞の morule 細胞への転位分化機構の解明は、MPA 療法の有益な効果判定や予後予測システムの構築に繋がると考えた。

#### ・子宮内膜癌の転位分化に関する未解決項目

子宮内膜癌細胞から morule 細胞への転位分化過程で、核内に異常集積した  $\beta$ -カテニンにより、PTEN を含む様々なシグナル経路の活性化が生じる (Saegusa M et al, Am J Pathol, 2009)。しかし、本経路の起点シグナルは未だ同定されていない。申請者は、morule 細胞の詳細な病理形態学的観察により、高円柱癌細胞が紡錘形の morule 細胞へと変化する過程は、細胞極性の消失を伴うと考えた。そこで、本経路の起点シグナルの解明のために、エストロゲン依存性の発現を示し、 $\beta$ -カテニンと PTEN の結合ドメインを有する細胞極性制御因子の EBP50 (Ezrin-Binding Phosphoprotein 50) に焦点を当てた。「MPA 療法による子宮内膜癌細胞から morule 細胞への転位分化起点シグナルとして、 $ER\alpha$ /EBP50 の発現消失による細胞極性の消失と、引き続き活性化される  $\beta$ -カテニン/PTEN 経路が重要である」という作業仮説を立案した。

### 2. 研究の目的

上記仮説を立証する。即ち、MPA 療法による子宮内膜癌細胞の morule 細胞への転位分化起点シグナルを  $ER\alpha$ /EBP50/ $\beta$ -カテニン/PTEN 経路の観点から解析し、転位分化の分子機構の一側面を明らかにする。<学術的独自性と創造性>：本研究は、子宮内膜癌に対する MPA 療法の分子基盤を、子宮内膜癌細胞の morule 細胞への転位分化機構の観点からアプローチする点に独自性がある。また、その成果を、子宮内膜癌に対する MPA 療法の有益な効果判定や予後予測システムの構築に応用する点に創造性がある。<波及効果> 様々な腫瘍細胞の極性変化と分化を制御するシグナルカスケードの解明に応用できる。

### 3. 研究の方法

#### A. 子宮内膜癌細胞での $ER\alpha$ 、EBP50、PTEN、及び $\beta$ -カテニン発現動態の検証

1)  $ER\alpha$ 、EBP50、 $\beta$ -カテニン、PTEN 発現様式を免疫組織学的・分子病理学的に検索し、それらの発現の相互関係を検証する。

2)  $ER\alpha$  による EBP50 発現制御機構を、プロモーター活性の変化や mRNA・タンパク質発現レベルの変化から検索する。

#### B. $ER\alpha$ /EBP50/ $\beta$ -カテニン/PTEN 経路による子宮内膜癌の転位分化起点シグナルの解明

1) 臨床検体による検討：morule 細胞の生物学的特性を明らかにするために、幹細胞マーカー及び EMT マーカー発現と  $ER\alpha$ /EBP50/ $\beta$ -カテニン/PTEN 経路との関連性を免疫組織学的・分子病理学的に検索する。

2) 子宮内膜癌培養細胞による検討： $ER\alpha$ /EBP50/ $\beta$ -カテニン/PTEN 経路の機能解析を行うために、EBP50、 $\beta$ -カテニン、及び PTEN の恒常的過剰発現系及び shRNA によるノックダウン系細胞を作製して、細胞動態、EMT、及び癌幹細胞化に及ぼす影響を分子病理学的に検索する。

#### C. $ER\alpha$ /EBP50/ $\beta$ -カテニン/PTEN 経路による子宮内膜癌の効果的 MPA 療法の開発とその新規効果判定・予後予測システムの構築

1) 子宮内膜癌の MPA 療法による経時的病理組織像の変化：morule 巢の形成・増大と MPA 療法の治療効果との関連性を病理組織学的に検索する。

2) 上記の病理組織標本で、EBP50、 $\beta$ -カテニン、PTEN、癌幹細胞マーカー、及び EMT マーカー発現を検索し、morule 形成・増大との関連性を検証する。

3) プロゲステロンによる培養癌細胞の形態・動態変化やその関連分子の発現変化を分子病理学的に検索する。

4) 総括：子宮内膜癌細胞の morule 細胞は不可逆的終末分化像であることを実証し、morule 像をターゲットとした子宮内膜癌に対する MPA 療法の有益な新規治療効果判定・予後予測システムを構築する。

#### 4. 研究成果

##### 1) ER $\alpha$ 、EBP50、PTEN、及び $\beta$ -カテニン発現動態の検証

子宮類内膜癌細胞 Ishikawa を用いて、Luciferase assay より、ER $\alpha$ による EBP50 プロモーター活性の検討を行った結果、ER $\alpha$ 濃度依存性に EBP50 の転写活性は増加したことから(図1)、エストロゲン依存性に EBP50 発現が制御されていることが示唆された。EBP50 と PTEN/ $\beta$ -カテニンそれぞれが会合するのか検討した。PTEN は免疫沈降法より、EBP50 との結合を示し、 $\beta$ -カテニンでは Pull-down assay より、EBP50 のドメイン PDZ2 に結合することが分かった。子宮正常内膜検体では、エストロゲン高値を示す増殖期で EBP50 発現は高く示した。子宮内膜癌臨床検体 38 例の免疫組織化学的検討を行った結果、morule 巣では特に、ER $\alpha$ 及び EBP50 発現低下、PTEN 発現増加、 $\beta$ -カテニン核内移行が有意に認められ(図2)、蛍光抗体法でも同様の結果が得られた。これらのことから、EBP50 はエストロゲン依存性であり、PTEN/ $\beta$ -カテニンと相互作用する可能性が得られた。

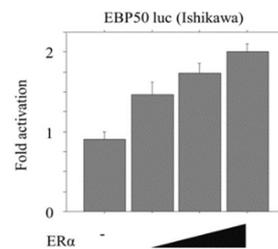


図1: ER $\alpha$ による EBP50 転写活性

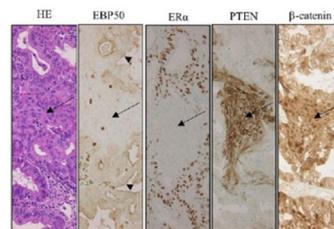


図2: 子宮類内膜癌臨床検体における免疫組織化学的検討(矢印: morule)

2) 子宮内膜癌組織内の morule 巣の分子病理学的特性 morule 巣を有する子宮内膜癌組織 38 例を用いて、分子病理学的特性を検索するため、PTEN/ $\beta$ -カテニン関連分子 (GSK3 $\beta$ , p-Akt)、各種幹細胞マーカー (ALDH1, CD133, CD44s, CD44v6)、EMT マーカー (E-cadherin 発現抑制因子: Twist1) 細胞増殖指標分子 Ki67 を用いて、morule、pre-morule (morule 細胞 20 個未満の morule 初期段階) 周囲の癌細胞 (Sur-Ca) で比較検討を行った。morule、pre-morule では Sur-Ca と比較して、PTEN、GSK-3 $\beta$ 、核内 $\beta$ -カテニン、CD44s、CD44v6、細胞質 CD133、Twist1 の発現増加、p-AKT、細胞膜 $\beta$ -catenin、細胞膜 CD133、Ki67 の発現低下が有意に認められた(図3)。これは、morule では幹細胞化、EMT 化、増殖能低下が起きていることが示唆され、さらには初期の段階から上記の現象がみられることを示している。

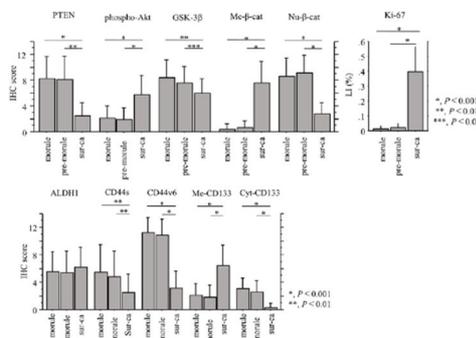


図3: morule/pre-morule/sur-ca を比較した免疫組織化学的検討

##### 3) morule 巣の分子病理学的特性の解明: PTEN 過剰発現の機能解析

上記 morule 巣の分子機構を解明するため、PTEN が morule 巣で高発現を示していたことから、PTEN 過剰発現細胞株を作製し、機能解析を行うこととした。内因性 PTEN が欠如している子宮類内膜癌細胞 Hec6 を用いて外因的に PTEN を発現させた (H6-PTEN)。

H6-PTEN 細胞は、p-GSK3 $\beta$ 、Slug の発現増加、p-AKT、p- $\beta$ -catenin、E-cadherin、N-cadherin の発現低下を示し、線維芽細胞様への形態変化を認め、EMT 化が示唆された。さらに、増殖能は低下しており、senescence associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) assay より、H6-PTEN 細胞では SA- $\beta$ -gal 陽性細胞が増え、老化細胞の増加を示した(図4)。アポトーシスの関連を検討するため、Adriamycin で処理した結果、mock と比較して subG1 が増加し、p-Akt 発現低下、BAX 発現増加を示したことから、PTEN 過剰発現によりアポトーシス感受性の増大が示唆された。また、H6-PTEN 細胞は移動能が亢進していた。EMT は癌幹細胞 (CSC) 化の性質を促進することから、PTEN 過剰発現と CSC 様特性との関連を検討した。H6-PTEN 細胞は、CD133、Sox2 の発現低下を示した一方で、ALDH1、CD44s の発現増加を示した。ALDEFLUOR assay より、CSC 様細胞を多く含む ALDH 活性の高い細胞が mock と比較して有意に増加していた。Spheroid assay においても mock と比較して、直径 50 $\mu$ m 以上の境界明瞭な円形スフェロイドを形成し、数が有意に増加していたことから(図5)、PTEN 過剰発現によって細胞移動

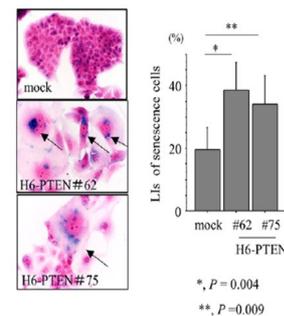


図4: SA- $\beta$ -gal assay

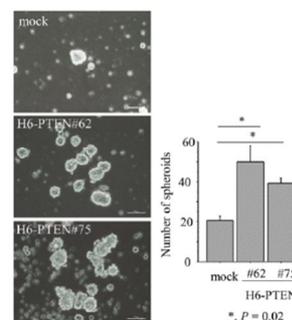


図5: Spheroid assay

能を促進し、CSC 様特徴を得ることが示唆された。

CSC 化関連遺伝子の中で PTEN と関連ある遺伝子を網羅的に検討するため、H6-PTEN 細胞から抽出した RNA を用いて RNA-seq assay を行った結果、未分化の細胞周期と増殖の維持に関与するとされる Cyclin D2 に着目した。H6-PTEN 細胞では、mRNA、タンパク発現共に増加しており、spheroid を形成する細胞でも Cyclin D2 発現は増加していた。Cyclin D2 のプロモーター領域には TCF4 結合部位が存在しており、 $\beta$ -カテニンを介して制御されていることが分かった。

上記のことから、子宮類内膜癌において PTEN 過剰発現することにより、EMT 化、老化細胞の増加、移動能亢進、CSC 化が起こり、CSC 化の要因として  $\beta$ -カテニンに制御される CyclinD2 によって引き起こされる可能性を得た。

#### 4) これまでの成果の統括・展望

EBP50 は PTEN/ $\beta$ -カテニンと相互作用を示していたが、morule 巣では発現が欠如していた。これは、EBP50 発現が欠如したことで PTEN/ $\beta$ -カテニンの制御が変わり、PTEN は過剰発現し、さらに PTEN は  $\beta$ -カテニンを安定化させ、分解されず核内へ移行したことが示唆される。また、PTEN の過剰発現は子宮類内膜癌細胞には様々な影響及ぼすことが *in vitro* で示された。morule では EMT 化、CSC 化といった悪性癌細胞でもよく示される現象が認められる反面、細胞増殖は極端に低下し老化細胞となっていることから未分化な状態へ変化していると考えられ、元の子宮類内膜癌細胞から脱分化が起こり、morule 細胞へと転位分化が起きていると推測される。

これにより、転位分化分子機構の一部を解明したと見ており、今後 EBP50 ノックダウン系、 $\beta$ -カテニン過剰発現系など異なるアプローチで morule 細胞を再現をし、さらには MPA 療法との関連を引き続き検討していくことで、転位分化の分子機構を解明していく。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Yokoi Aki, Minami Marina, Hashimura Miki, Oguri Yasuko, Matsumoto Toshihide, Hasegawa Yoshinori, Nakagawa Mayu, Ishibashi Yu, Ito Takashi, Ohigata Kensuke, Harada Youhei, Fukagawa Naomi, Saegusa Makoto            | 4. 巻<br>20            |
| 2. 論文標題<br>PTEN overexpression and nuclear $\beta$ -catenin stabilization promote morular differentiation through induction of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in endometrial carcinoma | 5. 発行年<br>2022年       |
| 3. 雑誌名<br>Cell Communication and Signaling   | 6. 最初と最後の頁<br>181-195 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1186/s12964-022-00999-w  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>横井愛香、南麻里奈、松本俊英、小栗康子、橋村美紀、長谷川嘉則、信太昭子、梶田咲美乃、三枝 信 |
| 2. 発表標題<br>子宮内膜癌細胞のPTEN過剰発現はEMT/がん幹細胞化を誘導する               |
| 3. 学会等名<br>第111回日本病理学会総会                                  |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>横井愛香、南麻里奈、松本俊英、小栗康子、橋村美紀、長谷川嘉則、信太昭子、梶田咲美乃、三枝 信 |
| 2. 発表標題<br>子宮内膜癌におけるPTEN過剰発現細胞が示す形態・分子機構の改変               |
| 3. 学会等名<br>日本プロテオーム学会2022年大会JHUP0第20回大会                   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|