

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25年 5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591855

研究課題名（和文） 子宮内膜癌の浸潤、転移に関わる癌遺伝子と癌幹細胞の相関解析

研究課題名（英文） Analysis of oncogenes involved in invasion or metastasis of endometrial cancer and detection of endometrial cancer stem cells

研究代表者

藤田征巳 (FUJITA MASAMI)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60303963

研究成果の概要（和文）：臨床検体を用いた TSC403 遺伝子の発現の解析を行った。子宮内膜癌組織でより発現の程度が高い傾向を認めた。遺伝子増幅は認めなかった。

TSC403 遺伝子発現細胞株を用いて In vitro における癌細胞の浸潤能解析を行った。有意な相関はなかった。

正常子宮内膜組織検体と子宮内膜癌組織検体について、iTRAQ 法を用いて、発現が増強または減弱していた蛋白質を同定した。そのうち蛋白質 X については、抗がん剤薬剤感受性に関係した。

癌幹細胞の解析は、CD133 を幹細胞表面マーカーとし FACS flow cytometry により行った。癌幹細胞を継代培養したが、その培養継続はできなかった。

また子宮内膜癌組織より、癌細胞からの新しいがん細胞調整法 CTOS: cancer tissue originated spheroid を試みた。子宮内膜癌において培養細胞 (CTOS) の作成に成功した。作成した CTOS は、抗がん剤による in vitro 薬剤感受性試験を行うことができた。本研究は、子宮内膜癌の新たな治療システムの開発に貢献が可能である。

研究成果の概要（英文）： Analysis of the expression of the TSC403 genes using clinical specimens was done. Tended high degree of expression was observed in endometrial cancer tissue. There was no gene amplification.

Invasion analysis of cancer cells in vitro using the TSC403 gene expressing cell line was done. Significant correlation was found.

From endometrial cancer tissue specimens and normal endometrial tissue samples, using the iTRAQ technique, we identified proteins whose expression has been attenuated or enhanced. Protein X is related to anti-cancer drug sensitivity.

The analysis of cancer stem cells was done by FACS flow cytometry using CD133 as a stem cell surface marker. Primary culture of cancer stem cells was done, but not continued.

From endometrial cancer tissue, new cancer cells adjusting method CTOS: cancer tissue-originated spheroid was tried. It succeeds in creating cultured cells (CTOS) in endometrial cancer. CTOS was created, could be performed vitro drug sensitivity test. This study, may contribute to the development of a new treatment system of endometrial cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1050,000	45,500,000

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

我々は、これまで婦人科腫瘍における一連の遺伝子変異の重要な知見を報告している。また実際の癌治療では、浸潤、転移による癌のひろがりや抑制しえないことが問題であり、さらに腫瘍が化学療法抵抗性を獲得することが予後不良の原因となる。これらの問題点を克服すべく本研究を構想した。TSC403 はヒト肺に特異的に発現する遺伝子として同定され、またさまざまなヒト癌種でも高発現が認められたが (Ozaki et al. *Cancer Res.* 1998)、これは免疫刺激を受けた樹状細胞の成熟により発現する DC-Lamp と同一であった (de Saint-Vis et al., *Immunity*, 1998)。我々は、この遺伝子に注目し、子宮頸癌でいくつかの重要な知見を報告した (Kanao et al. *Cancer Res.* 2005)。

癌組織中にも、幹細胞、すなわち癌幹細胞 (cancer stem cell) の存在が、いくつかの癌種で明らかになった (Polyak K, Hahn WC. *Nat Med.* 2006)。幹細胞は、Multi Drug Resistance に関係する薬剤排出機構を持ち、さらに強力な DNA 修復能と遅い細胞周期を持つため、複製の速い細胞を標的とする化学療法剤に抵抗性であり、これは癌幹細胞でも同様と考えられる。同様に、放射線にも抵抗性であり、Glioma の癌幹細胞で特異的な DNA 修復能の亢進による抵抗性の獲得が報告されている (Bao S et al. *Nature* 2006)。実地の癌治療の現場では、化学療法剤抵抗性および放射線抵抗性である癌幹細胞のごく少数が治療後に遺残し、それが再発、転移の元となる可能性が十分に考えられ、新たな治療戦略のターゲットとなると考えられる。

2. 研究の目的

子宮内膜癌に関しても、その浸潤、転移に関連する遺伝子としても、TSC403 遺伝子が有力な候補であると考えられた。我々は、子宮内膜癌における TSC403 の発現を検討し、浸潤・転移との関連を明らかにすること、TSC403 の機能解析により浸潤・転移との関連を明らかにすることを目的とした。子宮内膜癌においても CD133+ をマーカーとした癌幹細胞の同定が報告されたが (Rutella S et al. *Cancer Res.* 2009)、その生物学的特性はまだ明らかでなく、その解明と TSC403 の解析により、浸潤・転移との相関を検討する。また化学療法剤抵抗性との相関を明らかにすることも目的とする。

3. 研究の方法

子宮内膜癌臨床検体を採取し、DNA、mRNA、蛋白レベルでの変異の解析を行う。TSC403 過剰発現細胞株を樹立し、in vitro での浸潤能に与える影響を検討する。

子宮内膜癌 (各組織型) において癌幹細胞の分離手法を確立し、得られた細胞に対して、癌幹細胞であることの検証を行う。内膜癌細胞株 (TSC403 低発現 / TSC403 高発現) の CD133+ の発現をフローサイトメトリーにより比較解析する。

子宮内膜癌臨床検体を採取し、子宮内膜癌初代培養細胞を作成する。子宮内膜癌組織を機械的に破碎後化学的処理を施したのち 10 μ m ~ 100 μ m 大の腫瘍片を作成し専用培地にて培養する。こうして得られた腫瘍細胞株を抗癌剤感受性試験に用いる。

4. 研究成果

臨床検体を用いた TSC403 遺伝子の発現の解析を行った。正常子宮内膜組織および子宮内膜増殖症ではその発現の程度は低く、子宮内膜癌組織でより発現の程度が高い傾向を認めた。Competitive PCR 法による明らかな遺伝子増幅例はなかった。

安定的な TSC403 遺伝子高発現子宮内膜癌培養細胞株が得られたため、これらを用いて In vitro における癌細胞の浸潤能との相関について解析を行ったが、有意な相関の結果は得られなかった。

正常子宮内膜組織検体と子宮内膜癌組織検体における蛋白質発現について iTRAQ 法を用いて比較し、共通して発現が増強または減弱していた蛋白質の候補をそれぞれいくつか同定し解析した。そのうち蛋白質 X については、抗がん剤薬剤感受性に関係する結果が得られた。

子宮内膜癌における癌幹細胞の解析は、子宮内膜癌組織を処理し、CD133+ を幹細胞表面マーカーとし FACS flow cytometry により細胞の選別を行った。分離された癌幹細胞の候補を無血清培地で継代培養の系を樹立したが、その培養継続はできなかった。

癌幹細胞の候補の継代培養を試みるのと並行して、子宮内膜癌組織より、癌細胞からの新しいがん細胞調整法 CTOS: cancer tissue originated spheroid (Proc Natl Acad Sci USA, 2011;108(15):6235-40.) を試み、その結果、細胞間の接着 (cell-cell contact) を維持した状態で球状 (Spheroid) の培養細胞 (CTOS) を子宮内膜癌においてこれまでにいくつか作成した。作成した CTOS は、抗がん剤による in vitro 薬剤感受性試験を行うことができた。本研究により、子宮内膜癌の新たな治療システムの開発に貢献が可能と考えられる。

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 4 件)

- ① Miyake T, Ueda Y, Matsuzaki S, Miyatake T, Yoshino K, Fujita M, Nomura T, Enomoto T, Kimura T, CRABP1-reduced expression is associated with poorer prognosis in serous and clear cell ovarian adenocarcinoma., J Cancer Res Clin Oncol., 査読有, 137, 2012, 715-722
DOI: 10.1007/s00432-010-0930-8. 123.
- ② Fujiwara K, Egawa-Takata T, Ueda Y, Kimura T, Yoshino K, Fujita M, Miyatake T, Ohta Y, Kamiura S, Enomoto T, Kimura T, Investigating the relative efficacies of com-

ination chemotherapy of paclitaxel/carboplatin, with or without anthracycline, for endometrial carcinoma., Arch Gynecol Obstet., 査読有, 285(5), 2011, 1447-53.
DOI:10.1007/s00404-011-2154-9.

- ③ Egawa-Takata T, Ueda Y, Kuragaki C, Miyake T, Miyatake T, Fujita M, Yoshino K, Nakashima R, Okazawa M, Tsutsui T, Morishige K, Kimura T, Yamasaki M, Nishizaki T, Nagamatsu M, Ito K, Asada M, Ogita K, Wakimoto A, Yamamoto T, Nishio Y, Enomoto T, Chemotherapy for endometrial carcinoma (GOGO-EM1 study): TEC (paclitaxel, epirubicin, and carboplatin) is an effective remission-induction and adjuvant therapy., Cancer Chemother Pharmacol., 査読有, 68,2011,1603-1610
DOI:10.1007/s00280-011-1638-4
- ④ Yokoyama T, Enomoto T, Serada S, Morimoto A, Matsuzaki S, Ueda Y, Yoshino K, Fujita M, Kyo S, Iwahori K, Fujimoto M, Kimura T, Naka T, Plasma membrane proteomics identifies bone marrow stromal antigen 2 as a potential therapeutic target in endometrial cancer., Int J Cancer., 査読有, 132(2), 2013, 472-484
DOI:10.1002/ijc.27679.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 高田友美、上田豊、三宅貴仁、宮武崇、藤田征巳、吉野潔、岡澤美佳、筒井建紀、森重健一郎、木村正、山崎正人、西崎孝道、長松正章、伊藤公彦、浅田昌宏、荻田和秀、脇本昭憲、山本敏也、西尾幸浩、榎本隆之、子宮体癌に対する T E C 療法 (paclitaxel + epirubicin + carboplatin) の治療成績、日本婦人科腫瘍学会学術講演会、7.23/11、札幌
- ② Kiyohara Y, Kimura T, Yoshino K, Morimoto A, Ueda Y, Fujita M, Inoue M, Enomoto T, Kimura T, Chemo-sensitivity test using cancer-tissue originated spheroids(CTOSs) of endometrial cancer, 日本癌学会学術総会, 9.19-21/12, 札幌
- ③ Kimura T, Yoshino K, Hiramatsu K, Kiyohara Y, Morimoto A, Yokoyama T, Kobayashi E, Ueda Y, Fujita M, Inoue M, Enomoto T, Kimura T, Establishment of cancer-tissue originated spheroids (CTOSs) and chemo-sensitivity test for endometrial cancer, American Association for Cancer Research Annual meeting, 3.31-3/12, Chicago
- ④ Matsuzaki S, Morimoto A, Serada S, Yokoyama T, Kimura T, Kobayashi E, Ueda Y, Yoshino K, Fujita M, Enomoto T, Naka T,

Kimura T, Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A, American Association for Cancer Research Annual meeting, 4.6-10/13, Washington DC

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田征巳 (FUJITA MASAMI)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60303963

(2) 研究分担者

榎本隆之 (ENOMOTO TAKAYUKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・招聘教授

研究者番号：90283754

吉野潔 (YOSHINO KIYOSHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90362730

上田豊 (UEDA YUTAKA)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10346215

木村敏啓 (KIMURA TOSHIHIRO)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90584524

(3) 連携研究者

なし