

## 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 8 月 27 日現在

機関番号：32620  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22591868  
 研究課題名（和文） 子宮体癌細胞の転移能獲得機構の解明  
 研究課題名（英文） The mechanism of acquisition of metastatic and invasive capacity in endometrial cancer cell  
 研究代表者  
 寺尾泰久（ TERAU YASUHISA ）  
 順天堂大学・医学部・准教授  
 研究者番号：00348997

### 研究成果の概要（和文）：

子宮体癌幹細胞に発現が増加している遺伝子群の中から SPARC (secreted protein acidic and rich in cystein) を選択しその性質を解析した。正常子宮内膜・子宮体癌組織における SPARC の発現は正常子宮内膜では発現をみとめず、子宮体癌組織で発現しており特に低分化腺癌で発現が高かった。細胞基質蛋白 SPARC は子宮体癌幹細胞に発現が亢進し、腫瘍間質形成に関与し、遊走能を亢進することから、SPARC は子宮体癌の微小環境や間質への分化、転移に関与することが示唆された。

### 研究成果の概要（英文）：

We select SPARC (secreted protein acidic and rich in cystein) from the gene clusters which revelation is increasing to the endometrial cancer stem cell, and analyzed it. There is no-expression of SPARC in normal endometrium, but highly expressed in the endometrial cancer, especially in poorly differentiated adenocarcinoma of uterine corpus. These data showed that SPARC was associated with micro-environment of tumor-stroma formation and the migration capability.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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

キーワード：子宮体癌 癌幹細胞 EMT 転移能 SPARC

#### 1. 研究開始当初の背景

子宮体癌は乳癌とともに、最近増加してきている婦人科癌の 1 つである。臨床病理学的にはエストロゲン依存性の予後良好な I 型（高・中分化型類内膜腺癌）と、エストロゲン非依存性の予後不良の II 型（低分化型類内膜腺癌、漿液性腺癌、明細胞癌）に分けられ

る。前者は K-ras, PTEN 後者は p53, HER2/neu などの癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活性化が関与していることが報告され、組織分化度により発癌機構に関与するシグナル経路に違いがあることが示唆される。

我々が行った 1994～2008 年に当院で初回手術施行した子宮体癌 I～III 期 334 例を対

象とした検討では、単発再発例は分化度の高いものが多く、再発後の治療は外科的切除とその後の補助療法により長期予後が期待できたが、一方、多発再発例は低分化型腺癌、漿液性や明細胞癌が多く、手術不可能例が多く、細胞の分化度と転移能との関連が示された。子宮体癌患者の予後改善のためには転移能を抑制することが重要であり、そのメカニズムの解明が急務である。

癌の浸潤、転移には様々な分子機構が関与することが知られている。その中でも、原発巣からのがん細胞の遊離や血管内遊走の際に上皮間葉移行 epithelial-mesenchymal transition (EMT) の機構が重要な役割を果たすと考えられている。Weinberg らは、EMT を 1) 胚発生 2) 創傷治癒 3) 腫瘍の浸潤・転移に関与するものの 3 つに分類している。

2008 年、Mani らは、乳癌の癌幹細胞と考えられている CD44<sup>hi</sup>CD201<sup>o</sup> 細胞が EMT の性質を示し、逆に癌細胞に EMT を誘導すると幹細胞の特性を持つこと、転移能が亢進することを報告した。よって、乳癌の浸潤・転移能獲得機構に EMT の性質を有する癌幹細胞が関与している可能性が高いと考えられた。

我々は組織幹細胞の同定に使用される Hoechst33342 の取り込みの低い分画の細胞 (side population cells, 以下 SP 細胞) を分離する方法を用いて 正常子宮内膜や子宮体癌に SP 細胞が存在し幹細胞様の性質を持つことを報告した。子宮体癌細胞の SP 細胞は、自己複製能・長期増殖能・造腫瘍能の亢進といった癌幹細胞の特性を示すとともに、著明な足突起形成や運動能亢進と上皮細胞だけではなく間葉系細胞への分化能を持つことが特徴であった。以上より、子宮体癌においても癌幹細胞は浸潤・転移能獲得に関与していることが示唆され、EMT との関連を解明することが重要であると考えられる。また、その分子機構が明らかになれば、新規治療法の開発が可能となり患者の予後改善につながる。

## 2. 研究の目的

我々は造腫瘍能をもつラット子宮内膜細胞株を用いた予備的実験で SP 細胞は non-SP 細胞に比べて EMT 誘導に関与する複数の増殖因子やサイトカインの発現が亢進していることを見出している。本研究では、1) ヒト子宮体癌細胞株や臨床検体より得られた初代培養細胞を用いて、SP 細胞における EMT 関連因子の発現を検討し、子宮体癌幹細胞と EMT の関連を明らかにするとともに、足突起形成や運動能亢進に関与する因子 (とくに、低分子量 G 蛋白 Rho, Rac 等) の検討を行う。2) 癌幹細胞の特性との関与が明らかになった EMT 関連遺伝子を導入した子宮体癌細胞の細胞特性を解析するとともに、マウスへ移植

し、浸潤・転移能亢進の有無を in vivo で検討する。また、3) 臨床検体の組織切片を用いて、免疫組織染色により 1) で関与が明らかになった EMT 関連因子の発現を解析し、統計解析により組織型・組織分化度・進行期・再発の有無・予後との関連を検討する。以上より子宮体癌細胞の浸潤・転移能獲得機構への、癌幹細胞の関与を明らかにする。

## 3. 研究の方法

子宮体癌幹細胞と EMT の関連の解析:

ヒト子宮体癌細胞株や臨床検体より得られた初代培養細胞を用いて、SP 細胞における EMT 関連因子の発現を検討し、子宮体癌幹細胞と EMT の関連を明らかにするとともに、足突起形成や運動能亢進に関与する因子の検討を行う。

1) 子宮体癌細胞株または同意を得て手術摘出時に採取した子宮体癌組織より樹立した初代培養細胞より SP 細胞・non-SP 細胞を分離する。

2) マイクロアレイを行い、non-SP 細胞に比べて SP 細胞で有意に発現が高い遺伝子を同定する。

3) 2) の中で、特に EMT 関連因子に着目し、増殖因子・サイトカインであれば、parent, SP, non-SP 細胞の培養液に添加し、細胞特性の変化 (幹細胞特性・運動能・浸潤能等) を観察する。特に parent や non-SP 細胞に添加した場合、SP 細胞の出現率が増加してくるか、間葉系マーカーの発現が亢進するかを解析する。SP 細胞の培養液中にその阻害剤を添加し、幹細胞特性が変化するかを検討する。

4) 膜表面受容体や転写因子であった場合は、その遺伝子の cDNA を哺乳類発現ベクターに組み込み parent 細胞や non-SP 細胞に形質導入し過剰発現細胞を作製後、その細胞特性の変化を観察する。また、SP 細胞にはその siRNA を形質導入し、変化を検討する。

5) 3. 4) で変化をきたした細胞内で作用するシグナル経路を同定する。

運動能亢進のメカニズムの解析

6) 足突起形成や運動能亢進に関与が報告されている Rho, Rac の野生型、活性化型、dominant negative 型のそれぞれの cDNA を哺乳類発現ベクターに組み込み子宮体癌細胞株に形質導入し、上記細胞特性の変化 (特に幹細胞特性への影響) を比較し、Rho, Rac の機能が関与するかを検討する。

転移能獲得機構の解明:

癌幹細胞との関与が明らかになった EMT 関連遺伝子を導入した子宮体癌細胞の細胞特性を解析するとともに、マウスへ移植し、浸潤・転移能亢進の有無を in vivo で検討する。

1) 幹細胞の特性に関与し有意に運動能を亢進させた因子を過剰発現する子宮体癌細胞株を樹立し、マウスに移植し転移能を解析する。

2) 機能や発現を阻害する薬剤、中和抗体があれば、それを投与し転移能が抑制されるかを検討し、新規治療薬の候補とする。

臨床検体の解析：

臨床検体の組織切片を用いて、免疫組織染色により関与が明らかになった EMT 関連因子の発現を解析し、統計解析により組織型・組織分化度・進行期・再発の有無・予後との関連を検討する。

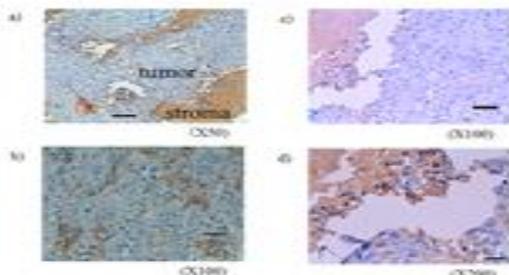
1) 同意が得られた患者の臨床検体の組織切片を用いて、転移能に関与する EMT 関連蛋白の発現を免疫組織染色法にて解析する。

2) 統計解析により上記蛋白発現レベルと組織型・組織分化度・進行期・再発の有無・予後との関連を検討し、再発・転移の予測マーカーを同定する。

#### 4. 研究成果

子宮体癌幹細胞に発現が増加している遺伝子群の中から SPARC (secreted protein acidic and rich in cystein) を選択しその性質を解析した。1) 造腫瘍能を持つラット子宮内膜細胞 RK12V 細胞の side population (SP) 細胞を用いて発現が亢進している遺伝子群をマイクロアレイでスクリーニングし、細胞基質蛋白 SPARC を同定した。2) ノードマウス皮下の子宮体癌細胞株 Hec1-SP 細胞由来腫瘍における SPARC の発現を免疫染色法で解析した。3) SPARC 発現ベクターを作製し、子宮体癌細胞株 Ishikawa (IK) に形質導入し IK-SPARC 細胞を樹立し、SP 出現率・細胞増殖能・造腫瘍能とともに、wound assay や transwell assay により遊走能を解析し、mock 細胞と比較検討した。4) インフォームドコンセントを得て採取された正常子宮内膜・子宮体癌組織(類内膜腺癌)における SPARC の発現を免疫染色法で解析した。【成績】1) 癌幹細胞の性質を示す RK12V-SP 細胞, Hec1-SP 細胞において SPARC の発現が non-SP 細胞に比べて亢進していた。2) SPARC は Hec1-SP 由来腫瘍の間質および間質に接する腫瘍細胞に高発現していた。(図 1)

(図 1)

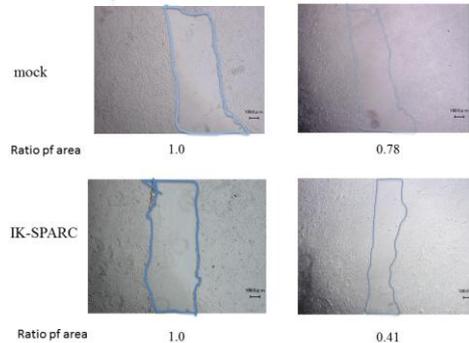


3) IK-SPARC 細胞は mock 細胞に比べ SP 出現率・細胞増殖能に変化はなく造腫瘍能は抑制された。遊走能は有意に亢進した。

(図 2)

(図 2)

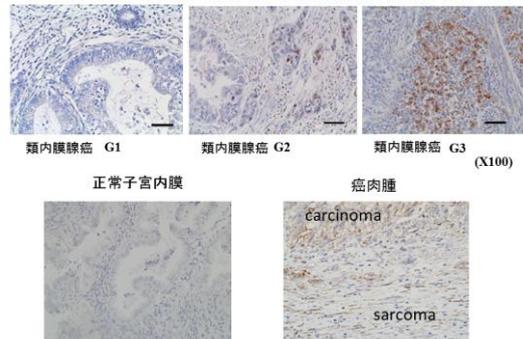
IK-SPARC細胞はmock細胞に比べ、遊走能は有意に亢進した。  
In vitro scratch assay



4) SPARC は正常子宮内膜では発現をみとめず、子宮体癌組織で発現しており特に低分化腺癌で発現が高かった。(図 3)

(図 3)

SPARCは正常子宮内膜では発現をみとめず、  
子宮体癌組織で発現しており特に低分化腺癌で発現が高かった。



【結論】細胞基質蛋白 SPARC は 1) 子宮体癌幹細胞に発現が亢進し、腫瘍間質形成に関与する。2) 子宮体癌細胞の遊走能を亢進する。以上より SPARC は子宮体癌の微小環境や間質への分化、転移に関与することが示唆された。

#### 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)

[学会発表] (計 1 件)

細胞基質蛋白 SPARC(secreted protein acidic and rich in cystein)は子宮体癌細胞の遊走能を亢進する

ヌルスマングリ・ユスブ, 加藤 聖子, 寺尾 泰久 第 64 回日本産科婦人科学会学術集会 2012 年 4 月 神戸

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

寺尾泰久 (YASUHISA TERA0)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：348997

### (2) 研究分担者

加藤聖子 (KATO KIYOKO)  
順天堂大学・医学部・准教授  
九州大学・医学部・教授  
研究者番号：10253527