

## 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：	34401
研究種目：	挑戦的萌芽研究
研究期間：	2010～2012
課題番号：	22659303
研究課題名（和文）	高分子ミセルを用いた卵巢癌の癌幹細胞に対する標的治療の開発
研究課題名（英文）	Developing of polymeric micelle for molecular targeting to cancer stem cells in ovarian cancer patients.
研究代表者	
	大道 正英 (Ohmichi Masahide)
	大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：	10283764

### 研究成果の概要（和文）：

近年上皮性卵巢癌の予後不良因子になるという報告がなされた膜型のエストロゲン受容体 GPR30 に着目した。GPR30 強制発現により、卵巢癌細胞株は EMT を起こし、アゴニストである G1 を添加したところ、EGFR-Akt 経路の活性化、細胞増殖能の増加が認められた。さらに、EMT の表面マーカーとして乳癌、膵臓癌で注目されている CD24 にも着目した。CD24 陽性卵巢癌細胞は EMT 特異的表現型を示しており、cisplatin 耐性であった。以上の基礎的検討をもとに、GPR30 または CD24 を外郭にもつ高分子ミセルを作成し、マウスモデルに投与し、腫瘍選択性、副作用について検討中である。

### 研究成果の概要（英文）：

The epithelial-mesenchymal-transition (EMT) is an important step in the invasion and metastasis of cancer cells. EMT is an important step in the invasion and metastasis of cancer. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) is a 7-transmembrane estrogen receptor that functions alongside traditional estrogen receptors to regulate the cellular responses to estrogen. Current study suggested that the expression of both GPR30 and EGFR is associated with a poor outcome in ovarian cancer, and GPR30 increases the phosphorylation of Akt via the EGFR in ovarian cancer cells. The regulation of GPR30 might be a potentially useful new therapeutic target in ovarian cancer. Furthermore, Recently CD24 has been considered as a prognostic maker in various cancers. So we analyzed the prognostic impact of the CD24 expression in ovarian cancer by immunostaining. The CD24 expression was significantly associated with FIGO stage, lymph node metastasis and peritoneal metastasis. The in vitro examination showed that high expression level of CD24 is significantly associated with EMT positivity. In addition, the CD24 overexpression increased invasiveness, and knockdown of CD24 suppressed cell invasion. In conclusion CD24 expression in ovarian cancer may be related to tumor invasion and migration. Based on the results, the anti-cancer agent incorporated polymeric micelles, which have anti-GPR30 or anti-CD24 antibodies in their outer layer, are in development

### 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	0	1,600,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
総計	2,900,000	390,000	3,290,000

研究分野：医歯薬学

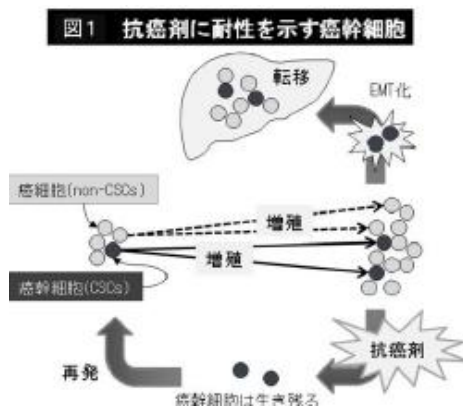
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：

CD24, 婦人科悪性腫瘍、上皮間葉形質転換、EMT, 高分子ミセル、抗癌剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

① 卵巣癌は生存率が最も低い婦人科癌である。その理由として、当初抗がん剤に感受性を示していても次第に耐性を示す場合が多いことが考えられる。ことに、転移病巣や再発病巣は多くの場合 **key drug** である白金製剤に対する耐性を示すため、卵巣癌治療においては白金製剤耐性化を凌駕し、卵巣癌の特徴的な進展様式である腹膜播種転移を制御することが可能となれば、難治性卵巣癌の新たな治療戦略と成り得る。近年、癌幹細胞 (CSCs: Cancer Stem Cells) が注目されている (図 1)。



CSCs の腫瘍内での存在比率は数% と考えられており、腫瘍の大部分は CSCs が生み出した非癌幹細胞(non CSCs)と考えられる。CSCs は non CSCs と比較して、強い自己複製能と腫瘍形成能を有することが明らかになってきており、様々な抗がん剤や放射線療法に抵抗を示し、癌再発の原因細胞であると考えられている。一方、癌細胞の転移浸潤過程において、細胞間接着や細胞極性を失い間葉系細胞に変化し、間質内へ浸潤し転移する現象として上皮間葉形態転換 (EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition) も注目されている。過去の報告から、CSCs が浸潤転移する過程において EMT の現象を起こしているとし、両者の関連を示唆している。

## 2. 研究の目的

CSCs もしくは EMT の表現マーカーを明らかにし、それらを標的とした **drug delivery system** を構築し、難治性癌治療へ向けた基

礎的・臨床的検討を本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

① 162 例の卵巣癌患者の病理組織標本を用い、組織マイクロアレイを作成したのち、抗 GPR30 抗体と抗 EGFR 抗体で免疫染色し、染色強度と予後との相関を検討した。

② 卵巣癌細胞株 Caov-3 に GPR30 expression vector を遺伝子導入し GPR30 を強制発現させ、GPR30 の選択的 agonist G1 および選択的 antagonist G15 を添加し、細胞増殖に対する影響を MTS assay で検討した。

③ Caov-3 に GPR30 を強制発現させ、EGFR -Src-Akt cascade の関与を Western blotting 法で検討した。

④ 卵巣癌細胞株 A2780 に GPR30 を強制発現させ、細胞形態の変化を顕微鏡で確認し、EMT マーカーの発現変化を PCR で検討した。

⑤ 200 例の卵巣癌患者の病理組織標本を用い、組織マイクロアレイを作成したのち、抗 CD24 抗体で免疫染色し、予後の関係を検討した。また、E-cadherin 抗体、Snail 抗体でも免疫染色し、E-cadherin 弱発現、Snail 強発現をもって EMT 陽性と判断し、CD24 発現との関連を精査した。

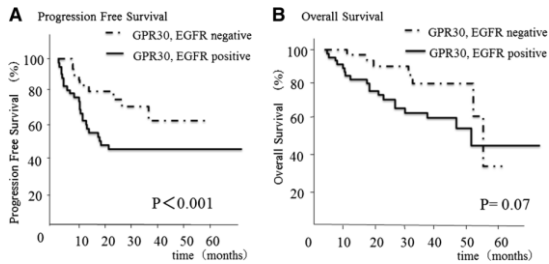
⑥ 卵巣癌細胞株 Caov-3 を用い、CD24 の強制発現による EMT への影響を 3D 培養による形態学的変化 で評価した。

⑦ CD24 強制発現により EMT 化し、浸潤能が增强するか否かを invasion assay で評価した。

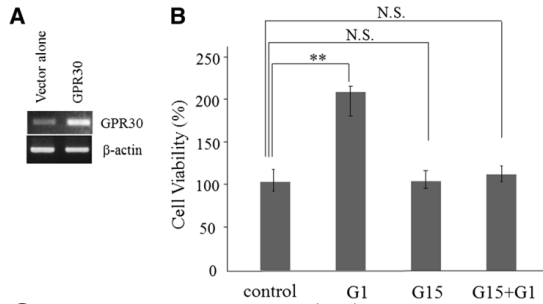
⑧ Caov-3 を CD24 抗体で sorting し、CD24 陰性細胞と CD24 陽性細胞とに分離したのち、CD24 陽性細胞が抗癌剤耐性を有する癌幹細胞様の特性を有しているか否かを検討するために、cisplatin に対する感受性を MTS assay で評価した。

## 4. 研究成果

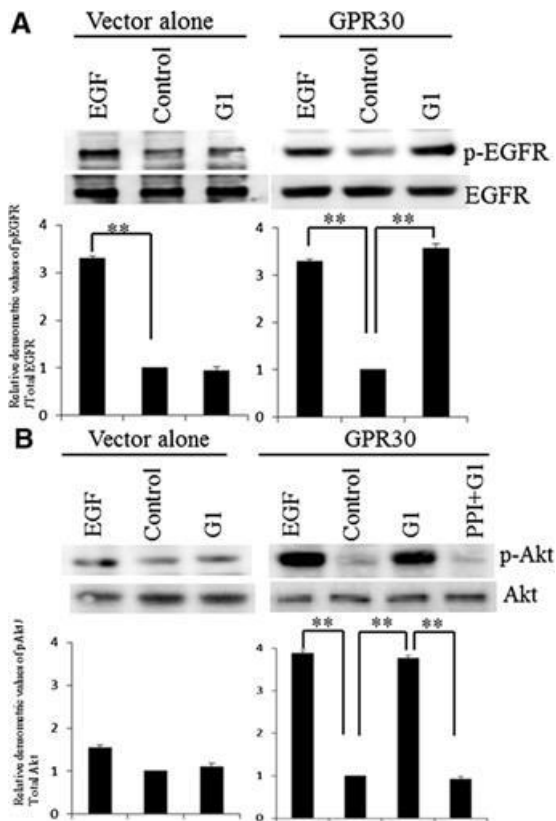
① 卵巣癌において GPR30 と EGFR の強発現は予後不良因子である。



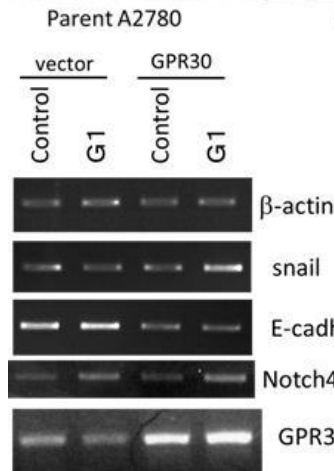
② 卵巣癌細胞株 Caov-3 に GPR30 の選択的 agonist G1 を添加すると増殖能が増強する。



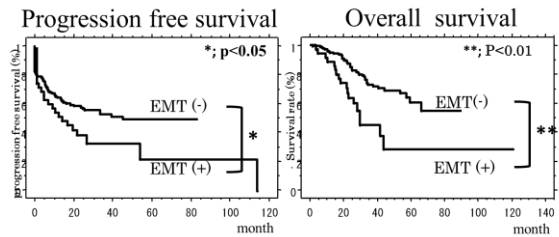
③ GPR30 は EGFR-Src-Akt 経路を活性化する。



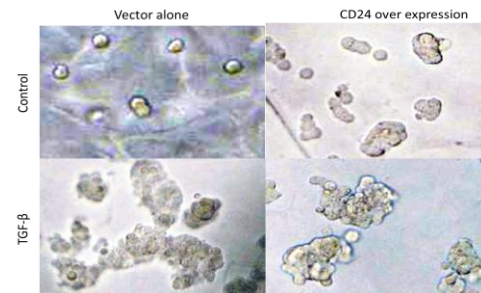
④ 卵巣癌細胞株 A2780 に GPR30 を強制発現させると EMT 化し spheroid 様形態を示した。また、GPR30 強制発現や G1 の添加により snail-mRNA の増加と E-cadherin の減少、さらには幹細胞マーカーとして考えられている Notch4 の増強を認めた。



⑤ 卵巣癌において、CD24 強発現は予後不良因子である。無病生存期間 (p < 0.01) も、全生存期間 (p < 0.05) も CD24 強発現群において予後不良であった。また、E-cadherin 弱発現、Snail 強発現を EMT 陽性とし、CD24 発現強度と比較したところ、CD24 強発現は EMT 陽性に関連することが明らかとなった。



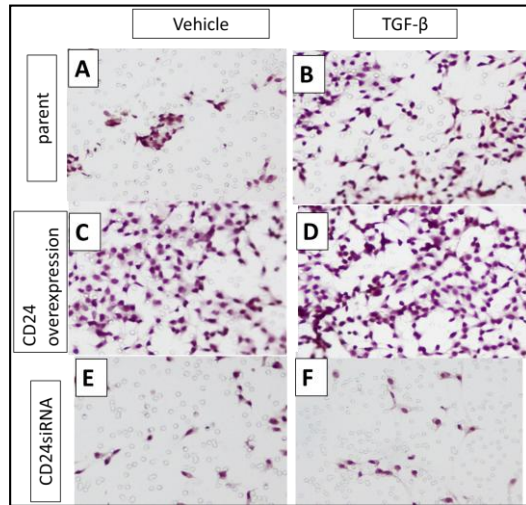
Variables	CD24		P-value
	Low (%)	High (%)	
EMT			0.003
Positive	4 (11.6)	32 (88.4)	
Negative	66 (40.6)	98 (59.4)	



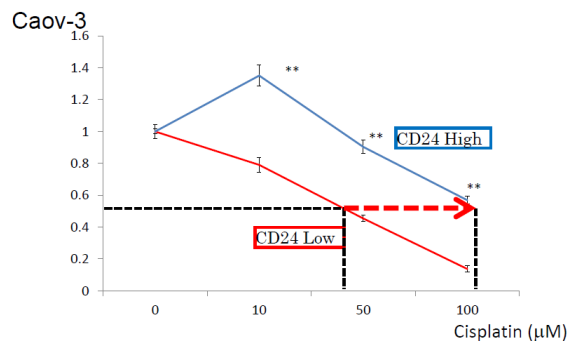
⑥ 卵巣癌細胞株 Caov-3 に vector もしくは CD24 expression vector を強制発現させ 3D 培養したところ、CD24 強発現のみで spheroid

形成が亢進した

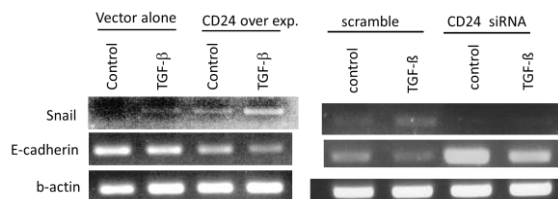
⑦Caov-3 に CD24 を強制発現させると、浸潤能が亢進し、siRNA で CD24 を knockdown すると浸潤能を喪失した。



⑧Caov-3 の CD24 陽性分画は cisplatin 耐性、CD24 陰性分画は cisplatin 感受性を有した。



⑨CD24 が EMT 関連遺伝子に及ぼす影響を確認するため、PCR で諸因子の発現を検討したところ、CD24 の強発現で E-cadherin 減弱 Snail 増強、反対に siRNA-CD24 で knockdown すると E-cadherin 増強、Snail 減弱することが分かった。



以上より、卵巣癌において CD24 を molecular target することにより、EMT 制御、抗癌剤耐性化制御ができる可能性があると考え、現在抗 CD24 抗体を外郭にもつ cisplatin 内包リポゾームを作成し、卵巣癌モデルマウスに投与し、腫瘍選択性、薬剤耐性化に対する影響、組織特異性、副作用について検討中である。

## 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 2 件)

①Tanaka Y, Terai Y (分担), Kawaguchi H, Fujiwara S, Yoo S, Tsunetoh S, Takai M, Kanemura M (分担), Tanabe A (分担), Ohmichi M (代表).

Prognostic impact of EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression in endometrial cancer. *Cancer Biology and Therapy* 14(1): 13-19, 2013

②Fujiwara S, Terai Y (分担), Kawaguchi H, Takai M, Yoo S, Tanaka Y, Tanaka T, Tsunetoh S, Sasaki H (分担), Kanemura M (分担), Tanabe A (分担), Ohmichi M (代表)

GPR30 regulates the EGFR-Akt cascade and predicts lower survival in patients with ovarian cancer.

*Journal of Ovarian Research* 5(1): 35-44, 2012

[学会発表] (計 9 件)

①寺井義人

婦人科癌の浸潤転移における EMT (Epithelial Mesenchymal Transition) の意義と EMT 制御をターゲットとした新規治療の基礎的研究

第 53 回日本婦人科腫瘍学会 (招待講演) (岡山) 2012/11/23

②高井雅聡

卵巣癌の播種転移は EMT 現象を反映する

第 50 回日本癌治療学会 (横浜) 2012/10/25

③高井雅聡

卵巣癌における EMT 現象の指標となる E-cadherin, snail, slug の発現意義

第 64 回日本産婦人科学会学術講演会 (神戸) 2012/10/01

④川口浩史

白金製剤耐性卵巣癌における Akt をターゲットとした分子標的薬としての Gemcitabine の機能解析

第 64 回日本産婦人科学会 (神戸) 2012/10/01

⑤川口浩史

白金製剤耐性卵巣癌における Akt をターゲットとした分子標的薬としての Gemcitabine の

機能解析  
第 52 回日本婦人科腫瘍学会 (東京)  
2012/07/19

⑥藤原聡枝  
卵巣癌におけるエストロゲン受容体 GPR30 の  
上皮間葉転換 (EMT) への関与  
第 52 回日本婦人科腫瘍学会 (東京)  
2012/07/19

⑦藤原聡枝  
卵巣癌における GPR30 の免疫組織学的検討  
第 48 回日本癌治療学会学術集会 (京都)  
2010/10/28

⑧藤原聡枝  
卵巣癌における GPR30 の免疫組織学的検討  
第 62 回日本産婦人科学会学術講演会 (東京)  
2010/04/23

⑨田中良道  
卵巣癌における EGFR 遺伝子変異とその下流  
シグナル分子の発現解析  
第 62 回日本産婦人科学会学術講演会 (東京)  
2010/04/23

[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]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大道 正英 (Ohmichi Masahide)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10283764

### (2) 研究分担者

寺井 義人 (Terai Yoshito)  
大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90278531

田辺 晃子 (Tanabe Akiko)  
大阪医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70454543

金村 昌徳 (Kanemura Masanori)  
大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40298782

佐々木 浩 (Sasaki Hiroshi)  
大阪医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80432491