

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592452

研究課題名(和文)カルボニールレダクターゼの機能解析—新たな機序による分子標的治療の開発に向けて—

研究課題名(英文)Analysis of carbonyl reductase function -development of the new molecular target therapy-

研究代表者

村上 明弘(MURAKAMI, Akihiro)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70379965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：【研究成果】子宮体癌細胞でCBRの発現抑制によって上皮間葉転換が誘導された。また、in vitroおよびin vivoにおいてもCBRの発現抑制によって腫瘍の増殖および腫瘍形成は有意に増大した。反対にCBRの過剰発現においては腫瘍の形成は有意に抑制されていた。

【意義・重要性】in vitro 実験において子宮体癌細胞でCBRの発現を増加させることによって、癌細胞の浸潤能を抑制した結果は画期的である。本研究の結果より CBRを標的分子としてEMTを抑制し、癌の浸潤・転移の抑制、腫瘍増殖抑制を目的とした新規の分子標的治療の開発に結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Suppression of CBR1 promoted cell proliferation, cell invasion activities, and induced epithelial mesenchymal transition (EMT) in vitro. The tumor volume and weight in CBR1 suppression group were large compared with those in the control group in vivo. The numbers of tumor associated macrophages (TAMs) in stromal tissues was high compared with those in the control group. Therefore, suppression of CBR1 promotes cell invasion activities in vitro by induction of EMT process and cell proliferation activities in vitro and in vivo. Furthermore, suppression of CBR1 may suppress anti-tumor effect and promote pro-tumor effect on TAM. Over-expression of CBR1 has a possibility to be a new molecular target therapy for endometrial cancers.

研究分野：産婦人科

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：carbonyl reductase 上皮間葉転換 子宮体癌

## 1. 研究開始当初の背景

当教室で発見した扁平上皮癌の腫瘍マーカーである SCC 抗原は、扁平上皮癌患者の病状管理において臨床的に広く用いられている。これまで、我々は SCC 抗原の生物活性を報告してきた。前科学研究費補助金によって癌細胞内における SCC 抗原の分子作用を明らかにするために、その細胞内結合分子を検索した。その結果、プロテオーム解析によって SCC 抗原の結合分子として carbonyl reductase (CBR) を明らかにした (Murakami et al. *Int J Oncol*, 2010)。また、CBR と E-カドヘリンとの間に発現態度に強い相関があることも明らかにしている。さらにケラチノサイトと比較し、6 種類の子宮頸部扁平上皮癌培養細胞で CBR の発現が低下していた。以上より CBR の発現低下は癌の浸潤・転移、悪性化に重要な役割を果たしていることが想像される (Murakami et al. *Int J Oncol*, 2010)。ヒト子宮頸部扁平上皮癌 I、II 期の 67 症例の原発巣の組織を用いた CBR の免疫組織染色を行い、細胞内局在と発現強度をもとにした染色パターンの決定とその発現態度を解析した。具体的には、Shiozaki et al. (*Am J Pathol* 139: 17-23, 1991) の分類に従い、(1) 癌細胞すべてが正常上皮と同程度に染色されるパターン (strong pattern)、(2) 癌細胞すべてが一様に染色されているものの発現程度は正常上皮よりも弱いパターン (weak and homogenous pattern)、(3) 正常上皮と同程度の染色性を示す癌細胞と染色性が失われている癌細胞の両者が混在しているパターン (heterogenous pattern) の計 3 パターンに大別できた。この発現パターンをもとにして骨盤リンパ節への転移との関連性、さらに予後 (無進行生存・全生存) との関連性について統計学的に解析した。その結果、CBR の heterogenous pattern および weak and homogenous pattern、つまり CBR の発現が低下している症例は骨盤リンパ節

転移が有意に多く、さらに strong pattern と比較して 2 種類の CBR の発現低下パターンは有意に予後不良であった (村上 明弘 扁平上皮癌の予後判定方法 特許 4967128)。最近、癌細胞が転移する際のメカニズムとして上皮間葉転換 (EMT) が盛んに議論されており、癌の浸潤・転移の初期段階に E-カドヘリンの発現低下は必須の現象である。CBR の発現低下も E-カドヘリンと同様に EMT に関与する分子であることが強く推測される。現在、CBR の機能解析が進行しているが、CBR の発現低下は PGE2 の発現亢進を誘導することが明らかとなった (村上 明弘未発表データ)。PGE2 は MMP の分泌を増加させ、E-カドヘリンの発現を抑制し、癌の浸潤・転移に促進的に作用している。また、宿主の免疫能の抑制やアポトーシスの抑制によって腫瘍増殖能を促進させる作用もある。子宮体癌組織において PGE2 が増加することは報告されており、PGE2 の増加、つまり CBR の発現低下は子宮体癌の浸潤・転移や腫瘍増殖能を亢進させて、予後不良となることが予想される。実際、子宮体癌 109 例 (I 期 79 例、II 期 4 例、III 期 22 例、IV 期 4 例、組織型は全て類内膜腺癌) の原発巣における CBR の発現態度を染色強度 (high +3、moderate +2、weak +1、negative +0) と染色陽性細胞の割合 (50%以上 +1、50%未満 +1、0% +0) の合計によりスコア化した。スコアが 0・1 点を CBR 陰性、2・3 点を CBR 弱陽性、4・5 点を CBR 強陽性として分類し、スコアと病理学的予後不良因子および予後との関係を統計学的に解析した。CBR の発現スコアが低い症例、つまり発現低下症例は予後不良の転帰を示した (村上 明弘 子宮体部類内膜腺癌の予後判定法 特願 2010-149369)。特異的な腫瘍マーカーがない子宮体癌において CBR は新たな予後予測マーカーとなり、さらに CBR が EMT に関与するという可能性を解明することは、新たな機序による分子標的

治療法に発展する可能性があり、将来のテーラーメイド医療にも発展する可能性が大いに考えられ、非常に意義深いものと思われる。

## 2. 研究の目的

現在、子宮体癌は罹患者及び死亡者が急速に増加しており、初期癌の治療は確立しているが、進行・再発子宮体癌の予後は不良で、その対策が急務である。我々の子宮体癌における研究では、CBRの発現が低下している症例は有意に予後不良であった（村上 明弘 子宮体部類内膜腺癌の予後判定法 特開2012-13504）。最近、癌の浸潤・転移や予後不良となるメカニズムとして、EMTが盛んに議論されている。そこで、子宮体癌において

- (1) *in vitro*でCBRの強発現および発現抑制による細胞機能（細胞増殖能、細胞浸潤能や細胞移動能等）を検討する。
- (2) ヒト子宮体癌組織でCBRの発現低下が臨床的に予後不良となる分子メカニズムを解析する。
- (3) *in vivo*でCBRを過剰発現させることによる癌細胞の増殖能・転移能の抑制を検討し、新たな分子標的治療への応用を検討する。

## 3. 研究の方法

CBRの発現が認められないことを確認した子宮体癌細胞 SNGM に CBR の sense および antisense cDNA を遺伝子導入し、CBRの発現増加クローン（SNGM-S）および発現抑制クローン（SNGM-AS）を確立した。さらに、コントロールとして空ベクターを遺伝子導入した。これらの細胞を以下の実験に用いた。

I. *in vitro*で CBR の発現が細胞機能に及ぼす影響、さらに癌の浸潤・転移および悪性度に関するメカニズム、特に EMT の関与について検討した。

- (1) 細胞増殖能を MTT assay で検討した。
- (2) 接着条件下培養や三次元培養によって細胞形態の変化を観察した。
- (3) 細胞機能として、癌細胞の浸潤および転

移能を以下の項目で評価した。

- ① 細胞浸潤能：invasion assay
- ② 細胞移動能：scratch assay
- ③ matrix metalloproteinase (MMP) 分泌：gelatin zymography

(4) CBRの発現低下が EMTを誘導するか、以下の項目で検討した。

① E-cadherin の発現と E-cadherin の転写抑制因子である Snail、ZEB1 の発現を評価した。

② CBR の遺伝子導入細胞における上皮マーカー、間葉マーカーの発現を評価した。

II. 腫瘍形成能における CBR の関与を *in vivo* 実験で検討した。

CBR の発現亢進および抑制した子宮体癌細胞  $5 \times 10^6$  個をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍形成の変化を観察した。8週間後に autopsy し、腫瘍を摘出した。腫瘍体積、腫瘍内における CBR の発現、EMT 関連分子の発現、およびマクロファージの腫瘍内への侵入を検討した。

## 4. 研究成果

子宮体癌におけるCBR1の役割を明らかにするため、遺伝子導入実験によりCBR1の過剰発現（SNGM-S）および発現抑制（SNGM-AS）した細胞クローンを作成し（図1）、以下の実験を行った。

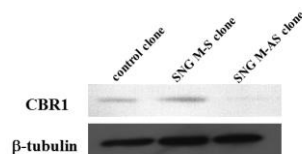


図1 子宮体癌細胞SNGMにセンスおよびアンチセンス CBR1 cDNAを遺伝子導入した

## I. *in vitro*実験

(1) 細胞形態の変化

コントロールと比較して、SNGM-Sでは敷石状の細胞形態に変化し、SNGM-ASでは線維芽細胞様の形態に変化した（図2）。

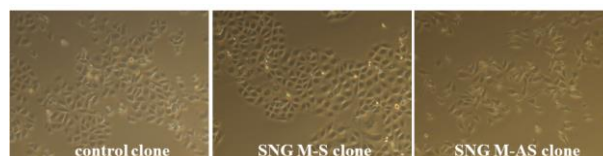


図2 センスおよびアンチセンス CBR1 cDNAの遺伝子導入による細胞形態の変化

(2) 細胞浸潤能および MMP の分泌

SNGM-AS では細胞浸潤能が有意に亢進し、MMP の分泌も亢進していた。反対に SNGM-S では細胞浸潤能は有意に低下し、MMP の分泌も低下していた (図 3)。

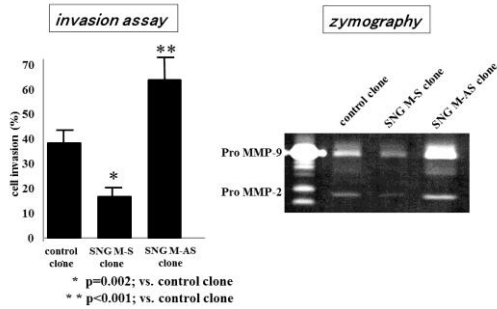


図3 CBR1 の発現が細胞浸潤能および MMP 分泌に及ぼす影響

(3) E-cadherin の発現とその転写抑制因子の発現

SNGM-AS では E-cadherin の発現は抑制され、その転写抑制因子である Snail および ZEB1 の発現は亢進していた。反対に SNGM-S では E-cadherin の発現は亢進し、Snail および ZEB1 の発現は低下していた (図 4)。

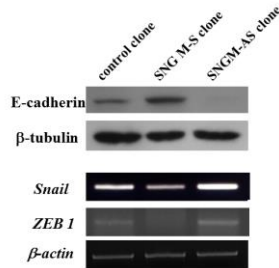


図4 CBR1 の発現が E-cadherin とその転写抑制 因子の発現に及ぼす影響

(4) 上皮マーカーおよび間葉マーカーの発現

SNGM-AS では上皮マーカーである cytokeratin 18 の発現は抑制され、間葉マーカーである fibronectin および  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$  SMA) の発現は亢進していた。反対に SNGM-S では cytokeratin 18 の発現は亢進し、fibronectin および  $\alpha$  SMA の発現は低下していた (図 5)。

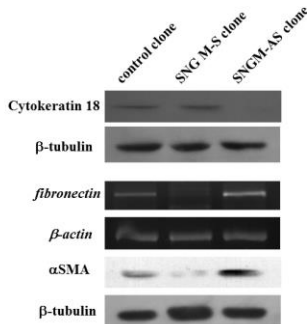


図5 CBR1 の発現が上皮マーカーおよび間葉マーカーの発現に及ぼす影響

以上より、CBR1 の発現低下は EMT を誘導することが明らかとなった。

II. *in vivo* 実験

(1) 上記遺伝子導入した子宮体癌培養細胞をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍の形

成を観察する。

CBR1 の発現を増加 (SNGM-S) あるいは抑制した (SNGM-AS) 子宮体癌細胞  $5 \times 10^6$  個をヌードマウスの右側腹部に移植し、8 週間飼育して腫瘍体積を経時的に観察した。コントロールと比較して SNGM-AS で腫瘍体積は有意に増大するが、一方 SNGM-S では腫瘍体積の増加は有意に抑制されていた (図 6)。

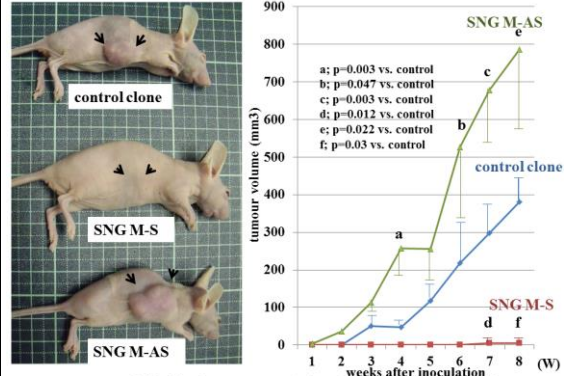


図6 子宮体癌細胞 SNGM の腫瘍形成における CBR1 の影響

(2) 形成腫瘍の評価

① 形成腫瘍で EMT のメカニズムが保たれているか確認する。

移植後 8 週間時に摘出した腫瘍において、E-cadherin とその転写抑制因子である Snail および間葉マーカーである  $\alpha$  SMA の発現を免疫組織染色で確認した。SNGM-AS では E-cadherin の発現低下と Snail および  $\alpha$  SMA の発現亢進が確認され、移植後 8 週間経過した時でも EMT が維持されていることが分かった。反対に、SNGM-S では E-cadherin の発現上昇と Snail および  $\alpha$  SMA の発現低下が確認された (図 7)。

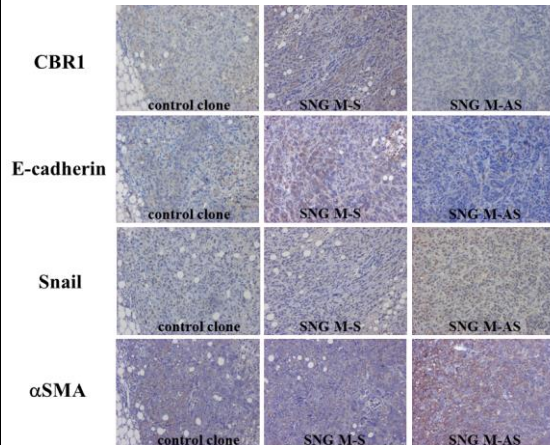


図7 摘出組織における CBR1 と EMT 関連マーカーの発現

(3) 腫瘍に誘導される免疫担当細胞を評価する。

最近、腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage: TAM) は癌細胞との細胞間相互作用より直接的に腫瘍細胞の増殖を促進するとともに、抗腫瘍免疫の抑制や血管新生の誘導などによって間接的に腫瘍増殖



に促進的に作用して、癌細胞に都合の良い微小環境を提供するものと考えられている。また、種々の癌で TAM が多い症例ほど生存率が低く、TAM が腫瘍の増殖や転移に促進的に作用していると考えられている。今回、形成腫瘍の間質に誘導される TAM について検討した。その結果、コントロールと比較して、SNGM-ASによって形成される腫瘍の間質に誘導されるTAMは有意に多かった(図8)。

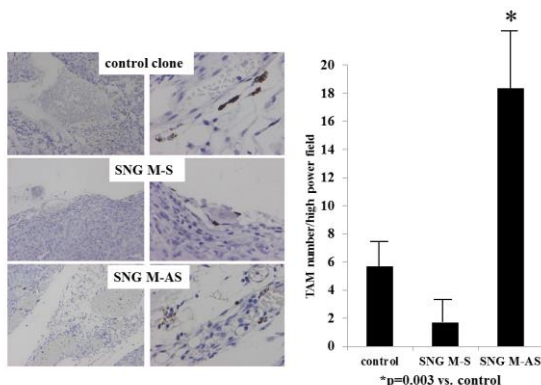


図8 CBRI の発現が腫瘍関連マクロファージ(TAM)の腫瘍間質への誘導に及ぼす影響

#### 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. Yoshidomi K, Murakami A, Yakabe K, Sueoka K, Nawata S, Sugino N Heat shock protein 70 is involved in malignant behaviors and chemosensitivities to cisplatin in cervical squamous cell carcinoma cells. J Obstet Gynecol Res 40: 1188-1196, 2014 査読有
2. Murakami A, Yakabe K, Yoshidomi K, Sueoka K, Nawata S, Yokoyama Y, Tsuchida S, Al-Mulla F, Sugino N: Decreased carbonyl reductase 1 expression promotes malignant behaviours by induction of epithelial mesenchymal transition and its clinical significance. Cancer Lett 323: 69-76, 2012 査読有

3. Murakami A, Yoshidomi K, Sugino N Involvement of squamous cell carcinoma antigen in invasion and metastasis of squamous cell carcinoma of uterine cervix. InTech Open Access Publisher 9: 153-160, 2012 査読有
4. Murakami A, Fukushima C, Yoshidomi K, Sueoka K, Nawata S, Yokoyama Y, Tsuchida S, Ismail E, Al-Mulla F, Sugino N: Suppression of carbonyl reductase expression enhances malignant behavior in uterine squamous cell carcinoma: Carbonyl reductase predicts prognosis and lymph node metastasis. Cancer Lett 311: 77-84, 2011 査読有
5. Fukushima C, Murakami A, Yoshidomi K, Sueoka K, Nawata S, Nakamura K, Sugino N: Comparative proteomic profiling in squamous cell carcinoma of uterine cervix. Proteomics Clin. Appli. 5: 133-140, 2011 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 村上 明弘 子宮頸癌における carbonyl reductase の低下が予後不良となるメカニズムの解明(第 54 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 2013 年 7 月 19 日-21 日、ホテルグランパシフィック LE DAIBA、東京都)
- ② 村上 明弘 子宮頸癌における carbonyl reductase の低下が予後不良となるメカニズムの解明(第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会 2013 年 5 月 10 日-12 日、ロイトン札幌、札幌市)
- ③ 村上 明弘 carbonyl reductase1 の発現低下が予後不良となるメカニズムの解明-新たな機序による分子標的治療の確立に向けて-(第 50 回日本癌治療学会学術講演会、2012 年 10 月 25 日-27 日、パシフィコ横浜、横浜市)
- ④ Akihiro MURAKAMI Suppression of carbonyl reductase 1 promotes tumorigenesis and tumor-associated macrophage migration by induction of epithelial mesenchymal transition. (第 14 回国際婦人科腫瘍学会、2012 年 Oct.13-16、カナダ・バンクーバー)
- ⑤ 村上 明弘 子宮体癌において carbonyl reductase の低下が予後不良となる機序の解明(第 65 回中国四国産科婦人科学会総会、

2012年9月22日-23日、ビックハート出雲、出雲市)

⑥**村上 明弘** 子宮体癌において carbonyl reductase の低下が予後不良となる機序の解明(第 52 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会、2012年7月19日-21日、グランドプリンスホテル新高輪、東京都)

⑦**村上 明弘** 子宮体癌における carbonyl reductase の発現低下が予後不良となるメカニズムの解明(第64回日本産科婦人科学会学術講演会、2012年4月13日-15日、神戸ポートピアホテル、神戸市)

⑧**村上 明弘** 子宮体癌における carbonyl reductase (CR)の機能解析と臨床的意義(第49回日本癌治療学会学術講演会、2011年10月27日-29日、名古屋国際会議場、名古屋市)

⑨**Akihiro MURAKAMI** Decreased expression of carbonyl reductase is a significant predictor of outcome in uterine endometrial cancer and induces epithelial mesenchymal transition. (第39回 International Society of Oncology and Biomarker Meeting、2011年 Oct.14-19 イタリア・フィレンツェ)

⑩**村上 明弘** 子宮体癌における carbonyl reductase の機能解析と臨床的意義の解明(第63回日本産科婦人科学会学術講演会、2011年8月29日-31日、リーガロイヤルホテル大阪、大阪市)

⑪**村上 明弘** 子宮体癌における carbonyl reductase (CR)の機能解析と臨床的意義(第50回日本婦人科腫瘍学会学術講演会、2011年7月22日-24日、札幌コンベンションセンター、札幌市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：子宮体部類内膜腺癌の予後判定法

発明者：**村上明弘**、杉野法広

権利者：国立大学法人 山口大学

種類：特開

番号：2012-13504

出願年月日：2012年1月19日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：扁平上皮癌の予後判定方法

発明者：**村上明弘**、杉野法広

権利者：国立大学法人 山口大学

種類：特許

番号：特許第 4967128

取得年月日：2012年4月13日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 明弘 (MURAKAMI, Akihiro)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70379965