

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592521

研究課題名(和文) 上皮性卵巣癌における局所的エストロゲン活性調節機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of regulatory mechanism of estrogen in epithelial ovarian cancer

研究代表者

本原 研一 (Motohara, Ken-ichi)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：50573606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、卵巣表層上皮(ovarian surface epithelium: OSE)に存在する正常幹細胞の存在がマウス実験で示されており、近年急速にその知見が集積されている。そこで、われわれが樹立した不死化OSE細胞株およびそれらを腫瘍化させた細胞株を用いて、in vitroで詳細な解析を行った結果、それぞれの細胞株に幹細胞としての特性を有する細胞集団が存在することが明らかとなった。さらに、それらの細胞分画は、様々な幹細胞関連遺伝子を発現していることが示された。今後、17 β -HSDを含めた様々な遺伝子解析を計画している。

研究成果の概要(英文)：Human ovarian surface epithelium (OSE) is thought to be the origin of most of human ovarian carcinomas. Recent evidence suggests that normal ovarian epithelial stem cells exist in OSE in some mouse models. Here we show that the established immortalized OSE cell lines and the transformed tumorigenic OSE cell lines contain epithelial stem-like cells. Furthermore, RT-PCR analysis demonstrated that these stem-like cell population express various stem cell-related genes. We next plan to check the 17 β -HSD expression in these stem-like cell population.

研究分野：産婦人科学

キーワード：卵巣表層上皮 卵巣癌 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

卵巣機能の首座は、卵胞の発育と排卵、そして内分泌機能が営まれる皮質にある。その中で、卵巣表層上皮 (ovarian surface epithelium: OSE) は、卵巣全体の 1% にも満たない卵巣を被覆する一層の細胞であるが、様々な受容体を発現し、種々の物質を生理的に産生していることが明らかとなってきた。この中でもエストロゲンは、様々な生理作用によって女性性機能発現において中心的な役割を果たし、いろいろな病態の発現や進展にも深く関与している。排卵の際に卵巣の表面には破綻が生じるが、そのたびに OSE をはじめとする細胞の局所的な増殖が起こり、修復がなされる。それらの修復の過程において、OSE の一部は卵巣実質の中に陥入して inclusion cyst を形成するが、この構造が卵巣癌 (Okamura H and Katabuchi H. *Int Rev Cytol* 242, 1-50, 2004) や卵巣子宮内膜症 (Ohtake H et al. *Fertil* 71, 50-55, 1999, Okamura H and Katabuchi H. *Ital J Anat Embryol* 106(2 Suppl 2), 263-276, 2001) の起源であることが推定されている。

1983 年に Auersperg *et al.* がラット OSE にエストロゲン受容体 (ER) の存在を報告し、OSE がエストロゲンの標的組織である可能性を示唆して以来、OSE における ER α 、ER β 、プロゲステロン受容体 (PR)、アンドロゲン受容体 (AR) の発現が報告され、OSE は *in vitro* および *in vivo* で性ステロイドによる細胞増殖あるいは apoptosis の調節を受けることが報告された。その一方で、顆粒膜細胞と同様に性ステロイドを産生し得ることが報告され、OSE は性ステロイドの局所的活性調節に関して双方向性作用を有する細胞であることが示されてきた。17 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (17 β -hydroxy steroid dehydrogenase: 17 β -HSD) は、アンドロステンジオンやエストロンの 17 位のケトン還元してテストステロン、エストラジオールに転換する、あるいはその逆の反応を触媒する酵素である。機能の異なる 17 β -HSD アイソザイムがそれぞれの反応を触媒しており、ヒトではこれまでに 14 種類のアイソザイムが報告されている。17 β -HSDs は、全身の様々な臓器に発現し、性ステロイドホルモンの末梢レベルでの活性調節を行う酵素として注目されている。最近になって、エストラジオールをより活性の低い性ステロイドであるエストロンに転換する酵素 17 β -HSD type 2 が正常子宮内膜、および子宮内膜癌に存在していることが報告され、細胞レベルでのエストロゲン不活性化機構の破綻が性ステロイドの標的臓器における腫瘍発生に関連している可能性が示された。これまでに OSE において 17 β -HSD type 1 が発現していることが報告されたが、OSE におけるエストロゲン不活性化型 17 β -HSD アイソザイムの存在については明らかではなかった

これまでのわれわれの研究の結果、従来諸臓器において重要な役割を果たしていると考えられてきた 17 β -HSD type 2 ではなく 17 β -HSD type 4 が OSE に発現しており、エストラジオールをエストロンに転換していることを見出した (Y. Nagayoshi, et al. *Mol Hum Reprod* 11: 615-621, 2005)。さらにわれわれは、エストロンをより生理活性の高いエストラジオールへ転換する 17 β -HSD type 1、およびエストラジオールをエストロンに転換する 17 β -HSD type 2, 4, 8 に着目し、各々のペプチド鎖を抗原としてポリクローナル抗体を作成することに成功した。これらの抗体を用い、ヒト OSE における免疫組織学的検討を行った結果、先に示した type 1, 4 の発現に加え、type 8 が発現していることを明らかにした。さらに、58 例の上皮性卵巣癌 (漿液性腺癌 45 例、粘液性腺癌 4 例、類内膜腺癌 4 例、明細胞腺癌 5 例) の検討では、その組織型に関わらず type 1 の発現率は低く、一方で、type 2, 4, 8 の発現が高い頻度で認められた。以上のことより、上皮性卵巣癌ではエストロン優位とする環境が形成され、正常 OSE の生理機能の変化が発癌に関わっている可能性が示唆された (K. Motohara, et al. *Med Mol Morphol*, 43: 197-203, 2010)。

2. 研究の目的

乳癌や子宮体癌の発生にエストロゲンが関与するという報告は数多くみられるが、卵巣癌の発生については未だ不明な点が多い。また、エストロゲンの OSE や卵巣癌における局所調節について検討した報告は散見されるのみである。今回の研究の目的は、OSE における 17 β -HSD アイソザイムの活性調節機構を解析することにより、細胞内でのエストロゲン活性の調節機構について検討し、卵巣における腫瘍発生について新たな知見を得ようとするものである。17 β -HSDs の選択的な基質親和性や細胞内局所における還元あるいは酸化活性、および 17 β -HSDs に特異的な組織分布を解明していくことが、上皮性卵巣癌を含む、ステロイドホルモン依存性の腫瘍や疾患に対する新規治療薬の開発につながる可能性がある。

3. 研究の方法

ヒト OSE および卵巣癌における 17 β -HSD type 1, type 2, type 4, type 8 の発現を調節する因子を検討する。卵巣癌患者を対象とし、臨床症状により細分化し、それらに対応した網羅的な遺伝子発現情報を検討する。17 β -HSD には 300 以上の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) が報告されている。SNPs は、17 β -HSD の酵素活性に影響を及ぼす可能性が考えられる。ポストゲノムサイエンスの一環として遺伝子多型解析が精力的に展開されているが、SNP は最も多様に富む遺伝子多型である。すなわち、活性の異なる 17 β -HSDs の SNPs の発掘・同定

を行うことで、局所的なエストロゲン活性の調節機構の個人差が解明され、テーラーメイド医療が可能となり、将来の臨床医療・予防医学の分野に大きな貢献をもたらすことが期待できる。*In vitro*の実験を行っていく上で、既に当教室では、独自に開発したscraping法によりヒト卵巣からOSEを分離・培養する技術を確立しており(Nakamura M, et al. *Virchows Archiv* 424: 59-67,1994)、さらに、この細胞を用いたhTERT導入ヒト不死化卵巣表層上皮細胞株を4種類樹立している(Maeda T, et al. *Br J Cancer* 93: 116-123, 2005, Sasaki R, *Carcinogenesis* 30: 423-431, 2009)。その中でも増殖性が良好で染色体安定性のあるhTERTとHPVE6およびHPVE7を導入した不死化細胞株を使用する。

4. 研究成果

われわれの研究グループではOSEに由来すると考えられる上皮性卵巣癌の細胞内局所的エストロゲン動態を明らかにし、卵巣癌における腫瘍発生について解明することを目的として研究をすすめている。成人女性のゲノムDNAから各17-HSDのプロモーター領域を抽出し、ダイレクトシーケンスにて遺伝子配列に誤りがないことを確認する作業を行ったが、再現性の確認が困難であった。今後の検討を展開していくためには、正確な遺伝子配列の確認が必須であり詳細な検討を繰り返している。

一方、近年OSEに存在する正常幹細胞の存在がマウス実験で示されており、近年急速にその知見が集積されている。そこで、われわれが樹立した不死化OSE細胞株を用いて、*in vitro*で詳細な解析を行った結果、それぞれの細胞株に幹細胞としての特性を有する細胞集団が存在することが明らかとなった。さらに、それらの細胞分画は、様々な幹細胞関連遺伝子を発現していることが示された。今後の17-HSDを含めた様々な遺伝子解析を計画している。

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 5 件)

1. Motohara T, Tayama S, Narantuya D, Tashiro H, Katabuchi H. Anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma: clinical presentation, diagnosis, treatment, and surgical management. *Int Canc Conf J.* 2:121-130,2013 査読あり
2. 本原 剛志, 田代 浩徳, 片瀨 秀隆. 婦人科がん-最新の研究動向- 卵巣癌. 卵巣癌の臨床病理学. 卵巣癌・子宮体癌の重複癌. *日本臨床.* 74:523-527,2012 査読あり

3. 田代 浩徳, 佐々木 瑠美, 本原 剛志, 片瀨 秀隆. 卵巣癌治療の標的分子の探索 マウスを用いた上皮性卵巣癌モデルシステム構築の意義. *産婦の実際.* 61:171-180,2012 査読あり
4. 田山 親吾, 田代 浩徳, 本原 剛志, 山口 宗影, 本原 研一, 大場 隆, 片瀨 秀隆. 正常大卵巣に局在し抗NMDA受容体脳炎を惹起した成熟嚢胞性奇形腫の1例. *日婦腫瘍会誌.* 32:257-262,2014 査読あり
5. 本原 剛志, 片瀨秀隆. Low-grade 漿液性腺癌の病態と治療. *産婦の実際.* 63:959-965,2014 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

1. The 4th Asan-Kumamoto International Joint Symposium (August 17, 2013, Kumamoto, Japan) Survival impact of wide resection of the pelvic peritoneum in patients with epithelial ovarian cancer: Towards the development of novel surgical strategies for the removal of ovarian cancer stem cells and their niche. Motohara T, Tayama S, Saito F, Tjhay F, Takaishi K, Sakaguchi I, Tashiro H, Katabuchi H.
2. 第72回日本癌学会学術総会(2013年10月3日-5日:横浜市) 上皮性卵巣癌において癌幹細胞マーカーであるEpCAMはプラチナ製剤抵抗性に関与している. 田山 親吾, 本原 剛志, 田代 浩徳, 片瀨 秀隆.
3. 第13回日本婦人科がん分子標的研究会(2014年3月14-15日:米子市) 卵巣癌においてEpCAMは抗アポトーシス作用を介して抗癌剤治療抵抗性に関与している. 田山 親吾, 本原 剛志, Narantuya Dashdemberel, Francisca Tjhay, 高石 清美, 坂口 勲, 田代 浩徳, 片瀨 秀隆.
4. 第66回日本産科婦人科学会学術講演会(2014年4月18日-20日:東京都) A subpopulation of EpCAM-positive cancer cells is involved in chemoresistance and prevents platinum anticancer drug-induced apoptosis in epithelial ovarian cancer. Tayama S, Motohara T, Tjhay F, Sakaguchi I, Tashiro H, Katabuchi H.
5. 第66回日本産科婦人科学会学術講演会(2014年4月18日-20日:東京都) Involvement of CD44 variant, a cancer stem cell marker, in peritoneal metastasis and poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer. Tjhay F, Motohara T, Tayama S, Sakaguchi I, Tashiro H, Katabuchi H.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本原 研一 (MOTOHARA, Ken-ichi)
熊本大学生命科学研究部
非常勤診療医師
研究者番号：50573606

(2) 研究分担者

片淵 秀隆 (KATABUCHI, Hidetaka)
熊本大学生命科学研究部
教授
研究者番号：90224451

(3) 研究分担者

田代 浩徳 (TASHIRO, Hironori)
熊本大学生命科学研究部
教授
研究者番号：70304996

(4) 研究分担者

宮原 陽 (MIYAHARA, Yo)
熊本大学・生命科学研究部・
非常勤診療医師
研究者番号：40404355