

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791727

研究課題名(和文) 難治性子宮内膜癌における EMT マーカーとしての CD24 の意義と EMT 制御に向けて

研究課題名(英文) CD24 expression is correlated with an EMT (Epithelial-Mesenchymal-Transition) status in endometrial cancer

研究代表者

田中 良道 (Tanaka, Yoshimichi)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：10625502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜癌において、E-cadherin 減弱や Snail、Slug の核内染色で表される EMT 現象が組織型や進行期などと強い相関関係があり、また独立した予後因子である事を明らかにした。また CD24 発現が増殖能や薬剤耐性といった悪性度や EMT 現象とも関連しており、CD24 遺伝子導入によってそれらが誘導される事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We clarified that reduced E-cadherin and nuclear expression of Snail and Slug have a prognostic impact in endometrial cancer. Moreover CD24 expression is associated with malignant potential and correlated with EMT status in endometrial cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：子宮内膜癌 EMT CD24

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌は近年、子宮癌全体に占める割合も 40%に達し増加傾向にある。子宮内膜癌に対する主治療としては、National Cancer Institute (NCI)による治療ガイドラインに示されているように黄体ホルモン療法、放射線療法などがあるが、抗がん化学療法の有用性が認識されつつある。しかしながら、1/2 以上の筋層浸潤例、Grade 3 類内膜腺癌、転移を認める症例、漿液性腺癌、明細胞腺癌、癌肉腫など難治性子宮内膜癌に対する追加治療については未だ確立されておらず、放射線療法や抗癌剤治療を行うも早期に転移をおこすのみならず治療抵抗性を示し予後は著しく悪い。我々は癌の浸潤・転移の制御や治療抵抗性癌の治療に向けた研究に注目してきた。我々は従来より卵巣癌において、生存シグナルである ERK 経路と Akt 経路およびその下流の転写因子 Nuclear Factor B (NF B)が白金製剤の耐性に関わる重要な分子であることを *in vitro* および *in vivo* の研究で明らかにし、Akt の活性化が重要な予後因子である事を臨床病理学的にも確かめた。すなわち、白金製剤の耐性化に関与する Akt および ERK 両経路をブロックすると、卵巣癌の白金製剤への耐性が解除され感受性が高まることにより転移病巣や再発病巣での治療効果が上がることを明らかにした。近年癌細胞の浸潤・転移過程において、一定の細胞形態を持って基底膜上に配列している上皮系の細胞がその細胞極性を失い、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 (Epithelial-Mesenchymal-Transition: EMT) が注目されている。この EMT は我々が研究ターゲットとしてきた Akt および下流の mTOR、HIF-1、NF B の活性化により調整されていることや、これらの制御に Zing-finger 型転写因子 Snail や Twist、SIP1 などが関与していることが報告されている。また固形癌細胞においても Cancer Stem Cells と呼ばれる癌幹細胞が注目されているが、Mani SA らは、Cancer Stem Cells (癌幹細胞)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、EMT を起こす細胞は、癌幹細胞と同様に強い自己複製能と腫瘍形成能を有し、薬剤に耐性を示すことが明らかとなりつつある。我々は EMT 現象を引き起こす細胞を研究する上で癌幹細胞の有用な表面マーカーとして乳癌、膵臓癌で注目されている CD24 に着目している。CD24 は分子量 35-45kDa のグリコシルホスファチジルイノシトール結合型シアロ糖タンパクで、細胞表面に存在しさまざまな癌種で過剰発現が予後悪化因子であると報告されている。また卵巣癌でも CD24 発現と化学療法抵抗性や癌幹細胞との関連を示唆する報告はみられるが、その機序は未だに不明である。以上から、我々は難治性進行子宮内膜癌において CD24 の発現や

EMT 現象との関係を解析することで、その浸潤・転移のメカニズムを明らかできると考え研究計画を作成した。

2. 研究の目的

難治性である進行子宮内膜癌における上皮間葉形態転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) 現象に注目し、EMT のバイオマーカーとしての CD24 や新規遺伝子の検索を行い、癌の浸潤・転移における EMT 現象のメカニズムの解明とその制御に向けた基礎的・臨床的検討を行うことを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 臨床的検討として、我々が作製した子宮体癌 354 例の組織マイクロアレイ標本を用い、EMT 誘導転写因子 (Snail, Slug, TWIST)、上皮系マーカー (E-cadherin)、間葉系マーカー (Vimentin)、CD 抗原 (CD24) の免疫染色を行い、臨床病理学的因子や予後との関連を詳細に検討する。

(2) 子宮体癌細胞株 (Hec108) を用いて CD24/CD44 を指標に FACS 解析後 MACS 法で CD24⁺/CD24⁻へ分離し、増殖能また CDDP に対する薬剤感受性を MTS assay で検討した。

(3) CD24 で分離後に EMT (E-cadherin, snail, slug) や幹細胞 (Oct3/4, Oct4, Notch1, Notch4)、細胞周期 (cyclin D1) に関連する遺伝子発現を RT-PCR 法で CD24 陽性群と CD24 陰性群を比較検討した。

(4) 子宮体癌細胞株 (Hec108) に CD24 遺伝子を導入し、EMT 関連因子である Snail、E-cadherin の発現の変化を RT-PCR 法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) EMT 誘導転写因子である Snail, Slug の核内移行と上皮系マーカーの E-cadherin の発現減弱の両方が観察された場合を EMT 陽性と定義した (図 1)。EMT 現象は子宮内膜癌の内、類内膜腺癌の G1 で 8.8%に、G2 で 10.2%、G3 で 22.7%、特殊型 (漿液性腺癌や明細胞腺癌など) の 27.0% でみられた。癌肉腫症例では 63.6% と高率に観察された。また Slug の核内染色が見られたのはほとんどが癌肉腫の症例であった。進行期別では I 期 11.8%、II 期 4.8%、III 期 32.4%、IV 期 40.9% でみられた。EMT 現象陽性は臨床進行期、筋層浸潤 1/2 以上、腹水細胞診陽性、リンパ節転移陽性と有意に相関しており、また無増悪生存期間、全生存期間も有意に短縮していた。多変量解析の結果では EMT 現象陽性は独立した予後因子であった。CD24 染色も上記と同様の結果であった。CD24 陽性群は Snail, Slug の核内染色と E-cadherin の減弱

がCD24 陰性群と比較して有意に高率であり EMT 現象との強い相関が認められた(表1)。また CD24 は独立した予後因子であった(図2)。

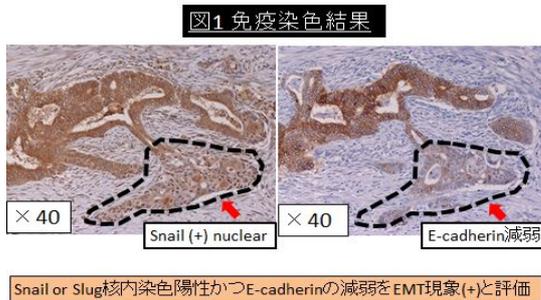
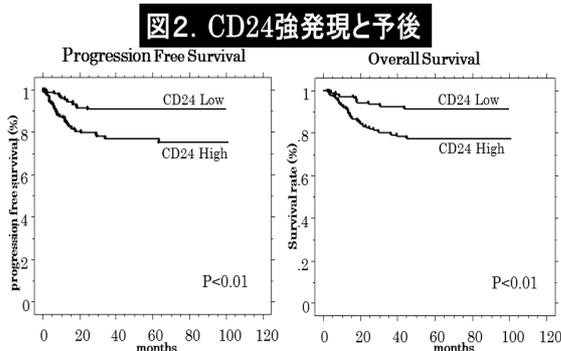
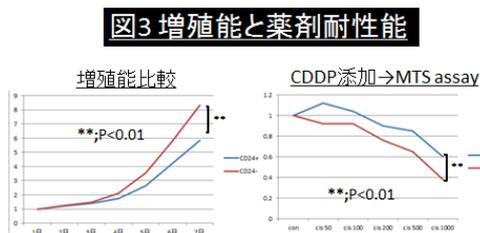


表1. CD24とSnail、E-cadherinの発現

Variables	CD24		P-value
	Low (%)	High (%)	
Snail			<0.01
Positive	13 (21.7)	47 (78.3)	
Negative	146 (49.7)	148 (50.3)	
E-cadherin			<0.01
Reduced	27 (19.1)	114 (80.9)	
Preserved	132 (62.0)	81 (38.0)	

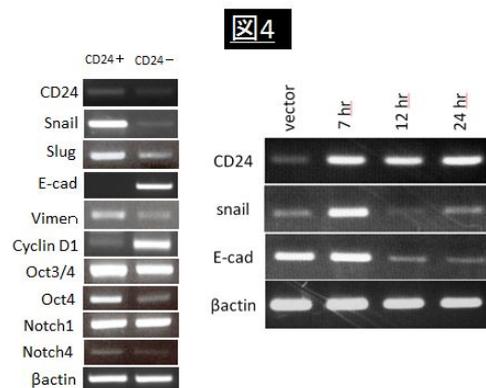


(2)増殖能は CD24 陰性群が CD24 陽性群と比較して有意に高かった。また CDDP 添加後の結果からは CD24 陽性群の耐性能が高い事が示唆された。(図3)



(3)EMT 誘導転写因子である Snail、Slug、また間葉系マーカーである Vimentin は CD24 陽性群が CD24 陰性群と比較して発現が高く、上皮系マーカーである E-cadherin の発現は CD24 陽性群で低かった。細胞周期に関わる cyclinD1 の発現は CD24 陽性群で低かった。また幹細胞マーカーである Oct3/4、Oct4、Notch1、Notch4 は CD24 陽性群で高かった。(図4)

(4)子宮体癌細胞株 (Hec108) に CD24 遺伝子を導入すると CD24 発現亢進に伴って Snail の高発現と E-cadherin の発現減弱が認められた。(図4)



以上の結果から、子宮内膜癌において E-cadherin や Snail、Slug を指標とした EMT 現象が重要な予後因子となっている事を明らかにした。またその EMT 現象は CD24 発現と強く相関しており、癌幹細胞様の性質や薬剤耐性能と深くかかわっている可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文](計6件)

Tanaka Y, Terai Y, Kawagushi H, Takai M, Fujiwara S, Yu S, Tsunetoh S, Sasaki H, Kanemura M, Tanabe A, Ohmichi M. Prognostic impact of EMT (Epithelial Mesenchymal Transition) related protein expression in endometrial cancer. *Cancer Biol Ther.* 査読有 14、2013、13-9

Terai Y, Sasaki H, Tsunetoh S, Tanaka Y, Yoo S, Fujiwara S, Kanemura M, Ohmichi M. Novel para-aortic lymphadenectomy technique for gynecological malignancies prevents postoperative bowel obstruction. *J Obstet Gynaecol Res.* 査読有 39、2013、849-54

Takai M, Kanemura M, Kawagushi H, Fujiwara S, Yoo S, Tanaka Y, Tsunetoh S, Terai Y, Yamada T, Ohmichi M.

Mucinous adenocarcinoma of the intestinal type arising from mature cystic teratoma of the ovary: a rare case report and review of the literature. J ovarian Res. 査読有 5、2012、41-4

Fujiwara S, Terai Y, Kawagushi H, Takai M, Yoo S, Tanaka Y, Tanaka T, Tsunetoh S, Sasaki H, Kanemura M, Tanabe A, Yamashita Y, Ohmichi M. GPR30 regulates EGFR-Akt cascade and predicts lower survival in patients with ovarian cancer. J ovarian Res. 査読有 5、2012、35-42

〔学会発表〕(計 10件)

田中良道、Epithelial Mesenchymal Transition(EMT) in endometrial cancer.

アジア婦人科腫瘍学会、2013 12、京都
田中良道、若年子宮内膜癌・子宮内膜異型増殖症に対する MPA 療法の治療成績、

日本癌治療学会、2013 10、京都
田中良道、若年子宮内膜癌・子宮内膜異型増殖症に対する MPA 療法の治療成績、

日本婦人科腫瘍学会、2013 7、東京
田中良道、妊娠中の CIN から初期子宮頸癌の診断と治療、日本癌治療学会、2012 10、横浜

田中良道、進行卵巣癌 NAC 前の診断における腹腔鏡下手術の有用性について、近畿産婦人科学会、2012 9、京都

田中良道、卵巣癌・腹膜癌 NAC 症例における診断目的の腹腔鏡下手術の有用性について、JSAWI、2012 9、兵庫

田中良道、子宮頸部初期病変治療後のピトフォール、日本婦人科腫瘍学会、2012 7、東京

田中良道、子宮体部移行上皮癌の 1 例、日本臨床細胞学会、2012 6、千葉

田中良道、子宮体癌における EMT マーカーとしての CD24 の有用性、日本産婦人科学会、2012 4、神戸

田中良道、Prognostic impact of EMT(Epithelial Mesenchymal Transition) related protein expression in endometrial cancer. AACR、2012 4、シカゴ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 良道 (TANAKA Yoshimichi)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：10625502