

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462519

研究課題名(和文) 卵巣明細胞癌における癌幹細胞の同定とその治療抵抗性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of cancer stem-like cells of ovarian clear cell carcinoma and analysis of its chemotherapy-resistance mechanism

研究代表者

森重 健一郎 (Morishige, Ken-ichirou)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90283788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞マーカーの一つであるALDH1に注目し、卵巣明細胞腺癌患者から得た検体について免疫組織学的手法によって解析を行い、ALDH1の発現量と癌の悪性度との間に相関性があることを見出した。またALDH1高発現細胞ではNRF2を介した酸化ストレス耐性機構が亢進していることを示し、卵巣明細胞腺癌の化学療法抵抗性をもたらす分子機構の一端を解明した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationship between a CSC marker, aldehyde dehydrogenase1 (ALDH1), and clinical prognosis using ovarian clear cell carcinoma tissue samples. As a result, high ALDH1 expression levels are related to advanced stage in clear cell carcinoma cases. ALDH1 expression significantly reduced progression free survival. Furthermore, we investigated the antioxidant mechanism by which CSCs maintain a lower reactive oxygen species (ROS) level, which provides protection from chemotherapeutic agents. In vitro study revealed that ALDH-high cells contained a lower ROS level than ALDH-low cells. Antioxidant enzymes were upregulated in ALDH-high cells. ALDH-high cells showed increased expression of Nrf2, a key transcriptional factor of the antioxidant system. In conclusion, ALDH-positive CSCs might have increased Nrf2-induced antioxidant scavengers, which lower ROS level relevant to chemoresistance in ovarian clear cell carcinoma.

研究分野：医歯薬学

キーワード：卵巣癌 癌幹細胞 明細胞癌

### 1. 研究開始当初の背景

近年の癌研究の進展によって悪性腫瘍の再発や化学療法抵抗性に癌幹細胞が深く関与していることが明らかになった。このような知見にもとづき、悪性腫瘍の根治を図る手段として、癌幹細胞を標的とした新しい治療戦略を構築することの必要性が広く認識されている。

癌細胞が化学療法抵抗性を獲得する仕組みの一つとして、酸化ストレス耐性機構の恒常的活性化が関与していることが示されている。NRF2は転写因子であり、酸化ストレス反応を制御するうえで中心的な役割を果たしている。非ストレス状態ではKEAP1依存的にNRF2が分解され、その転写活性が抑制されている。一方、酸化ストレス暴露条件下ではKEAP1が失活することによりNRF2が安定化し、その転写活性が維持される。その結果、さまざまな酸化酵素遺伝子群の発現が誘導され酸化ストレス耐性機構がはたらく。これまでの研究から、NRF2シグナル経路が癌幹細胞のストレス耐性を支える一躍を担っていることが示されている。

### 2. 研究の目的

卵巣癌のなかでも卵巣明細胞腺癌は強い化学療法抵抗性と再発性を持つことが特徴である。その病態の悪性化に癌幹細胞が関与している可能性は十分に考えられる。そこで今回、我々は明細胞腺癌検体において、卵巣癌幹細胞マーカーのひとつとされているALDH1の臨床的意義を検討し、さらに癌幹細胞とNrf2-抗酸化酵素を介した酸化ストレス回避機構について検討を行い、難治性卵巣癌の新たな治療戦略の開発に繋げる。

### 3. 研究の方法

卵巣明細胞癌の手術検体(n=81)について、これまでに癌幹細胞マーカーとして報告されているALDH1, CD133, CD44分子に対する抗体を用いて免疫組織染色をおこない、これらの分子の発現と予後との関連性について検討した。次に、卵巣明細胞腺癌の細胞株であるKOC-7Cを用いて、ALDH酵素活性と細胞内活性酸素蓄積量をフローサイトメーターによって測定し、両者の関連性について検討

した。さらに、異なるALDH酵素活性を示す2つのKOC-7C細胞亜集団について、抗酸化酵素(SOD2, HO-1)およびNRF2の発現量をmRNAレベルおよびタンパクレベルで比較解析をおこなった。また、KOC-7C細胞においてNRF2を強制発現させ、抗酸化酵素の発現量および細胞内活性酸素蓄積量に与える影響を調べた。

### 4. 研究成果

- 1) 手術検体から得た卵巣組織切片の免疫組織学的解析により、臨床進行期が進んだ検体群では統計的有意差をもってALDH1の発現量が高値を示した。また、無病生存期間は、ALDH1高発現群(10%)において低発現群(10% <)よりも有意に短縮化していることが認められた。CD133およびCD44の発現と予後との間には有意な相関性が認められなかった。
- 2) KOC-7C細胞についてALDH酵素活性を指標にして解析をおこなったところ、本細胞には高酵素活性群と低酵素活性群の2つの亜集団が存在することがわかった。これらのうち高酵素活性群は低酵素活性群よりも活性酸素蓄積量が低位に保たれていた。同様に抗酸化酵素(SOD2, HO-1)の発現量はALDH高酵素活性群の方が高値を示した(p < 0.01)。さらに、これらの抗酸化酵素の発現を亢進する役割を持つNRF2の発現量を解析したところ、mRNAレベルおよびタンパク質レベル、双方においてALDH高酵素活性群の方が高値を示した。
- 3) NRF2を強制発現させたKOC-7C細胞において、抗酸化酵素の発現量が有意に上昇するとともに活性酸素蓄積量が低下することが認められた。

### 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 7件)

- 1). Makino H, Nishio S, Tsubamoto H, Shimada M, Nishikawa R, Kai K, Ito K, Mizuno T, Ushijima K, Morishige K-I: A retrospective study of the treatments and prognosis of bone metastasis from cervical cancer (KCOG-G1202s). The Journal of

- Obstetrics and Gynaecology Research. 査読有, 42(6), 2016, 701-706. doi: 10.1111 / jog. 12956,
- 2). Mizuno T, Suzuki N, Makino H, Furui T, Morii E, Aoki H, Kunisada T, Morishige K: Cancer stem-like cells of ovarian clear cell carcinoma are enriched in the ALDH-high population associated with an accelerated scavenging system in reactive oxygen species. *Gynecologic Oncology*. 査読有, 137(2), 2015, 299-305. doi : 10. 1016 / j .ygyno. 2014 . 12. 005.
  - 3). Nozawa-Suzuki N, Nagasawa H, Ohnishi K, Morishige K-I : The inhibitory effect of hypoxic cytotoxin on the expansion of cancer stem cells in ovarian cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)*.20, 査読有 , 2015, 457 (4) :706-711. doi: 10. 1016 / j .bbrc.2015.01.053.
  - 4). Kinose Y, Sawada K, Makino H, Ogura T, Mizuno T, Suzuki N, Fujikawa T, Morii E, Nakamura K, Sawada I, Toda A, Hashimoto K, Isobe A, Mabuchi S, Ohta T, Itai A, Morishige K-I, Kurachi H, Kimura T: IKK regulates VEGF expression and is a potential therapeutic target for ovarian cancer as an anti-angiogenic treatment. *Mol. Cancer Ther.* 査読有 , 14(4), 2015, 909-919. doi: 10 . 1158 / 1535 - 7163 .MCT-14-0696.
  - 5). Isobe A, Sawada K, Kinose Y, Ohyagi-Hara C, Nakatsuka E, Makino H, Ogura T, Mizuno T, Suzuki N, Morii E, Nakamura K, Sawada I, Toda A, Hashimoto K, Mabuchi S, Ohta T, Morishige K, Kurachi H, Kimura T. Interleukin 6 receptor is an independent prognostic factor and a potential therapeutic target of ovarian cancer. *Plos One* Feb 6, 査読有 , 10(2):e0118080. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0696., 2015
  - 6). Suzuki M, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Suzuki N, Takamatsu R, Furui T, Yoshimi N, Kozawa O, Morishige K-I : Regulation by heat shock protein 22 (HSPB8) of transforming growth factor- $\beta$ -induced ovary cancer cell migration. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 査読有 , 571, 2015,40-49. doi: 10.1016 / j .abb .2015.02.030.
- 7). Makino H, Furui T, Hayasaki Y, Morishige K-I, Kanematsu M: Assessment of uterine enhancement rate after abdominal radical trachelectomy using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 査読有 ,293(3) , 2015, 625-32.doi: 10 . 1007 / s00404 - 015 -3842-7.
- 〔学会発表〕(計 2件)
- 1) 鈴木紀子、水野智子、牧野弘、竹中基記、森美奈子、古井辰郎、森重健一郎: 卵巣癌幹細胞における酸化ストレス回避機構に関する検討 . 第 14 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会, H27.7.17-18, 美ヶ原ホテル翔峰(長野・松本市)
  - 2) 水野智子、森美奈子、牧野弘、古井辰郎、伊藤直樹、矢野光剛、伊藤公彦、西尾真、久慈志保、荒川敦志、井谷嘉男、森重健一郎: 卵巣明細胞腺癌における酸化ストレス回避機構に関する検討 . 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会, H26.4.18-20, 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者  
森重 健一郎 (MORISHIGE, Ken-ichirou)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 90283788
  - (2)研究分担者  
古井 辰郎 (FURUI, Tatsurou)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号 : 00313883
- 牧野 弘 (MAKINO, Hiroshi)  
岐阜大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号 : 20649107
- 鈴木 紀子 (SUZUKI, Noriko)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・学術研究補佐員  
研究者番号 : 40642096
- 水野 智子 (MIZUNO, Tomoko)  
岐阜大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60444262

川島 英理子 (KAWASHIMA, Eriko)  
岐阜大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80444264