

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462525

研究課題名(和文) 間葉上皮転換の誘導による子宮肉腫の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Strategy to treatment of uterine sarcoma inducing of mesenchymal to epithelial transition

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(特命)

研究者番号：70379965

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)：子宮肉腫平滑筋細胞株SKNにcarbonyl reductase 1(CBR1)安定発現株を作成した。CBR1過剰発現によって細胞形態は敷石状に変化する。またEMT関連因子の発現解析では、METの主要な分子であるE-cadherinの発現上昇は認めず完全なMETを誘導することは不可能であった。細胞の機能にCBR1がどのような影響を与え得るかを評価したところ、MMP-2の分泌がsenseで減少していた。またsenseでは細胞の遊走能が抑制された。SKN-CBR1 senseを重度免疫不全マウスに移植し、腫瘍形成能の変化を検証したところ、SKNでは腫瘍を形成しなかった。

研究成果の概要(英文)：We established uterine sarcoma cell lines ;SKN in which CBR1 expressions were increasing stably. In those cell lines, expressions of molecules which has relation with epithelial mesenchymal transition were investigated. Expressions of Fibronectin and N-cadherin were decreasing in CBR1 over expression cells. It is suggested that CBR1 should induce partialy mesenchymal to epithelial transition. But expression of E-cadherin, which is epithelial marker, did not change. CBR1 over expression made their morphologies change to cobble stones from spindle shape. CBR1 over expression made decline MMP-2 in gelatin zymography in SKN. Next, CBR1 over espression clones of SKN was injected to nude mice in order to investigated wheather CBR1 may reduce ability to tumorigenesis. Transplantation of SKN were not able to make tumors in nude mice in 4 weeks.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：CBR1 上皮間葉転換 間葉上皮転換

1. 研究開始当初の背景

我々は、子宮頸部扁平上皮癌 I、II 期の原発巣の組織において CBR1 の発現を免疫組織染色で検討したところ、CBR1 発現が低下している症例では骨盤リンパ節転移が有意に多く、予後不良である事を報告した (村上 明弘 扁平上皮癌の予後判定方法 特許 4967128, Murakami et al. Cancer Lett, 2011)。子宮頸部扁平上皮癌細胞株における CBR1 の抑制実験の結果から、CBR1 発現低下により上皮間葉転換 (EMT) が誘導され、細胞間接着の低下が起こり癌の転移及び浸潤能が亢進する事が明らかとなり、それが予後不良の一因と考えられた。反対に CBR1 を過剰発現させた子宮頸癌細胞株では、EMT とは逆の MET (間葉上皮転換) が誘導され、増殖能や浸潤能が抑制される事が明らかとなった。in vivo 実験においても、CBR1 発現抑制細胞株を移植したマウスでは腫瘍増殖が亢進し、CBR1 過剰発現子宮頸癌細胞株をヌードマウスに移植したヌードマウスでは、腫瘍増殖が抑制された (図 1)。このように CBR1 による MET の誘導は癌の悪性度を低下させ、さらには抗癌剤感受性を増加させる新たな分子標的薬治療の開発につながる可能性がある。

難治性腫瘍である子宮平滑筋肉腫は間葉系由来の悪性腫瘍であり、抗癌剤耐性が強く、治療法として手術療法以外の方法は確立されていない。そこで間葉系腫瘍である子宮肉腫平滑筋細胞に CBR1 を過剰発現させ、MET を誘導し、間葉系悪性腫瘍から上皮系悪性腫瘍へ性質転換を誘導させ得れば、子宮肉腫に対する新たな治療戦略となり得る可能性が示唆された。

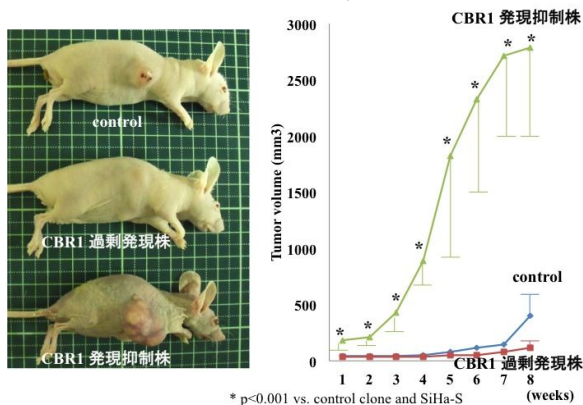


図 1 CBR1 発現と腫瘍形成能

2. 研究の目的

子宮頸癌や子宮体癌といった上皮系悪性腫瘍ではすでに我々は、CBR1 の過剰発現によって MET を誘導し得ることを報告している。そこで本研究は難治性悪性腫瘍である子宮平滑筋肉腫に対して、CBR1 を過剰発現させて間葉上皮転換を誘導し、その結果、“間葉系悪性細胞 (肉腫) を上皮系悪性細胞 (癌) に変化させる” ことによって悪性化を低下させ、抗がん剤の感受性を高めるといった新たな

分子標的治療の実現を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 子宮平滑筋肉腫細胞株 SKN に human CBR1 の cDNA あるいは antisense cDNA を Lipofectamin 法で導入し、CBR1 過剰発現株、及び CBR1 発現抑制株を樹立した。また、形質導入後の細胞株に G418 (neomycin) による薬剤選別を 1 ヶ月施したのち、single cell culture を行い CBR1 sense、または CBR1 antisense 株の安定発現株を構築した。さらに各々の細胞株に対してウェスタンブロット法で、実際に CBR1 タンパクの発現がコントロールできていることを確認した。以下の解析に今回作成した安定発現株を使用した。

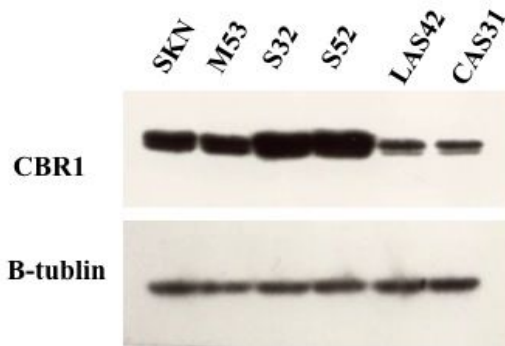


図 2 CBR1 発現

M53; コントロール S32, S52; sense LAS42, CAS31; antisense

(2) 細胞形態の変化

樹立した細胞を 48 時間単層培養し、位相差顕微鏡で形態の変化を確認した。

(3) 細胞増殖能の評価

CBR1 sense 株、及び antisense 株の細胞増殖能を空ベクターのみを transfection したコントロール株と比較し、細胞増殖に CBR1 が影響を及ぼし得るかを検討した。

比較方法は、細胞数を 24 時間毎に cell-counter で直接細胞数を測定する直接測定による方法と、培養開始後 24 時間毎に 3-(2,5-diphenyltetrazolium bromide) を加え、吸光度の変化を測定する MTT assay 法で行った。具体的には細胞を 96well plate に 3×10^3 細胞ずつ播種し、24 時間ごとに MTT 試薬を $100 \mu\text{l}$ ずつ加え 2.5h、37 °C で incubation したのち、産生したホルマザン結晶を DMSO に溶解し、540nm における吸光度を測定し、増殖率を評価した。

(4) EMT 関連因子の発現解析

SKN-CBR1 sense あるいは SKN-CBR1 antisense における EMT 関連因子 (上皮系マーカーとして E-cadherin, cytokeratin, 間葉系マーカーとして Vimentin, Fibronectin, N-cadherin, さらに EMT 促進的転写因子として ZEB1, Snail, Twist) の発現を messenger RNA 発現は RT-PCR 法で、タンパク質発現はウェスタンブロット

法で解析した。

(5) SKN-CBR1 sense antisense における細胞の機能の変化を以下の方法で行った。

細胞遊走能の評価

細胞遊走能を評価するため、wound healing assay を行った。CBR1 sense、antisense、及びコントロール細胞を初期濃度 5.0×10^4 細胞で 6well plate に播種し、37 条件で 24 時間培養したのち、blue chip にて well 中央部に scratch を行い、20 時間後の細胞の移動能を評価した。

浸潤能の評価

培養開始後 21 時間後にマトリゲルを重層したチャンバーにおいて浸潤した細胞あるいはマトリゲルを重層していないコントロールチャンバーを遊走した細胞をギムザ染色し、細胞数を評価した。

matrix metaroprotease (MMP) 分泌能の評価

細胞浸潤に關与する MMP-2 及び MMP-9 の細胞外分泌能を評価するため Gelatin zymography 法を行った。

最終濃度 0.1% の Gelatin を含む BIS acrylamide gel を用いて CBR1 sense 及び antisense 1.0×10^5 細胞を培養した上清を電気泳動した。泳動後 TritonX 5% で洗浄したのち、Activation buffer に 72 時間、37 で incubation したのち、CBB 染色を行い MMP の検出を行った。

(6) in vivo 腫瘍移植実験

SKN-CBR1 sense または anti sense 細胞株を実際にヌードマウスに移植し、腫瘍形成能に影響を及ぼし得るかを検証した。BULB C ヌードマウスの腰背部に 1.0×10^7 細胞 (PBS 100 μ l に溶解) を 26G 針で皮下注射し、週に 1 度の割合で腫瘍形成変化を観察した。

4. 研究成果

(1) SKN における EMT 関連因子の発現解析
上皮系マーカーについて、CDH1 は message レベルではコントロールと比較し SKN-sense 群ではむしろ発現が抑制される傾向にあった。Anti-sense 群では、コントロールと比較して有意な発現変化は認めなかった。KRT18 では sense 群で発現が増加する傾向に有ったが、antisense 群では有意な変化を認めなかった。間葉系マーカーについて、FN1 及び CDH2 では anti-sense 群でコントロールと比較し、発現がやや増加し、sense 群で抑制される傾向に有った。転写因子では、Snail、Slug、及び Twist では sense 群で発現が減弱し、逆に anti-sense 群ではコントロール群に比べ発現が上昇する傾向にあった。

EMT (MET) における中心的な役割を担うのは E-cadherin であるが、今回の検討では CBR1 の過剰発現によって E-cadherin の発現を制御することは不可能であった。すなわち、CBR1 の過剰発現では完全な MET は誘導し得なかった。

(2) 細胞増殖能

SKN-anti-sense とコントロール群では有意に anti-sense 群で細胞増殖能が増加していた。一方 SKN-sense 群では、コントロール群と比較しても有意な増殖能の変化はなかった。(図3)

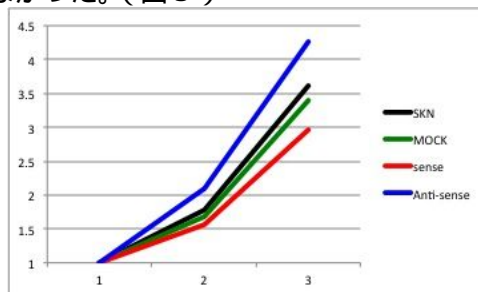


図3 MTT assay による細胞増殖能の変化
縦軸はコントロールに対する増殖比、横軸は経過日数(単位;日)

(3) SKN における細胞の機能解析

Wound healing assay

各細胞の遊走能の変化を wound healing assay で評価した。Sense 群ではコントロールと比較し、有意に細胞移動距離が抑制された。(図4)

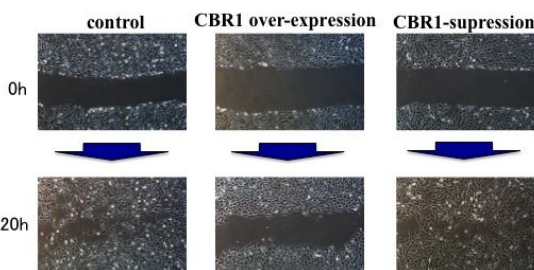


図4 wound healing assay

invasion assay

invasion assay により浸潤能を評価した。SKN では CBR1 を過剰発現させても、浸潤能の有意な変化は認められなかった。

MMP 分泌能の変化

MMP2、MMP9 の分泌能の変化を Gelatin zymography で評価した。結果、sense では MMP-2 の分泌が抑制されており、逆に antisense では MMP-2 の分泌が著しく亢進していた。一方で MMP-9 はもともと SKN ではあまり分泌が認められておらず、CBR1 の発現調節を行っても大きな変化は認められなかった。(図5)

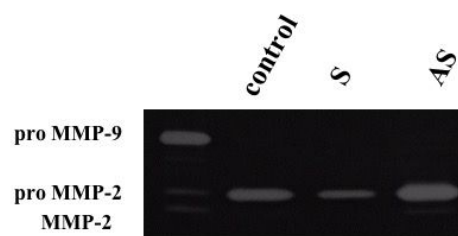


図5 Gelatin zymography

(4) 細胞の形態学的変化

樹立した細胞を 48 時間単層培養し、位相差顕微鏡で形態の変化を確認した。SKN-sense ではコントロールと比較し、紡錘系から敷石状へと形態変化を認めた。一方で SKN-anti-sense では紡錘形がさらに強くなった。(図 6)

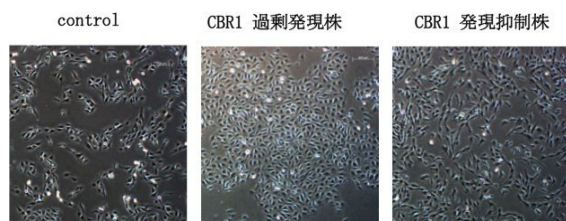


図 6、細胞の形態学的変化

(5) in vivo 実験

腫瘍形成に対する CBR1 の影響を評価するため、ヌードマウスに SKN 細胞及び sense、antisense を移植した。移植後 1 ヶ月の観察を行ったが、SKN、コントロール、sense、及び antisense いずれの移植を行ってもヌードマウスでは腫瘍を形成しなかった。SKN は以前での報告でも腫瘍形成能が低いあるいはないといった報告があり、今回の結果も CBR1 の有無いかんによらず、細胞株の性質上腫瘍を形成しなかった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 1 件)

Kazuyui Yakabe, Akihiro Murakami, Takuya Kajimura, Yuki Nishimoto, Kotaro Sueoka, Functional significance of transgelin-2 in uterine cervical cancer, J Obstet Gynecol Res, 査読有、3, 2016 1285-1290

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕なし
ホームページ等

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(特命)

研究者番号：70379965

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし