

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830084

研究課題名(和文)子宮内膜癌における浸潤・転移を制御する新たな細胞外基質蛋白の解析

研究課題名(英文)analysis of a new endogenous protein 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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：デコリンは細胞増殖を抑制する細胞外基質蛋白である事が判明した。プロゲステロンやディナゲストはデコリンプロモーター領域に直接作用する。さらにp21を介して細胞周期を制御する。ディナゲストにより誘導されたデコリンは、子宮内膜細胞、子宮内膜間質細胞において、p21を介して細胞周期を制御する事により増殖抑制作用を示す事が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Decorin has been shown to be a powerful endogenous tumor repressor acting in a paracrine fashion to limit tumor growth. It was noted that progesterone and dienogest directly induced the binding of the decorin promoter. Progesterone and dienogest also led to significant induced cell cycle arrest via decorin by promoting production of p21. Decorin induced by dienogest appears to play a crucial role in suppressing endometriosis by exerting anti-proliferative effects and inducing cell cycle arrest via the production of p21 human ectopic endometrial cells and eutopic endometrial stromal cells.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮内膜細胞 デコリン プロゲステロン ディナゲスト 細胞周期

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手術療法、黄体ホルモン療法、放射線療法などがあるが、化学療法の有用性が認識されつつある。しかしながら、type2 とされる Grade 3 類内膜腺癌、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、治療抵抗性を示し予後は著しく悪い。その一因として早期から筋層浸潤、転移を起こす事があげられ、これらをいかにコントロールするかが重要な課題である。我々は従来より婦人科癌の浸潤・転移の制御や化学療法抵抗性癌の治療に向けた研究に注目してきた。卵巣癌において、生存シグナルである ERK 経路と Akt 経路²⁾³⁾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た。さらに 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、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。さらに近年癌細胞の浸潤・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) が注目されているが、この EMT 現象が子宮内膜癌において重要な予後因子となる事を報告した。近年この EMT 現象において上皮細胞と間質細胞との相互作用が注目されているが、我々は主として間質細胞から生成される Decorin という細胞外基質蛋白に着目した。Decorin とは大きさ 90-140 KDa の糖タンパク質であり、SLRP (Small Leucine Rich Proteoglycan) ファミリーに属する。主に線維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞で生成され、間質に存在し、様々な受容体やシグナルに関与する事で細胞増殖や血管新生を抑制する事が報告されている。我々はプロゲステロン製剤が子宮内膜に与える影響を検討する中で、プロゲステロン製剤がこの Decorin を誘導し、Decorin が p21 を制御する事で細胞周期に大きな影響を与える事を見出した。これらのデータは間質細胞から生成される細胞外基質である Decorin の作用により EMT が制御されている可能性を示唆している。以上から細胞外基質蛋白である Decorin を介した機構を解明する事で、子

宮内膜細胞の浸潤・転移のメカニズムを明らかにできると考え本研究を計画した。

2. 研究の目的

細胞外基質蛋白 (Decorin) を介した子宮内膜細胞の浸潤・転移メカニズムの解明に向けた基礎的・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) 卵巣子宮内膜症から分離した不死化細胞株 EMOsis、cc/TERT 細胞株、また不死化内膜間質細胞株 CRL-4003 細胞株にプロゲステロン、ディナゲストを添加し、デコリンの発現を RT-PCR 法、Western blot 法で検討した。またディナゲスト投与濃度によるデコリン分泌量を ELISA 法で測定した。

(2) ディナゲスト投与による EMOsis、cc/TERT、CRL-4003 の cell viability を MTS assay により解析した。またデコリン siRNA、デコリン中和抗体添加時の cell viability も測定した。

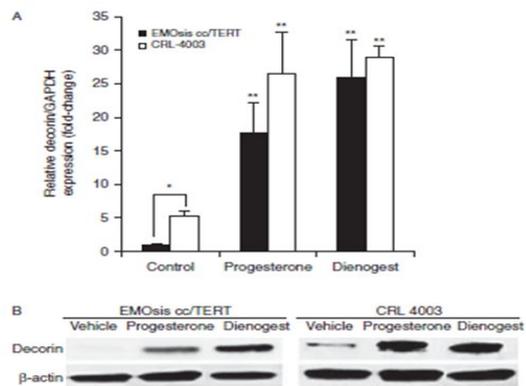
(3) プロゲステロンとディナゲストがデコリン発現に関与しているか否かを解析するために、デコリンプロモーター領域に PR がリクルートされるかどうかを Chip assay を行い解析した。

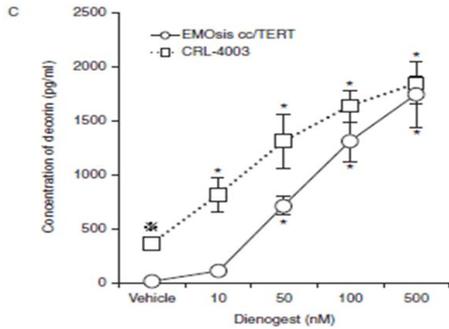
(4) プロゲステロン、ディナゲスト投与時の細胞周期をフローサイトメトリーで解析した。また同時に CDKN1A 遺伝子にコードされる p21 蛋白質の発現を Western blot 法で解析した。

(5) ディナゲストを使用した子宮内膜症組織においてデコリンの免疫染色を行い、その発現量をコントロール群 (ディナゲスト不使用群) と比較検討した。

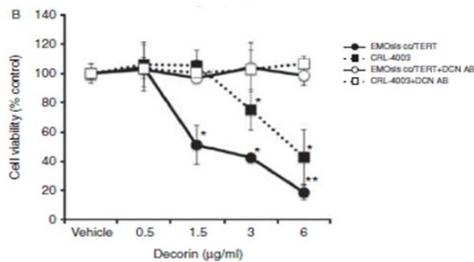
4. 研究成果

(1) EMOsis、cc/TERT、CRL-4003 細胞いずれにおいてもプロゲステロン、ディナゲスト添加によりデコリン分泌量の増加が認められた。またデコリン投与濃度依存性にデコリン分泌量が増加する事が判明した。

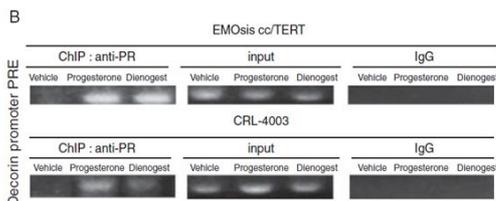




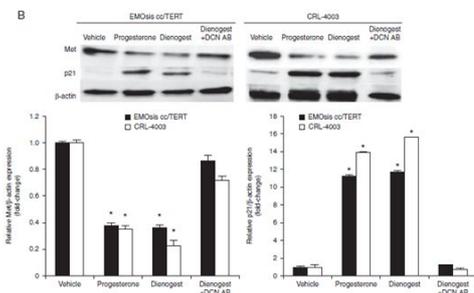
(2) デコリン SiRNA、デコリン中和抗体を添加する事でデコリンの作用（増殖抑制作用）が解除された。



(3) Chip assayによりPRがデコリンプロモーター領域にリクルートしている事が判明した。

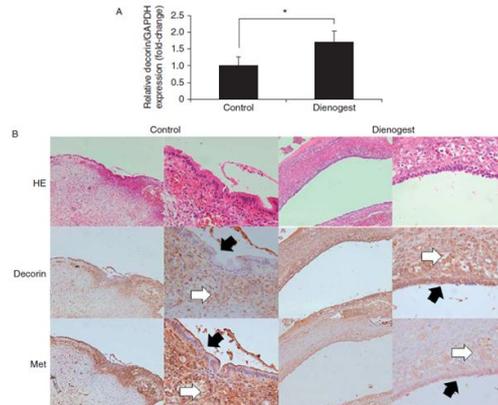


(4) プロゲステロン、ディナゲストにより誘導されるデコリンはp21(CDKN1A)を介して細胞周期を制御している事が判明した。



(5)

臨床検体を用いた検討で、ディナゲスト使用した群ではコントロール群と比較してデコリン蛋白がより高発現していた。



以上の結果から、子宮内膜症組織において、プロゲステロンやディナゲストにより誘導されるデコリン蛋白質は、p21を介して細胞周期を制御する事で、細胞増殖を抑制している事が示唆された。

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 T, Terai Y, Kogata Y, Ashihara K, Maeda K, Fujiwara S, Yoo S, Tanaka Y, Tsunetoh S, Sasaki H, Kanemura M, Tanabe A, Ohmichi M. CD24 expression as a marker for predicting clinical outcome and invasive activity in uterine cervical cancer. *Oncol Rep.* 査読有 34、2015、2282-8

Ono YJ, Tanabe A, Tanaka T, Tanaka Y, Hayashi M, Terai Y, Ohmichi M. Met Signaling Cascade Is Amplified by the Recruitment of Phosphorylated Met to Lipid Rafts via CD24 and Leads to Drug Resistance in Endometrial Cancer Cell Lines. *Mol Cancer Ther.* 査読有 14、2015、2353-63

Tanaka T, Terai Y, Ono YJ, Fujiwara S, Tanaka Y, Sasaki H, Tsunetoh S, Kanemura M, Yamamoto K, Yamada T, Ohmichi M. Preoperative MRI and intraoperative frozen section diagnosis of myometrial invasion in patients with endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 査読有 25、2015、879-83

Tanaka T, Terai Y, Ono YJ, Fujiwara S, Tanaka Y, Sasaki H, Tsunetoh S, Kanemura M, Ohmichi M. Genitofemoral neuropathy after pelvic

lymphadenectomy in patients with uterine corpus cancer. Int J Gynecol Cancer. 査読有 25、2015、533-6

Takai M, Terai Y, Kawaguchi H, Ashihara K, Fujiwara S, Tanaka T, Tsunetoh S, Tanaka Y, Sasaki H, Kanemura M, Tanabe A, Ohmichi M. The EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression indicates the metastatic status and prognosis in patients with ovarian cancer. J Ovarian Res. 査読有 7、2014、76-83

Kawaguchi H, Terai Y, Tanabe A, Sasaki H, Takai M, Fujiwara S, Ashihara K, Tanaka Y, Tanaka T, Tsunetoh S, Kanemura M, Ohmichi M. Gemcitabine as a molecular targeting agent that blocks the Akt cascade in platinum-resistant ovarian cancer. J Ovarian Res. 査読有 7、2014、38-44

〔学会発表〕(計 5 件)

田中良道、卵巣線維種に対する腹腔鏡下手術の有用性について、婦人科内視鏡学会、2014 9、鹿児島

田中良道、卵巣癌におけるベバシズマブの有用性と当科での使用経験、オープンクリニカルカンファ、2014 11、大阪

田中良道、婦人科 TC 療法における支持療法の必要性、オープンクリニカルカンファ、2015 5、大阪

田中良道、MPA treatment for early stage endometrial cancer and atypical endometrial hyperplasia complex.

日本産科婦人科学会、2015 4、横浜

田中良道、当院における再発卵巣癌に対するベバシズマブ併用化学療法の検討、近畿産婦人科学会、2015 10、兵庫

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