

学位論文要旨

氏名 栃本 昌孝



論文題目

「S100A4/non-muscle myosin II signaling regulates epithelial-mesenchymal transition and stemness in uterine carcinosarcoma」

(子宮癌肉腫における S100A4 と非筋細胞ミオシン II 系による上皮・間葉転換と癌幹細胞化機構の解明)

(以下要旨本文)

指導教授承認印

三根 信



「S100A4/non-muscle myosin II signaling regulates epithelial-mesenchymal transition and stemness in uterine carcinosarcoma」

(子宮癌肉腫における S100A4 と非筋細胞ミオシン II 系による上皮・間葉転換と癌幹細胞化機構の解明)

氏名 栃本昌孝

【緒言】

子宮癌肉腫(Uterine carcinosarcoma:UCS)は高悪性度の腫瘍であり、病理学的に癌成分と肉腫成分を有している。近年の研究から、多くの UCS は単クローン性で、癌成分と肉腫成分は共通の起源から発生していることが示唆されており、それに深く関与するのが上皮・間葉転換(Epithelial-mesenchymal transition:EMT)である。

EMT とは既存の癌成分が間葉系の特性を獲得することであり、また腫瘍の浸潤や転移に深く関係していると考えられる。癌成分の EMT から癌幹細胞が発生する、いわゆる癌幹細胞化(Cancer stem cell:CSC)が生じ、これを起源として肉腫成分が派生することが知られている。

S100A4 は、20 種類以上の S100 ファミリーに属する Ca 結合タンパクで、酵素活性は持たないが、p53 や非筋細胞ミオシン(Non-muscle myosin II: NMII)などに結合してその機能を抑制する。最近、膠芽腫で EMT ならびに CSC の過程に S100A4 発現が増加する報告や、乳癌や胸膜中皮腫で S100A4 と EMT との関係の報告がされている。しかし、UCS での S100A4 の機能は不明である。そこで本研究では UCS の臨床検体と子宮内膜癌培養細胞を用い、S100A4 が EMT ならびに CSC を誘導するかを検討した。

【材料・方法】

子宮内膜癌細胞(Ishikawa 細胞ならびに Hec6 細胞)で S100A4 ノックダウン細胞株および恒常的 S100A4 過剰発現細胞株を作製した。それぞれの細胞株でのタンパク発現(Western blotting), 増殖能検討(Cell Counting Kit-8 assay), 細胞周期解析(Flow cytometry), 移動能検討(Wound healing assay, Migration assay)を行った。さらに、S100A4 による免疫沈降後のショットガンプロテオミクスにより、S100A4 のパートナー分子を同定した。

臨床検体は、外科的に切除された 35 例の UCS 検体で、S100A4, NMII A, ALDH1, Sox2, pp65, Slug, Vimentin, E-cadherin, Ki-67 の発現を免疫組織化学的に検索した。

【結果】

S100A4 は NF- κ B/p65 経路と関係する

S100A4 発現は炎症反応と関連する。そこで、S100A4 と炎症性マーカーである NF- κ B 系との関連性を検索した。Ishikawa 細胞を TNF- α で処理すると、NF- κ B の構成タンパクの 1 種である p65 の核内発現と一致して S100A4 発現増加を認めた。p65 濃度依存

性に, S100A4 のプロモーター活性は p65 の量依存性に増加し, 同時に S100A4 の転写亢進を伴った. 細胞内での S100A4 の発現部位は, 細胞質および核に認められ, その発現は G2/M 期で著明に増加した. 以上より, S100A4 発現は NF- κ B/p65 により誘導され, 細胞周期で変動することが明らかになった.

S100A4 は腫瘍細胞の移動能を亢進させる

S100A4 の発現と細胞増殖能との関連性を検索した. 恒常的 S100A4 過剰発現細胞はコントロールに比べて, 移動能の亢進と増殖抑制, S100A4 ノックダウン細胞は反対の動態を示した

S100A4 は CSC を誘導する

S100A4 の発現と癌幹細胞化マーカー発現との関連性を検索した. 恒常的 S100A4 過剰発現細胞では, 幹細胞マーカーである CD133, N-cadherin, ALDH1, Sox2 の発現増加を認めた. 一方, S100A4 ノックダウン細胞ではこれらの幹細胞化マーカー発現の抑制を認めた. Aldefluor 解析及びスフェロイドアッセイでも同様に恒常的 S100A4 過剰発現細胞は S100A4 ノックダウン細胞に比べ, 癌幹細胞分画の増加やスフェロイド形成亢進を認めた.

NMIIA は S100A4 のパートナー分子である

S100A4 は非酵素的に細胞内および細胞外タンパク質 (パートナー分子) と結合してその機能を抑制する. そこで S100A4 のパートナー分子を同定するために, 恒常的 S100A4 過剰発現細胞で S100A4 による免疫沈降を行い, その沈降物のショットガンプロテオミクスを解析し, その結果として NMIIA を同定した.

NMIIA を特異的に阻害するブレビスタチンで子宮内膜癌細胞を処理すると, 細胞形態が線維芽細胞様に変化すると同時に, SA- β -gal 陽性細胞の senescence 細胞の増加を認めた. 細胞増殖能の低下や G2/M 期の細胞集団の増加, 移動能の亢進を認めた. 更に, ALDH1, ビメンチン, pSmad2, Slug, ZEB1, および Twist1 などの EMT/CSC 関連マーカーの発現増加を認めた. 以上より, ブレビスタチン投与で NMIIA の機能を抑制すると, 恒常的 S100A4 過剰発現細胞と同様の所見を得た.

UCS での S100A4 と幹細胞化マーカー発現

35 例の UCS に対して S100A4 と幹細胞化マーカー発現を検索した. S100A4 と ALDH1 は核と細胞質に陽性, NMIIA とビメンチンは細胞質に陽性, pp65, Sox2, Slug, Ki-67 は核もしくは細胞膜に陽性であった. これらは, 癌成分と肉腫成分の両方で類似していた. また, 癌成分よりも肉腫成分において, S100A4, ALDH1, Slug, ビメンチン陽性の強度は高かった. S100A4 の発現と ALDH1, Slug, Vimentin の発現とは正の相関を示した. 一方, Ki-67 とは負の相関を示した.

【考察】

子宮内膜癌細胞の TNF- α などの炎症性サイトカイン処理により, NF- κ B/p65 系を介して転写レベルでの S100A4 発現が増加したことは, S100A4 発現が小微細環境により発現制御される可能性がある. また, S100A4 発現は G2/M 期で発現増加し, 細胞増殖に

対して抑制的に作用することから、S100A4 は細胞周期、特に G2/M チェックポイントで抑制因子として機能する可能性を得た。今後、更なる検索でこれらの可能性を検証する予定である。

細胞増殖と移動は相反関係にあるという報告に一致して、恒常的 S100A4 過剰発現細胞では細胞増殖能の抑制と細胞移動能の亢進が認められた。さらに EMT を窺う紡錘形細胞への形態的变化と CSC 関連マーカーの発現増加、Aldefluor 解析による癌幹細胞分画の増加やスフェロイド形成亢進を認めた。一方、S100A4 ノックダウン細胞では反対の動態を示した。EMT は CSC 化を促進することから、子宮内膜癌細胞では S100A4 発現により、EMT/CSC 化が促進されることが示唆された。

上記メカニズムを解明する手段として、S100A4 のパートナー分子の検出を恒常的 S100A4 過剰発現細胞での S100A4 免疫沈降物の網羅的解析で行い、NMIIA を同定した。NMIIA は細胞骨格を構成するタンパク質で、細胞分裂や移動に関与する。NMIIA の ATP 活性を特異的に抑制するプレビスタチンにより、子宮内膜癌細胞が EMT/CSC 化を呈したことから、S100A4 による NMIIA 機能抑制にて、EMT/CSC 化が誘導・促進されることが示唆された。

最後に、UCS の臨床検体の検索で、S100A4 は癌成分よりも肉腫成分で過剰発現し、かつ各種 CSC 関連タンパク発現と正の相関を示したことから、S100A4 が UCS の腫瘍発生、特に肉腫成分の派生に重要な役割を演じると考えた。

本研究は、高悪性度の腫瘍である UCS の腫瘍発生・進展機構を解明することで、分子標的薬などの新たな治療薬開発につながることを期待される。