

氏 名	中 村 起 代 子
(ふ り が な)	(な か む ら き よ こ)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 29 年 6 月 28 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 名	CD24 expression is a marker for predicting clinical outcome and regulates the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer via both the Akt and ERK pathways (卵巣癌における CD24 の臨床的意義及び Akt・ ERK シグナル伝達系を介した上皮間葉転換制御に 関する機能解析)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 朝 日 通 雄 教授 廣 瀬 善 信 教授 高 井 真 司

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《研究目的》

約 70%の症例が進行癌で診断される卵巣癌は生存率の最も低い婦人科癌である。その理由として、腹腔内播種や転移をきたしやすい卵巣癌においては手術療法が不十分であること、術後化学療法において抗癌薬に対する耐性獲得が高頻度に起こること等が挙げられる。特に転移病巣は抗癌薬耐性を示すことが知られている。そのため卵巣癌の予後改善には腹腔内播種や転移のメカニズムの解明と制御が重要である。浸潤・転移には癌細胞が上皮細胞から間葉細胞へと性質を転換する EMT (Epithelial-mesenchymal transition) 現象の関与が提唱されており、EMT を起こす細胞は抗癌薬耐性を持ち癌幹細胞に類似した特徴を有す

ることもわかってきた。近年、卵巣癌の予後悪化因子として研究されている CD24 について、卵巣癌において癌幹細胞マーカーであるとするものや、P セクレチンの結合基として血管内皮細胞や血小板の付着受容体の役割を持つなどの細胞間接着に関連するなどの様々な報告がなされている。そこで今回、卵巣癌における CD24 の発現意義と EMT との関連およびその機序について検討した。

《材料および方法》

1. 臨床検体の免疫染色による CD24 発現の臨床的意義についての検討

2001 年より 2009 年までに当科で手術を施行した卵巣癌 I～IV 期の症例 174 例を対象とした。病理標本から Tissue microarray を作製し、抗 CD24 抗体による免疫染色を行った。組織型、進行期、腹水細胞診結果、腹腔内播種の有無、リンパ節転移の有無、再発、予後と CD24 の発現の関連を解析した。PFS (Progression-free survival)、OS (Overall survival) の解析には Kaplan-Meier 法を用いた。

2. 卵巣癌細胞株 (Caov-3 細胞) を用いた *in vitro* での CD24 の機能解析

2-1) Caov-3 細胞を TGF- β の添加または 1% 低酸素状態下におき EMT 関連因子である Snail、E-cadherin と CD24 の mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて検討した。

2-2) CD24 発現ベクターを Lipofectamin 法により遺伝子導入し CD24 を過剰発現させた細胞 (CD24 強発現細胞)、同様に siRNA を遺伝子導入し CD24 をノックダウンした細胞 (CD24 減弱細胞)、Magnetic cell sorting (MACS) 法で分離した CD24 陽性細胞と CD24 陰性細胞を準備し以下の実験を行った。

A) CD24 強発現細胞における Snail、E-cadherin と CD24 の mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて検討した。

B) CD24 陰性細胞と陽性細胞の形態変化を観察した。

C) CD24 陰性細胞と陽性細胞の Colony formation を Soft agar assay 法を用いて観察した。

D) CD24 陰性細胞と陽性細胞の増殖能を Cell count 法により検討した。

- E) CD24 強発現細胞と CD24 減弱細胞の浸潤能を Matrigel でコーティングした膜を用いた Invasion assay 法により検討した。
- F) CD24 陰性細胞、陽性細胞、強発現細胞、減弱細胞にシスプラチンを添加し Cell viability を MTS assay 法で検討した。
- G) CD24 陰性細胞と陽性細胞を分離後培養し 7 日後の各々の CD24 陰性細胞と陽性細胞の分布を Flow cytometry を用いて検討した。
- H) CD24 強発現細胞における TGF- β 添加による EMT 誘導時の Akt、ERK、NF- κ B のリン酸化を p-Akt、p-ERK、p-NF- κ B 抗体を用い、Western blotting 法で検討した。

3. *in vivo* での検討

MACS 法にて分離した CD24 陰性細胞と陽性細胞を各 10 匹の 5 週齢のメスの nude mice に腹腔内投与し、50 日後の腹囲、腹水量、転移病巣重量を比較検討した。

《結果》

1. 免疫染色の結果 CD24 陽性群は陰性群と比較し Serous adenocarcinoma や Serous surface papillary carcinoma で多く (87.5% , 84.6%, $p<0.01$)、進行例が多く (I 期 53.6%, II 期 78.6%, III 期 77.7%, IV 期 79.0%, $p<0.001$)、腹腔内播種 (78.7% vs 21.3%, $p<0.01$)、リンパ節転移 (87.9% vs 12.1%, $p<0.01$) の割合が有意に高かった。また全患者の 54% が再発し (80.9% vs 19.1%, $p<0.01$)、33.9% が死亡し (81.4% vs 18.6%)、PFS (中央値時間 18.8 か月 vs 112.7 か月, $p<0.01$) と共に OS (5 年生存率 49% vs 74%, $p<0.05$) が CD24 陽性群では陰性群に比べ有意に短縮した。

- 2-1) TGF- β の添加と 1% 低酸素状態下の両条件ともに EMT 現象の特徴である Snail の発現増強、E-cadherin の発現減弱と CD24 発現増強が認められ、EMT 現象と CD24 の発現増強が関連している可能性が示唆された。

2-2)

- A) CD24 強発現細胞において Snail の発現増強と E-cadherin の発現減弱を認め、CD24 の強制発現が直接的に EMT 現象を起こすことを示唆した。

- B) CD24 陽性細胞では陰性細胞と比較し間葉系の細胞に類似した紡錘形に形態変化していた。
- C) CD24 陽性細胞は陰性細胞と比較し有意にコロニーの形成が増強した。
- D) CD24 陽性細胞は陰性細胞と比較して有意に増殖能が高かった。
- E) CD24 を強制発現した場合 Control と比較し有意に浸潤能が高く、減弱させた場合抑制された。
- F) CD24 陰性細胞と比べ陽性細胞ではシスプラチンに対する IC50 が高く耐性が高いことが判明した。CD24 減弱細胞と比較し CD24 強発現細胞においても同様の結果であった。
- G) 培養後の分布をみると CD24 陰性細胞からは陽性細胞の出現が 12.6%であったが、陽性細胞からは陰性細胞と陽性細胞がそれぞれ 33.5%と 66.5%の割合で出現した。
- H) Western blotting 法において TGF- β により Akt、ERK、NF- κ B のリン酸化を認めた。さらに、CD24 強発現細胞では TGF- β 添加時に比べ有意に Akt や ERK、NF- κ B のリン酸化が増強していた。
3. CD24 陰性細胞腹腔内投与群に比較し陽性細胞投与群のマウスにおいて著明に腹膜播種病巣を認め、腹囲、腹水量、転移病巣重量のいずれも有意に増加していた。

《結論》

本研究結果より、CD24 の発現は卵巣癌において予後不良因子であり、特に FIGO stage と相関し腹腔内播種、リンパ節転移、再発が有意に高いことから、浸潤・転移に関わる可能性が示唆された。*in vitro*における検討で CD24 陽性細胞は EMT 現象を誘導することが示された。また、CD24 陽性細胞が抗がん剤耐性をもち、高い増殖能やコロニー形成能、浸潤能および自己複製能、分化能などの特性をもち、加えて *in vivo*における腫瘍形成能も認め、CD24 陽性細胞が卵巣癌において癌幹細胞様細胞の特徴を持っていることが示唆された。さらに、CD24 は Akt および ERK といった細胞生存・増殖シグナルを介して EMT 現象を起こしていることを明らかにした。以上より、卵巣癌において

CD24 発現細胞は癌幹細胞様細胞として抗がん剤耐性や浸潤・転移を起こし、卵巢癌患者の予後不良因子となっている可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

進行期卵巣癌は婦人科悪性腫瘍の中でも予後不良であり、腹腔内播種や転移の頻度が高いことおよび化学療法への耐性がその要因となっている。本研究は悪性腫瘍が浸潤・転移する際の上皮間葉転換現象である EMT (Epithelial-mesenchymal transition) 関連因子であり、癌幹細胞様の特徴を持つとの報告もある CD24 に注目し、卵巣癌における CD24 の発現意義と EMT との関連機序の解析を行ったものである。

申請者は卵巣癌患者 174 症例を対象とし CD24 の臨床病理学的発現意義を検討した。その結果 CD24 の発現が FIGO stage と相関し播種・転移・再発の促進、さらには無病生存率および全生存率の短縮に有意に関連していた。さらに CD24 の特性と浸潤・転移との関わりについて卵巣癌細胞株 Caov-3 を用いた *in vitro* および *in vivo* の実験で検討した。まず初めに EMT を誘導する条件下で CD24 の発現が増強し、また CD24 の強発現により Snail の発現増強および E-cadherin の発現減弱という EMT の特徴的表現型の発現を認めた。次に CD24 を強制発現させた細胞および magnetic cell sorting 法で分離した CD24 陽性細胞を用いた検討で、細胞の増殖、コロニー形成や浸潤が有意に高く、シスプラチン添加により有意に IC50 が高く、*in vivo* にて有意に腹腔内に腫瘍形成を認めた。また、それぞれの現象は CD24 のノックダウンや陰性細胞では抑制され、CD24 発現細胞に特異的であることも確認した。さらに、CD24 の発現増強により TGF- β 添加時と同様に Akt、ERK、NF- κ B がリン酸化することを示した。

申請者は本研究を通して CD24 が卵巣癌の浸潤・転移に関わる予後不良因子であり、CD24 が癌幹細胞様細胞の特徴を有することおよび細胞の生存や増殖に関わる Akt・ERK のシグナル経路を介し卵巣癌の浸潤・転移を誘導し EMT 現象を引き起こすことを解明した。CD24 が進行期卵巣癌の新たな治療のターゲットとなりうる可能性もあり、本研究は今後の進行期卵巣癌の治療戦略、ひいては癌の転移機構解析において基盤となる貴重な知見を提供するものと考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学

位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Oncology report 2017 Apr 19 doi: 10.3892/or.2017.5583 <オンライン掲載>