

**Decreased carbonyl reductase 1 expression promotes tumor growth via epithelial
mesenchymal transition in uterine cervical squamous cell carcinoma .**

子宮頸部扁平上皮癌におけるカルボニルリダクターゼ 1 の発現低下は
上皮間葉転換を介して腫瘍増殖を亢進させる

西本 裕喜

山口大学大学院医学系研究科
情報解析医学専攻 生殖・発達医科学領域 産科婦人科学分野

平成 30 年 4 月

目次

| | |
|----------|----|
| 要旨 | 3 |
| 研究の背景と目的 | 4 |
| 方法 | 5 |
| 結果 | 8 |
| 考察 | 14 |
| 結語 | 15 |
| 謝辞 | 15 |
| 参考文献 | 15 |

【要旨】

目的；カルボニルリダクターゼ 1(以下 CBR1)は癌の進展に関与している。我々はこれまでに、子宮頸癌患者において CBR1 発現の低下が予後不良と密接に関連することを報告した。今回、CBR 1 の発現低下による癌の進展機序が上皮間葉転換 (EMT) を介したものであるかを検討した。さらに、その場合には、実際にどのような遺伝子発現が変化し、どのような pathway を経たものであるのかも検討した。

方法；CBR 1 のアンチセンス cDNA と空ベクターを用いたコントロール cDNA をヒト子宮頸癌細胞株 SKG II と SiHa に遺伝子導入し、in vitro で細胞増殖能と EMT 関連マーカーの発現状況を解析した。また In vivo で 1.0×10^7 個のアンチセンスクローンとコントロールクローンをそれぞれ BALB/c ノードマウスの皮下に移植し、その後 8 週間にわたって腫瘍形成能を評価した。その後腫瘍を摘出し、EMT 関連マーカーの発現状況と遺伝子発現の解析を行った。

結果；In vitro では、CBR 1 の発現抑制株の腫瘍増殖能が亢進し、上皮マーカーである E-cadherin と cytokeratin の発現低下と間葉マーカーである fibronectin、 α -SMA と N-cadherin の発現増加を認め、EMT の誘導が示唆された。In vivo でも CBR 1 の発現抑制株を移植したマウスの腫瘍径は、コントロール群と比較して有意に増大していた。摘出腫瘍組織において遺伝子解析した結果は、down-regulate された遺伝子に E-cadherin が含まれ、up-regulate した遺伝子には fibronectin が含まれていた。また IPA 解析を行ったところ、EMT に関連のある Wnt / β -catenin 経路および TGF- β を介した経路が確認された。

結論；子宮頸部扁平上皮癌において、CBR 1 の発現低下は、EMT の誘導を介し、腫瘍の進展を促していることが示された。本研究は、CBR1 を標的とした子宮頸癌の新規治療戦略につながる可能性がある。

1, 【研究の背景と目的】

カルボニルリダクターゼ 1 (以下 CBR1) は、主に単量体として細胞質内に存在する NADPH 依存性の還元酵素である[1,2]。これまでに様々なカルボニル化合物 (抗腫瘍効果をもつアントラサイクリン誘導体であるダウノルビシンやドキソルビシン、そしてプロスタグランジンなど) を分解する機能に関して広く研究されてきた[3,4]。また CBR1 は、肝臓、腎臓、乳房、卵巣、および血管内皮細胞を含む様々な臓器に存在しており、その主要な機能は脂肪酸代謝にあると考えられているが[5]、興味深いことに癌細胞において悪性を制御することも示されている。例えば卵巣癌や子宮頸癌または子宮内膜癌における CBR1 の発現低下は細胞増殖能や腫瘍形成能を亢進させ、同時に E-cadherin の発現減弱と MMP の活性化を伴っていることが報告されている[6-10]。従って CBR1 の発現低下により腫瘍増殖および転移活性が促進され、リンパ節転移の有無や予後不良と密接に関連している[7,8,10]。卵巣癌においては、CBR1 の発現が増加することで細胞増殖や腫瘍形成が抑制されることも報告されている[9-11]。

悪性腫瘍の中には上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal-Transition:EMT) がその進展に関与しているものがある[12-15]。EMT が誘導されると、E-cadherin の発現が低下し癌細胞の形態が線維芽細胞様に変化する。我々は子宮頸癌において CBR1 の発現を抑制することで、E-cadherin の発現が低下し癌細胞の浸潤能が亢進することを報告してきた[7,8]。さらに子宮体癌においても CBR1 の発現が低下すると EMT が誘導され、癌の浸潤能が亢進することを見出した。従って、子宮頸癌に関しても CBR1 の発現態度が EMT を調節することによって癌の進展に重要な役割を担っているのではないかと考えた。

前述したように、我々は In vitro で CBR1 の発現を抑制することで、E-cadherin の発現が低下し癌の浸潤能が亢進することを報告してきたが[7]、In vivo で実際に腫瘍増殖が促進するかどうか、またその作用機序については不明である。これらを明らかにするために、子宮頸部扁平上皮癌における CBR1 の発現の低下が腫瘍増殖を促進するかどうか、そしてそうであった場合 CBR1 の発現低下と EMT に関連があるかどうかを検討した。

2, 【方法】

2.1 細胞種と培養

ヒト子宮頸部扁平上皮癌細胞株のSiHaとSKG IIを用いた。SiHaは、Cell Resource Center for Biomedical Research（東北大学、仙台、日本）から購入し、SKG IIはHealth Science Research Resources Bank（大阪、日本）から購入した。SiHaは10%FCSを補充したEME培地（Sigma-Aldrich、Tokyo、Japan）で培養し、SKG IIは10%FCSを補充したHam's F12培地（Sigma-Aldrich）中で培養した。細胞を6wellタイプのマイクロプレートに 5.0×10^4 細胞/wellで播種し、その後5%CO₂インキュベーター(37°C)で7日間培養した。細胞をトリプシン処理し、各々の時点における細胞数をcell-counter（Vi-CELL XR; Beckman Coulter、Tokyo、Japan）で計測した[16]。

2.2 遺伝子導入

CBR1の発現を抑制した発現安定株を確立した。我々研究グループがこれまでに報告してきたものと同様の方法で、アンチセンス cDNA を SiHa および SKG II に遺伝子導入した。CBR1の発現が抑制されていることを western blot 法で確認した。空ベクターを遺伝子導入したクローンをコントロールとして使用した。尚事前実験にて、遺伝子導入に使用した試薬が細胞の遊走や CBR1の発現に影響を与えないことは確認している。

2.3 Western blot 法

細胞をラジオイムノアッセイ緩衝液（WAKO、Tokyo、Japan）に懸濁し、超音波処理した。不溶物質を4°Cで10分間20000gで遠心分離することにより除去し、SDS 試料緩衝液（New England BioLabs、Tokyo、Japan）を添加後に試料を5分間煮沸した。タンパク質（10 μ g）を10%SDS-ポリアクリルアミドゲル（PAGE）で電気泳動し、その後タンパク質をセミドライ式で転写膜（New England BioLabs）に転写した。転写膜をブロッキングした後に抗 CBR1 ポリクローナル抗体（Abcam、Tokyo、Japan）、抗 E-cadherin モノクローナル抗体（Abcam）、抗 cytokeratin モノクローナル抗体（Abcam）、ウサギ抗ヒト α -SMA モノクローナル抗体（Abcam）、抗 fibronectin ポリクローナル抗体（Abcam）抗 N-cadherin ポリクローナル抗体（Abcam）（1:1000ブロッキング溶液）を使用した。次いで転写膜を二次抗体を添加しインキュベートし、最後にECL-Western blot 検出試薬（GE Healthcare、Little Chalfont、英国）で5分間インキュベートし、Hyperfilm-ECL（GE Healthcare）を現像用に使用した。

2.4 Real-time PCR

半定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）により、E-cadherin の転写因子 SNAIL の発現を調べた。RNA を RNeasy キット（QIAGEN、Tokyo、Japan）を用い

て単離し、 QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて cDNA を 1 μ g 合成した。RT-PCR は SNAIL (5'-ctccctgtcagatgaggacagt-3' および 5'-tccttgtagcagatatttgcagt-3') の増幅プライマーを用いて、BIOTaq HS DNA ポリメラーゼ (BIOLINE, Tokyo, Japan) を使用し行った。また GAPDH (5'-tgcaccaccaactgcttagc-3' および 5'-ggcatggactgtggcatgag-3') をコントロールとして用いた。熱サイクル条件は、95°Cで 10 分の導入条件から開始し、その後は 95°Cで 30 秒、60°Cで 30 秒、72°Cで 15 秒とし、合計サイクルを GAPDH で 25 サイクル、SNAIL で 32 サイクルとした。合成した PCR 産物を 2%アガロースゲルで電気泳動した。

2.5 動物実験

動物実験は、山口大学動物実験倫理委員会 (認定番号 47-021) により承認を受けた。SiHa 細胞 1.0 \times 10⁷個を雌の BALB / c ノードマウス (4 週齢) に皮下注射した。腫瘍サイズは、注射後 8 週間に渡って測定した。腫瘍体積は下記の如く算出した[19]。

* $V = 0.52 \times A^2 \times B$ (A、腫瘍の最短直径; B、腫瘍の最長直径)

2.6 免疫組織染色

腫瘍移植後 8 週目にマウスをサクリファイスし腫瘍を摘出した。我々がこれまでに報告してきたものと同様のストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体技術によって免疫組織染色を行った[7]。腫瘍標本は 10%緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン処理を行った。組織切片 (厚さ 3 μ m) を脱パラフィン化し、PBS で洗浄後に内因性ペルオキシダーゼを室温で過酸化水素水 (メタノール添加 0.5%) で 50 分間インキュベートすることによってブロッキング処置とした。PBS で洗浄し、非特異的結合を防ぐために 10%ヤギ血清とインキュベートした。一次抗体として抗 CBR1 抗体 (Abcam)、抗 E-cadherin 抗体 (Abcam)、 α -SMA 抗体 (Abcam) を 4°Cで 24 時間インキュベートした。その後、HISTFINE SAB-PO キット (Nichirei, Tokyo, Japan) を用いて切片を洗浄し、ビオチン化抗ラビット免疫グロブリン IgG + IgA + IgM と共に室温で 30 分間インキュベートした。この検体を diaminobenzidine tetrahydrochloride chromogen mixture : DAB (Sigma-Aldrich) とヘマトキシリンで染色した。

免疫組織染色の染色強度は、我々が以前に報告した以下の方法に従って定量化した[20]。

合計スコア = (i) + (ii)

- (i) 陽性細胞の割合 (0%染色陽性細胞; 0 点、染色陽性細胞 50%未満 ; 1 点、染色陽性細胞 > 50% ; 2 点)
- (ii) 染色強度 (欠損; 0 点、弱発現; 1 点、中等度発現; 2 点、強発現 ; 3 点)。

*スコアリングは、各群から得られた 3 つの腫瘍サンプルからの組織切片において 200 倍率でランダムに選択された 10 領域で行った。得点は 3 人の独立した観察者によって行われ、3 人の観察者関連平均を単一観察として評価した。

2.7 Microarray 解析及び pathway 解析

CBR1 に対するアンチセンス cDNA を SKGII に遺伝子導入した。空ベクタークローンを子ントロールとして用い、各クローンのトランスクリプトーム解析を行った。RNeasy キット (QIAGEN) を用いて全 RNA を細胞から抽出した。遺伝子発現は、GeneChip Human Genome 2.0 ST Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA : 40716 個の遺伝子を網羅) を用いて分析した。アンビオン WT 発現キット (Ambion, Austin, TX, USA) および GeneChip WT PLUS 試薬キット (Affymetrix) を用いて 250ng の全 RNA から標的 cDNA を調製した。Microarray へのハイブリダイゼーション、洗浄、染色およびスキャニングは、Scanner 30007 G Workstation Fluidics 450 および Hybridization Oven 645 で構成された GeneChip システム (Affymetrix) を用いて行った。スキャンされた画像データは、Partek Genomics Suite 6.5 ソフトウェアプログラム (Partech, Munster, Germany) を用いて発現分析した。これらの発現遺伝子の内、アンチセンス群の発現が対照群と比較して 1.5 倍以上もしくは 3 分の 2 未満の遺伝子を抽出した。また pathway 解析を Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェア (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA) を用いて行った。

2.8 統計解析

両群の有意差 ($P < 0.05$) は Tukey 検定によって評価した。統計解析は SPSS 5.0 J for Windows ソフトウェアパッケージ (SAS Institute, Inc, Cary, NC, USA) を用いて行った。

3, 【結果】

3.1 CBR1 の発現を抑制した発現安定株の作成

CBR1 の扁平上皮癌細胞の悪性度に対する役割を調べるために、アンチセンス cDNA を SKG II および SiHa に遺伝子導入し、CBR1 発現が抑制されたクローンを確立した。空ベクターを遺伝子導入した細胞をコントロールクローンとして用いた。CBR1 の発現を抑制した SKG II および SiHa クローンが得られた (図 1A)。

3.2 CBR1 の発現抑制が細胞増殖能に与える影響

細胞増殖能に関して、SKG II では増殖アッセイ開始の 7 日目の時点、SiHa では 5 日目と 7 日目の時点で CBR1 の発現抑制群が有意に高かった (図 1B)。

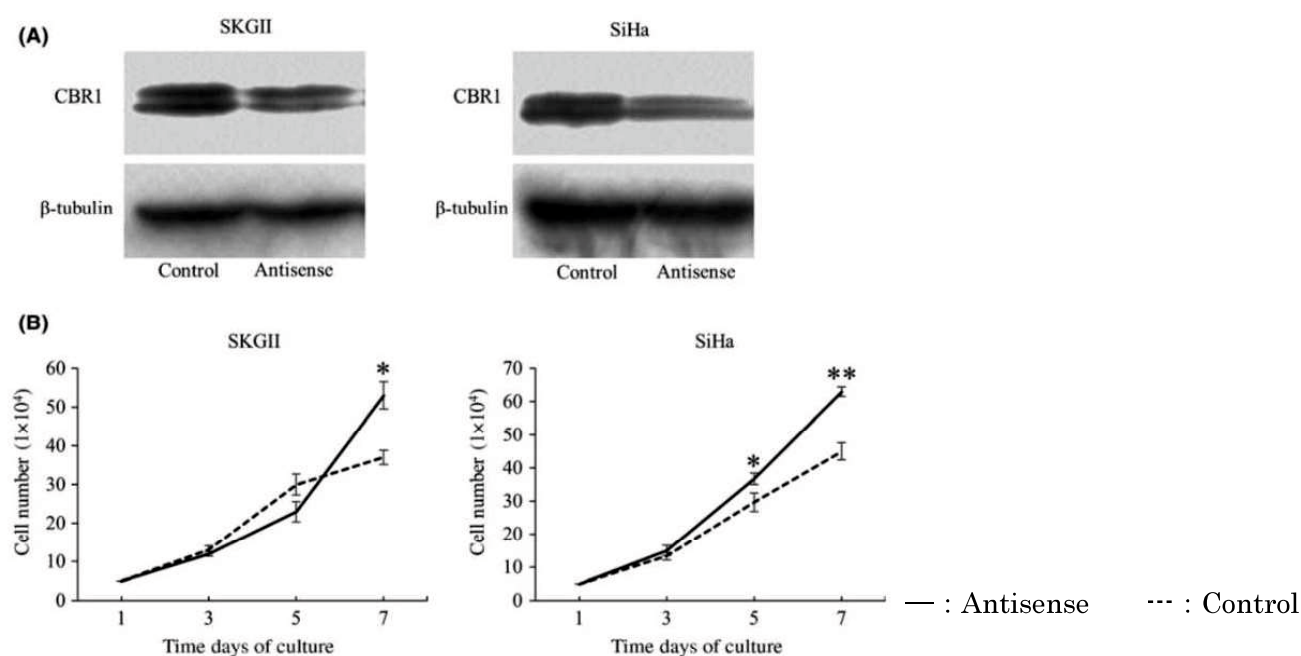


図 1. CBR1 の発現抑制安定株の確立と細胞増殖能の検討

CBR1 に対するアンチセンス cDNA を子宮頸癌細胞株である SKG II 及び SiHa に遺伝子導入し、CBR1 の発現を抑制した安定株を作成した。空ベクターを導入したものをコントロールとして用いた。

- (A) 遺伝子導入した細胞の CBR1 の発現レベルが抑制されていることを Western blot 法にて確認した。 β -tubulin をコントロールとして用いた。
- (B) CBR1 抑制時の癌細胞増殖能について検討した。細胞増殖は播種後の各ポイント (24 時間後、72 時間後、120 時間後、168 時間後) で評価した。

* $p < 0.05$ vs control ** $p < 0.01$ vs control

3.2 CBR1 の発現抑制が上皮間葉転換マーカーに及ぼす影響

上皮マーカーである E-cadherin と cytokeratin の発現レベルは CBR1 アンチセンス群で有意に低下していた (図 2A)。対照的に、間葉系マーカーである α -SMA、fibronectin、および N-cadherin の発現レベルは、CBR1 アンチセンス群で有意に増加していた (Figure 2A)。

SNAIL は、E-cadherin を抑制し EMT を制御する転写因子であるが、癌の予後における有用な予測因子であることが報告されている [22-26]。RT-PCR で検討した SNAIL の mRNA の発現レベルは、CBR1 アンチセンス群で有意に増加していた (図 2B)。

SiHa と SKGII では EMT 関連マーカーの発現形態に若干の違いがあるようである。同じような現象として、我々は以前に heat-shock-protein70 をノックダウンした際のアポトーシス効果は、SKGII よりも SiHa においてより顕著であることを報告した [12]。EMT 関連マーカーの異なる発現形態は各々の細胞特性に関連している可能性がある。

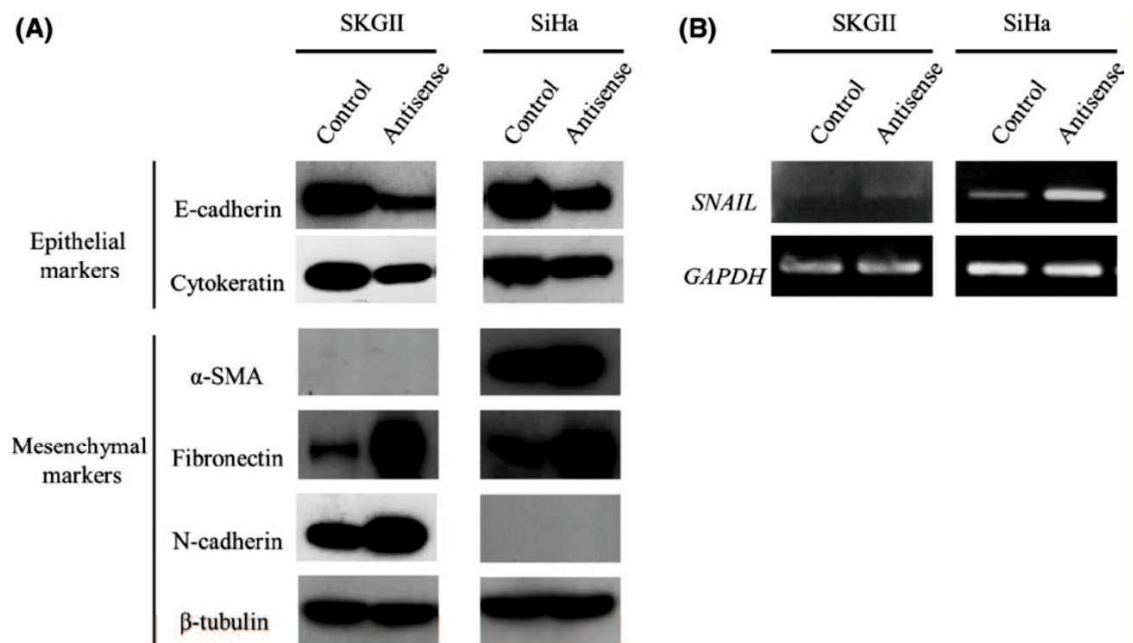


図 2. CBR1 発現抑制時における EMT 関連マーカーの発現

CBR1 に対するアンチセンス cDNA を SKG II および SiHa に遺伝子導入した。空ベクターを遺伝子導入しものをコントロールとして用いた。

- (A) 上皮マーカーである E-cadherin と cytokeratin、間葉マーカーである α -SMA、fibronectin、及び N-cadherin の発現レベルを Western blot 法で分析した。 β -tubulin をコントロールとして用いた。SKG II における α -SMA と SiHa における N-cadherin の発現レベルは低すぎて検出できなかった。
- (B) EMT の転写因子として SNAIL を RT-PCR で検討した。GAPDH をコントロールとして用いた。

3.3 In vivo における CBR1 の発現抑制が腫瘍形成能に及ぼす影響

CBR1 アンチセンス群の腫瘍は、対照群と比較して急速に増大した (図 ; 3A)。また癌細胞移植 8 週後のヌードマウスにおいて、CBR1 アンチセンス群の腫瘍径の方が有意に大きかった (図 ; 3B)。

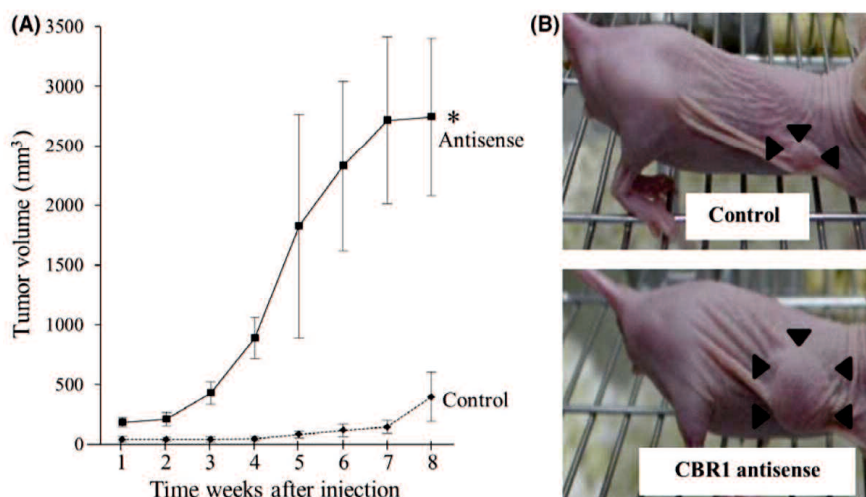


図 3. CBR1 発現抑制細胞移植における腫瘍形成能の検討 (In vivo)

アンチセンス cDNA を遺伝子導入した細胞を 1.0×10^7 個/匹で雌の BALB/c ヌードマウス (4 週齢) に皮下移植した。検討は CBR1 アンチセンス : 9 匹、コントロール : 8 匹で行った。

(A) 腫瘍サイズは移植後 8 週間に渡って毎週計測した。* $p < 0.01$ vs control

(B) 移植 8 週目の腫瘍形成の画像を提示する。

3.4 免疫組織化学染色

CBR1 アンチセンス群の腫瘍は、コントロール群と比較して CBR1 および E-cadherin が弱く染色されたが、 α -SMA は強く染色された (図 4A)。免疫組織化学的発現の定量分析により、CBR1、E-cadherin、および α -SMA の発現に有意差を認めた (図 4B)。以上の結果より、CBR1 の発現を抑制することによって引き起こされる腫瘍の増殖が EMT を介したものであることが示唆される。

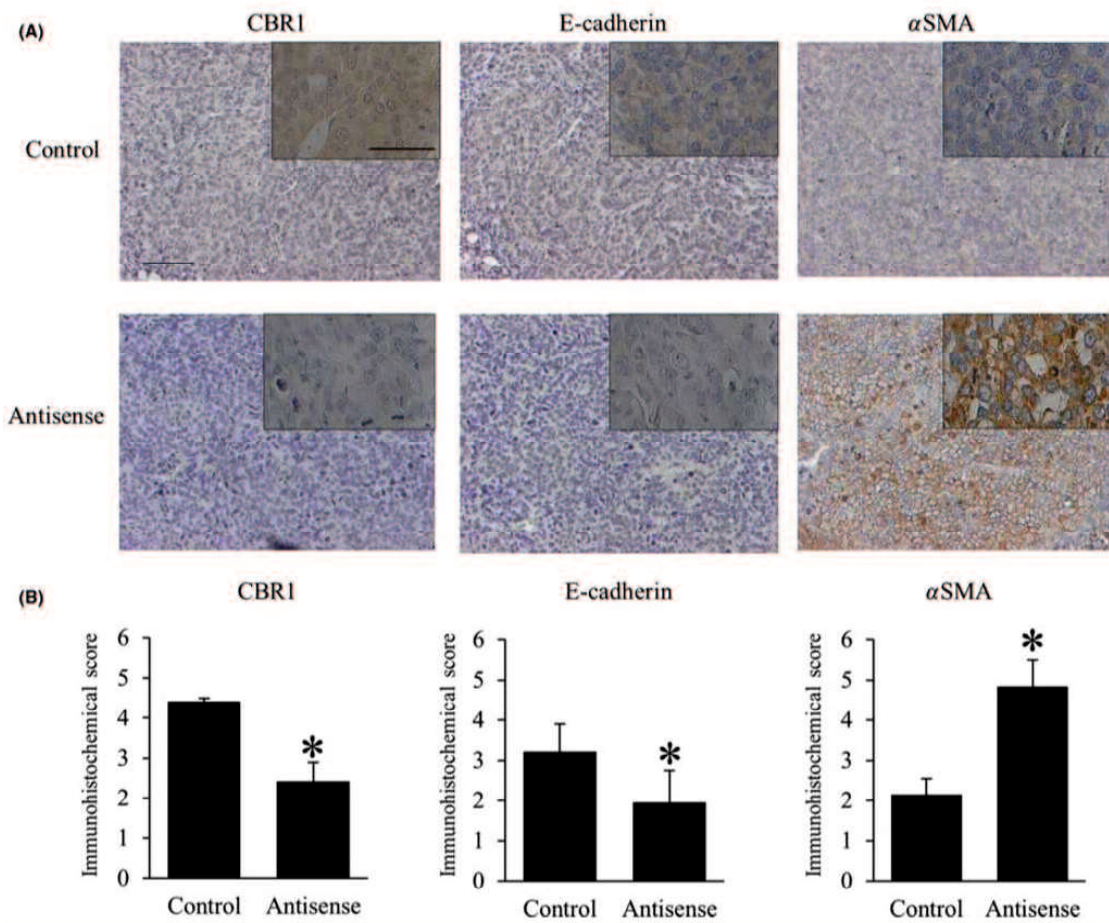


図 4. 摘出腫瘍における CBR1 及び EMT 関連マーカーの発現を免疫組織染色で分析
(A) E-cadherin を上皮マーカー、 α -SMA を間葉マーカーの代表として検討した。写真右上のインサート画像は高倍率(400倍)で撮影したものである。
画像中のスケールバーはそれぞれ低倍率で 50 μ m、高倍率で 100 μ m である。
(B) CBR1、E-cadherin、及び α -SMA の免疫組織化学的発現の定量的分析を行った。
各々3つの腫瘍組織で検討し、図は平均 \pm SE で表記した。
* $p < 0.05$ vs control

3.5 Microarray解析とpathway解析

CBR1がどのようにEMTを制御しているのかを検証するためにMicroarray解析とIPA解析を行った。CBR1を抑制することで457遺伝子が発現増加し、269遺伝子が発現低下した。発現増加した遺伝子および発現低下した遺伝子の内の上位20遺伝子をそれぞれ表1および2に示す。発現低下した遺伝子にはE-cadherinが含まれ、発現増加した遺伝子にはfibronectinが含まれていた。726個の発現増加した遺伝子および発現低下した遺伝子のIPA解析を行ったところ、関連性が想定される制御経路が多く同定された。その上位15経路を表3に示した。その内2つの経路はEMTに関連のあるWnt / β -catenin経路およびTGF- β を介した経路であった。

| Gene symbol | Gene description | Fold change |
|----------------|--|-------------|
| PLXDC2 | Plexin domain containing 2 | 13.61 |
| IFIT1 | Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 | 10.24 |
| OAS2 | 2'-5'-Oligoadenylate synthetase 2, 69/71 kDa | 10.01 |
| OAS1 | 2'-5'-Oligoadenylate synthetase 1, 40/46 kDa | 9.32 |
| IFIH1 | Interferon-induced with helicase C domain 1 | 8.67 |
| PCDHB9/PCDHB10 | Protocadherin beta 9/ protocadherin beta 10 | 8.55 |
| RN5S402 | RNA, 5S ribosomal 402 | 8.18 |
| IFI6 | Interferon, alpha-inducible protein 6 | 7.73 |
| IFITM1 | Interferon-induced transmembrane protein 1 | 7.59 |
| IFI44L | Interferon-induced protein 44-like | 7.34 |
| CCL2 | Chemokine (C-C motif) ligand 2 | 6.83 |
| LIPH | Lipase, member H | 6.79 |
| MX1 | Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse) | 6.70 |
| CDH11 | Cadherin 11, type 2, osteoblast cadherin | 6.45 |
| ANKRD1 | Ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle) | 6.21 |
| FNDC1 | Fibronectin type III domain containing 1 | 6.05 |
| PSG5 | Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 5 | 6.01 |
| PRSS21 | Protease, serine, 21 (testisin) | 5.89 |
| IFIT3 | Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 | 5.62 |
| SNORA46 | Small nucleolar RNA, H/ACA box 46 | 5.40 |

表 1.

CBR1 抑制細胞において発現増加した 457 遺伝子のうち、上位 20 遺伝子を示した。

| Gene symbol | Gene description | Fold change |
|-------------|---|-------------|
| ABI3BP | ABI family, member 3 (NESH) binding protein | 0.12 |
| FAM163A | Family with sequence similarity 163, member A | 0.14 |
| INHBA | Inhibin, beta A | 0.19 |
| LINC00052 | Long intergenic non-protein coding RNA 52 | 0.23 |
| ERP27 | Endoplasmic reticulum protein 27 | 0.24 |
| NPR2 | Natriuretic peptide receptor B/ guanylate cyclase B (atrio-atriuretic peptide receptor B) | 0.27 |
| CDH1 | Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial) | 0.27 |
| TNIK | TRAF2 and NCK interacting kinase | 0.27 |
| ANPEP | Alanyl (membrane) aminopeptidase | 0.28 |
| AK5 | Adenylate kinase 5 | 0.29 |
| VGLL1 | Vestigial like 1 (Drosophila) | 0.29 |
| MAGED1 | Melanoma antigen family D, 1 | 0.29 |
| SPOCK1 | Sparc/osteonectin, cwcv- and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1 | 0.29 |
| NEGR1 | Neuronal growth regulator 1 | 0.30 |
| GRHL2 | Grainyhead-like 2 (Drosophila) | 0.31 |
| FAM27E3 | Family with sequence similarity 27, member E3 | 0.31 |
| RAI2 | Retinoic acid-induced 2 | 0.33 |
| FBXO32 | F-box protein 32 | 0.34 |
| NTRK2 | Neurotrophic tyrosine kinase, receptor type 2 | 0.35 |
| TMLHE | Trimethyllysine hydroxylase, epsilon | 0.35 |

表 2.

CBR1 抑制細胞において発現低下した 269 個の遺伝子のうち、上位 20 個の遺伝子を示した。

| Ingenuity canonical pathway | P-value |
|--|-----------------------|
| Interferon signaling | 7.24×10^{-6} |
| Hepatic fibrosis/hepatic stellate cell activation | 2.75×10^{-4} |
| Role of pattern recognition receptors in recognition of bacteria and viruses | 3.39×10^{-4} |
| Wingless-related integration site/ β -catenin signaling | 4.57×10^{-4} |
| Activation of IRF by cytosolic pattern recognition receptors | 5.13×10^{-4} |
| Extracellular signal-regulated kinase 5 signaling | 2.51×10^{-3} |
| Oncostatin M signaling | 2.82×10^{-3} |
| Integrin-linked kinase signaling | 3.47×10^{-3} |
| Aryl hydrocarbon receptor signaling | 3.63×10^{-3} |
| Transforming growth factor β signaling | 3.80×10^{-3} |
| P2Y Purigenic receptor signaling pathway | 4.47×10^{-3} |
| Unfolded protein response | 4.68×10^{-3} |
| Neurotrophin/transfer RNA-Lys signaling | 4.90×10^{-3} |
| Antiproliferative role of TOB in T cell signaling | 6.31×10^{-3} |
| Thyroid cancer signaling | 6.46×10^{-3} |

表 3.

CBR1 抑制細胞において異常発現が確認された 726 遺伝子（発現増加：457、発現低：269）を、IPA によって分析した。IPA から得られた 59 の標準的な経路のうち、上位 15 の経路を示した。

4, [考察]

我々は、CBR1が抑制されることで子宮頸癌細胞の形態が変化し、浸潤能が増強され、*In vitro*でE-cadherinの発現が低下することを以前に報告した[7,8]。今回の研究では、CBR1発現を低下させることで癌細胞の増殖能は亢進したが、これには上皮マーカーであるE-cadherinとcytokeratinの減少、および間葉マーカーであるfibronectin、 α SMAおよびN-cadherinの増加を伴っていた。この現象は、E-cadherinの転写因子であるSNAILの発現増加と同じくEMTの1つの特徴である[27-31]。さらに、CBR1の発現が抑制された癌細胞は、*In vivo*で高い腫瘍形成能を示した(図3)。以上より、扁平上皮癌細胞において、CBR1の発現抑制がEMTの誘導を介して腫瘍増殖を促進させることが示唆された。本研究結果は、卵巣癌と子宮内膜癌に関するこれまでの諸家の報告とも一致している。卵巣癌においては、CBR1の発現低下がリンパ節転移の有無と密接な関連があり、さらに予後不良因子であることが報告されている[19]。また、我々は、以前にCBR1発現が低下した子宮内膜癌細胞は、EMTが誘導されることによって悪性度が増悪し、予後不良と関連していることを示した【8】。

CBR1がEMTをどのようにして制御しているのかは不明である。本研究により、CBR1の発現が抑制されることによって、TGF- β およびWnt/ β -cateninの細胞内シグナル伝達経路が活性化され(表3)、EMTの調節に重要な役割を果たしていることが示された。今後、TGF- β 刺激により実際にWnt/ β -catenin経路を介してEMTを誘導されるかどうかを検証することはとても興味深いと考える。

卵巣癌の増殖に対するCBR1の阻害効果は、TNF-receptor経路の活性化を介したものであることも報告されているが【11】、本研究のMicroarray解析およびIPA解析ではTNF-receptorシグナルは検出されなかった。子宮頸癌細胞では、CBR1がTNF-receptor経路と相互作用しないのに、なぜ卵巣癌細胞では関連があるのかを説明することは現段階では困難である。しかし、おそらくこの理由として癌の進行に関与する細胞内シグナル伝達経路が癌種ごとに異なっているのではないかと推察する。

CBR1の機能が自身の酵素活性によって制御を受けているかどうかは不明である。我々が行った子宮頸癌細胞における予備実験では、CBR1の酵素活性を阻害する試薬によってE-cadherinの発現減少が確認され、CBR1が部分的に酵素としても働くことが示唆された。

本研究は、CBR1が子宮頸癌を制御する新たな標的分子であることを示唆している。CBR1の発現を増加させることができれば子宮頸癌治療の新たな戦略となり得る。本研究ではCBR1の過剰発現が癌細胞の悪性度に及ぼす影響については検討していないが、MMPの分泌は減少させた[7]。興味深いことに、CBR1はペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 α (PPAR α)のリガンドであり、高脂質血症の治療に使用されるクロフィブリン酸は卵巣癌におけるCBR1の発現を増加させ、腫瘍増殖を阻害することが報告された[41]。従って、クロフィブリン酸は子宮頸癌における有望な治療戦略になる可能性がある。

5. 【結語】

現在、子宮頸癌は若年女性の間で最も一般的な死因である。HPVに有効なワクチンは存在するが、進行癌および再発患者を治療することは依然として困難である。本研究は、CBR1を標的とした子宮頸癌の新規治療戦略につながる可能性がある。

6. 【謝辞】

本研究は文部科学省の基礎研究 20591950、20591950、26462525、23592452、によって資金提供されている。

7. 【参考文献】

1. Penning TM, Drury JE. Human aldoketo reductases: function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Arch Biochem Biophys.* 2007;464:241-250.
2. Mindnich RD, Penning TM. Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: genomics and annotation. *Hum. Genomics.* 2009;3:362-370.
3. Miura T, Nishinaka T, Terada T. Different functions between human monomeric carbonyl reductase 3 and carbonyl reductase 1. *Mol Cell Biochem.* 2008;315:113-121.
4. Gonzales-Covarrubias V, Ghosh D, Lakhman SS, Pendyala L, Blanco JG. A functional genetic polymorphism on human carbonyl reductase 1 (CBRV881) impacts on catalytic activity and NADPH binding affinity. *Drug Metab Dispos.* 2007;35:973-980.
5. Wermuth B, Bohren KM, Heinemann G, vonWartburg JP, Gabbay KH. Human carbonyl reductase. Nucleotide sequence analysis of a cDNA and amino acid sequence of the encoded protein. *J Biol Chem.* 1988;263:16185-16188.
6. Ismail E, Al-Mulla F, Tsuchida S, et al. Carbonyl reductase: a novel metastasis-modulating function. *Cancer Res.* 2000;60:1173-1176.
7. Murakami A, Fukushima C, Yoshidomi K, et al. Suppression of carbonyl reductase expression enhances malignant behavior in uterine cervical squamous cell carcinoma: carbonyl reductase predicts prognosis and lymph node metastasis. *Cancer Lett.* 2011;311:77-84.
8. Murakami A, Yakabe K, Yoshidomi K, et al. Decreased carbonyl reductase 1 expression promotes malignant behaviours by induction of epithelial mesenchymal transition and its clinical significance. *Cancer Lett.* 2012;323:69-76.
9. Osawa Y, Yokoyama Y, Shigeto T, Futagami M, Mizunuma H. Decreased expression of carbonyl reductase 1 promotes ovarian cancer growth and proliferation. *Int J Oncol.* 2015;46:1252-1258.

10. Umemoto M, Yokoyama Y, Sato S, Tsuchida S, Al-Mulla F, Saito Y. Carbonyl reductase as a significant predictor of survival and lymph node metastasis in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2001;85:1032-1036.
11. Miura R, Yokoyama Y, Shigeto T, Futagami M, Mizunuma H. Inhibitory effect of carbonyl reductase 1 on ovarian cancer growth via tumor necrosis factor receptor signaling. *Int J Oncol*. 2015;47:2173-2180.
12. Bates RC, Mercurio AM. The epithelial–mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. *Cancer Biol Ther*. 2005;4:365-370.
13. Ahmed N, Abubaker K, Findlay J, Quinn M. Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes facilitate chemoresistance in recurrent ovarian cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010;10:268-278.
14. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15:178-196.
15. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial–mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139:871-890.
16. Yoshidomi K, Murakami A, Yakabe K, Sueoka K, Nawata S, Sugino N. Heat shock protein 70 is involved in malignant behaviors and chemosensitivities to cisplatin in cervical squamous cell carcinoma cells. *J Obstet Gynaecol Res*. 2014;40:1188-1196.
17. Murakami A, Nakagawa T, Kaneko M, et al. Suppression of SCC antigen promotes cancer cell invasion and migration through the decrease in E-cadherin expression. *Int J Oncol*. 2006;29:1231-1235.
18. Nakagawa T, Murakami A, Torii M, Nawata S, Takeda O, Sugino N. E-cadherin increases squamous cell carcinoma antigen expression through phosphatidylinositol-3 kinase-Akt pathway in squamous cell carcinoma cell lines. *Oncol Rep*. 2007;18:175-179.
19. Yakabe K, Murakami A, Kajimura T, et al. Functional significance of transgelin-2 in uterine cervical squamous cell carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res*. 2016;42:566-572.
20. Yakabe K, Murakami A, Nishimoto Y, Kajimura T, Sueoka K, Sugino N. Clinical implications of human leukocyte antigen class I expression in endometrial cancer. *Mol Clin Oncol*. 2015;3:1285-1290.
21. Maekawa R, Taketani T, Mihara Y, et al. Thin endometrium transcriptome analysis reveals a potential mechanism of implantation failure. *Reprod Med Biol*. 2017;16:206-227.
22. Batlle E, Sancho E, Franci C, et al. The transcriptional factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2000;2:84-89.

23. Vernon AE, LaBonne C. Tumor metastasis: a new twist on epithelial–mesenchymal transitions. *Curr Biol*. 2004;14:719-721.
24. Kim MA, Lee HS, Lee HE, Kim JH, Yang HK, Kim WH. Prognostic importance of epithelial–mesenchymal transition-related protein expression in gastric carcinoma. *Histopathology*. 2009;54:442-445.
25. Dave N, Guaita-Esteruelas S, Gutarra S, et al. Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem*. 2011;286:12024-12032.
26. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, et al. The transcriptional factor snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*. 2000;2:76-83.
27. Liu F, Zhou Y, Zhou D, et al. Whole DNA methylome profiling in lung cancer cells before and after epithelial-to-mesenchymal transition. *Diagn Pathol*. 2014;9:66-70.
28. Zhang JX, Mai SJ, Huang XX, et al. MiR-29c mediates epithelial-to-mesenchymal transition in human colorectal carcinoma metastasis via PTP4A and GNA13 regulation of β -catenin signaling. *Ann Oncol*. 2014;25:2196-2204.
29. Peinado H, Marin F, Cubillo E, et al. Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J Cell Sci*. 2004;117:2827-2839.
30. Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, et al. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut*. 2013;62:1315-1326.
31. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 2007;7:415-428.
32. Zavadil J, Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*. 2005;24:5764-5774.
33. Lamouille S, Derynck R. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J Cell Biol*. 2007;178:437-451.
34. Deckers M, van Dinther M, Buijs J, et al. The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res*. 2006;66:2202-2209.
35. Morizane R, Fujii S, Monkawa T, et al. miR-34c attenuates epithelial–mesenchymal transition and kidney fibrosis with ureteral obstruction. *Sci Rep*. 2014;4:578:1-9.
36. Valcourt U, Kowanetz M, Niimi H, Heldin C, Moustakas A. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell*. 2005;16:1987-2002.

37. Ghahhari NM, Babashah S. Interplay between microRNAs and WNT/ β -catenin signaling pathway regulates epithelial–mesenchymal transition in cancer. *Eur J Cancer*. 2015;51:1638-1649.
38. Liu QQ, Chen K, Ye Q, Jiang XH, Sun YW. Oridonin inhibits pancreatic cancer cell migration and epithelial–mesenchymal transition by suppressing Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Cancer Cell Int*. 2016;16:57.
39. Gu Y, Wang Q, Guo K, et al. TUSC3 promotes colorectal cancer progression and epithelial–mesenchymal transition (EMT) through WNT/ β -catenin and MAPK signaling. *J Pathol*. 2016;239:60-71.
40. Zhang L, Liu H, Mu X, Cui J, Peng Z. Dysregulation of Fra1 expression by Wnt/ β -catenin signalling promotes glioma aggressiveness through epithelial–mesenchymal transition. *Biosci Rep*. 2017;37:1-12.
41. Yokoyama Y, Xin B, Shigeto T, et al. Clofibric acid, a peroxisome proliferator-activated receptor α ligand, inhibits growth of human ovarian cancer. *Mol Cancer Ther*. 2007;6:1379-1386.