

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10719

研究課題名 (和文) 子宮頸癌で低下する新規癌抑制分子Crystallinに対する分子標的治療の開発

研究課題名 (英文) Development of the molecular targeting therapy for new cancer suppressor molecules Crystallin decreasing in cervical cancer

研究代表者

末岡 幸太郎 (SUEOKA, Kotaro)

山口大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40452643

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,600,000 円

研究成果の概要 (和文) : 子宮頸癌の癌抑制分子Crystallin(CRYAB)の機能を解析するために、CRYAB高発現細胞株を作成し、①細胞増殖能②細胞遊走能③マトリックスメタロプロテアーゼ分泌能、④細胞浸潤能、⑤抗癌剤のシスプラチン感受性に対する影響の検討を行ったが、いずれにおいてもCRYABの高発現状態では、有意な関連を見出せなかった。摘出子宮の病理組織検体を用いてのCRYABによる免疫組織染色では、前癌状態であるCIN1,2,3では陽性となったが、IB1期の浸潤癌では陰性となった。まとめとしては、子宮頸部扁平上皮癌の発癌過程においてCRYABの発現減弱は認めたが、その機序は明らかとならなかった。

研究成果の概要 (英文) : To analyze a function of Crystallin(CRYAB), cancer suppressor molecules in cervical cancer, I had made CRYAB overexpression cell line and examined following: ①cell proliferation assay ②cell migration assay ③gelatin zymography for matrix metalloprotease secretion, ④cell invasion assay, ⑤cell viability assay exposing anticancer drug cisplatin. It was found that the overexpression of CRYAB did not affect malignant behaviors of cancer cell. By the immunohistochemical analysis of hysterectomy specimens, CRYAB was positive in CIN1,2,3, but negative in cervical cancer stage IB1. In conclusion, CRYAB had decreased in the carcinogenesis of cervical cancer, but the mechanism had not become clear.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮頸癌 Crystallin 癌抑制分子

1. 研究開始当初の背景

近年、各分野の悪性腫瘍の治療に対する分子標的治療薬に関して、有効な治療薬が数多く開発されている。分子標的治療薬は悪性腫瘍に特異的に発現する分子をターゲットとして、少ない投与量と最少の副作用で抗腫瘍作用を示すことが期待されている。このような薬剤の開発には網羅的な発現蛋白の解析が必須であり、さらに創薬には標的となる分子を同定することが鍵となる。発現蛋白の網羅的解析にはプロテオーム解析が行われているが、子宮頸部扁平上皮癌の発現蛋白の網羅的な解析は進んでおらず、分子標的治療薬の研究は遅れているのが現状である。そこで我々は、子宮頸部扁平上皮癌組織のプロテオーム解析を行い、網羅的解析を初めて報告した（Fukushima et al. Proteomics Clin Appl, 2011；(特開特許（A）2010-203988））。

我々は子宮頸部扁平上皮癌で減少する唯一の蛋白として Crystallin を同定した。Crystallin は眼球の水晶体を構成する構造蛋白質の一種で、骨格筋、心筋、腎臓などにも存在する。Crystallin は他の癌種（乳癌、前立腺癌、腎細胞癌等）では発現増加することが報告されている。一方、子宮頸部扁平上皮癌では Crystallin の発現は減弱しており、そのような報告は一部の頭頸部扁平上皮癌で報告されているのみであり、興味深い点である。また癌での役割もほとんどわかっておらず、研究する意義があると考えられる。

2. 研究の目的

我々のプレリミナリーな研究で、興味深いことに Crystallin は子宮頸部の初期病変（cervical intraepithelial neoplasia (CIN1)）の段階から劇的な発現変化を示しており、このような分子は世界的にも全く報告されておらず、新規の分子標的治療薬に結びつく期待が持たれる。すなわち Crystallin の発現を増加させることで発癌を抑制することができるかと予想される。そのため、Crystallin をターゲットとした分子標的治療の可能性について研究を行いたい。

3. 研究の方法

(1)Crystallin の機能解析

① *in vitro*における機能解析

子宮頸癌細胞株を用い、Crystallin の遺伝子導入によって Crystallin の発現を増加させ、細胞機能（細胞増殖能、浸潤・転移能等）を検討する。またその機能に関与する分子を検討する。

② *in vivo*における機能解析

Crystallin の遺伝子導入した子宮頸癌細胞をヌードマウスに移植し、Crystallin の発現を増加させることによって腫瘍形成が抑制されるかを検討する。

(2)Crystallin の発現が減弱する病期の検討
多数症例の子宮頸部扁平上皮癌組織を用いて Crystallin の免疫組織染色を行い、特に初期病変から CIN 3 において発現の有無や変化を検討する。

(3)分子標的治療薬の開発

in vitro において種々の候補薬剤について新たな分子標的治療薬としての可能性を検討する。

4. 研究成果

(1) Crystallin の *in vitro*での機能解析

子宮頸癌細胞株 SKG-II を用いて、CRYAB 高発現細胞株を作成し、機能解析を行った。

①細胞増殖能に有意な差は認めなかった。

(図 1)

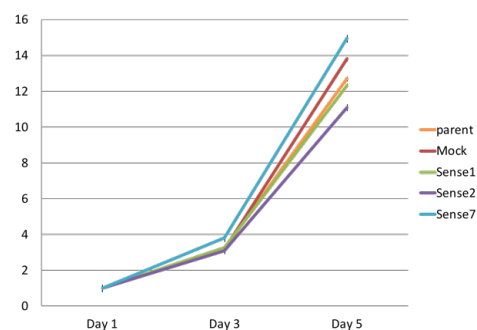


図 1

②細胞遊走能に有意な差は認めなかった。(図 2 a, 2b)

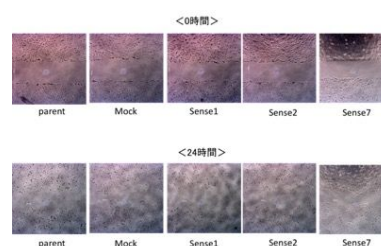


図 2a

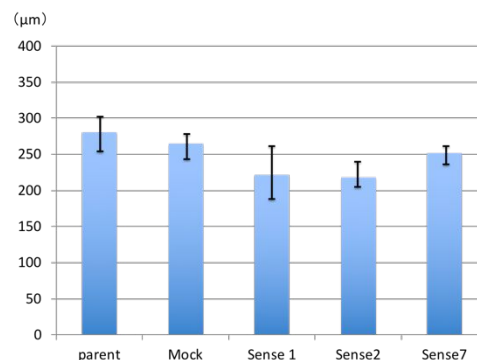


図 2b

③マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）
分泌能に有意な差はなかった。(図 3)

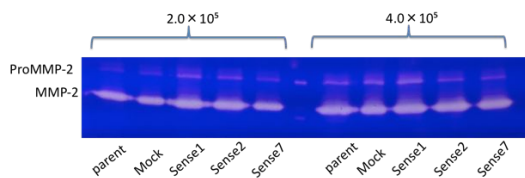


図 3

④細胞浸潤能に有意な差はなかった。(図 4a, 4b)

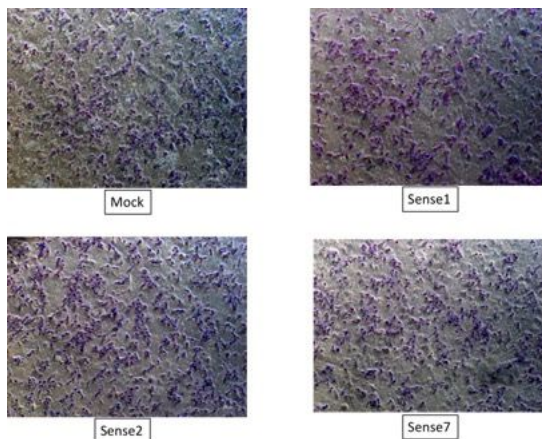


図 4a

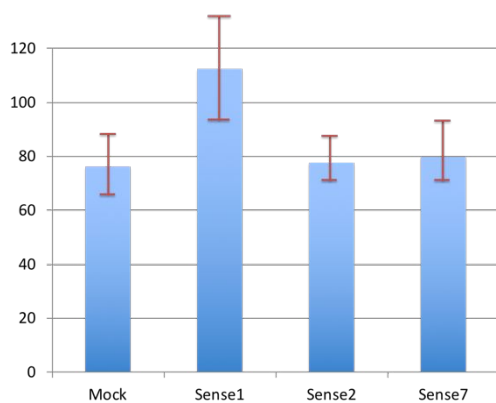


図 4b

⑤スフェロイド形成能はMock と sense で有意差を認めた。(図 5a, 5b)

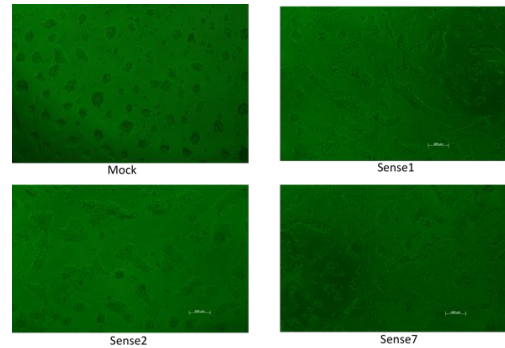


図 5a

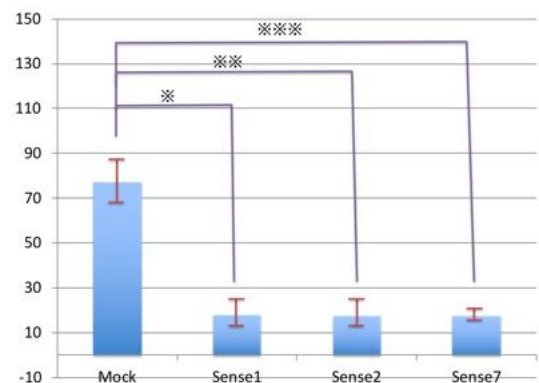


図 5b

⑥抗癌剤シスプラチン感受性に関して、有意な差はなかった。(図 6)

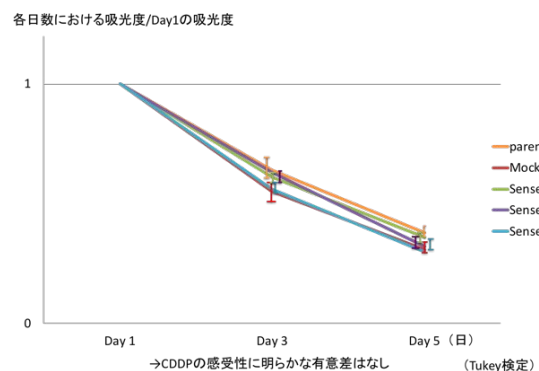


図 6

以上の結果をまとめると

- 細胞増殖能の評価 (MTT assay)
→有意差なし
- 細胞遊走能の評価 (Scratch assay)
→有意差なし
- MMP分泌能の評価 (Zymography)
→有意差なし
- 浸潤能の評価 (invasion assay)
→有意差なし
- スフェロイド形成能の評価 (スフェロイド3次元培養)
→有意差あり (Sense群でスフェロイド形成能↓)
- 抗癌剤 (CDDP) への感受性の変化 (MTT assay)
→有意差なし

となり、Crystallin の悪性の形質は証明できなかった。

(2)Crystallin の発現が減弱する病期の検討
組織検体を用いた免疫組織染色では、癌組織では全く染色されなかった。

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 0 件)

〔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〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

末岡 幸太郎 (SUEOKA, Kotaro)
山口大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：4 0 4 5 2 6 4 3

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし