

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08709

研究課題名（和文）卵巣明細胞腺癌の化学療法低感受性の改善へ向けて

研究課題名（英文）Towards an improvement in the low sensitivity to chemotherapy in ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

小池 良子 (Koike, Ryoko)

帝京大学・医学部・助手

研究者番号：80535063

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：蛍光標識2次元ディファレンシャルゲル電気泳動法でパクリタキセルの効きの悪い卵巣明細胞腺癌細胞株1、細胞株2でパクリタキセルの効きの良い細胞株3、細胞株4とくらべて、発現の高かったラボネームprotein1について、Western blot法でも検討したところ細胞株1、細胞株2では細胞株3、細胞株4に比べてラボネームprotein1の発現が高かった。卵巣明細胞腺癌39例による Kaplan-Meier 法による生存率の解析ではラボネームprotein1の発現の低い群に死亡例はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣明細胞腺癌ではラボネームprotein1が下がるとパクリタキセルの感受性が上がり、生命予後がよくなる可能性がある。

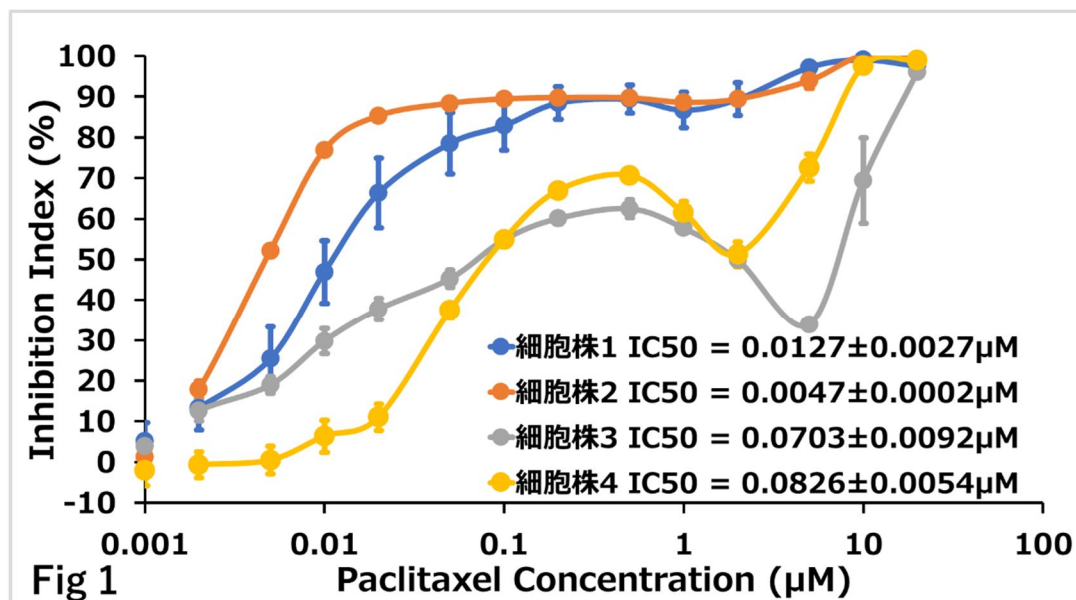
研究成果の概要（英文）：Fluorescence-labeled two-dimensional differential gel electrophoresis showed that the expression of lab-named protein 1 was higher in ovarian clear cell carcinoma cell lines 1 and 2, which are poor responders to paclitaxel, than in cell lines 3 and 4, which are good responders to paclitaxel. The expression of lab-name protein 1 was higher in cell line 1 and 2 than in cell line 3 and 4. Kaplan-Meier survival analysis of 39 cases of ovarian adenocarcinoma showed that there were no deaths in the group with low expression of lab name protein1.

研究分野：卵巣癌

キーワード：卵巣明細胞腺癌 蛍光標識2次元ディファレンシャルゲル電気泳動法

1. 研究開始当初の背景

私たちのこれまでの研究ではパクリタキセルの感受性の低い卵巣明細胞腺癌細胞株 2 株(細胞株 1,2)と 高い卵巣癌明細胞腺癌細胞株 2 株(細胞株 3,4) (Fig1) を蛍光標識二次元ディファレン



スゲル電気泳動法(2D-DIGE)にて解析し、パクリタキセル感受性の低い細胞株で共通して高い細胞株にくらべて発現の高かったタンパク質スポットからラボネーム protein1 を 同定し、protein1 は卵巣明細胞腺癌のパクリタキセル感受性マーカーとなり、この分子を標的とした分子標的治療により卵巣明細胞腺癌のパクリタキセル感受性が上昇する可能性があると考えていた。近年プロテオミクス解析により protein1 は癌関連線維芽細胞の制御因子と報告されている。

2. 研究の目的

ラボネーム protein1 の臨床病理学的意義を検討し、ラボネーム protein1 をノックダウンした際、細胞株でパクリタキセルの効きがよくなるか、overexpression した際、細胞株でパクリタキセルの効きがわるくなるか検討する。

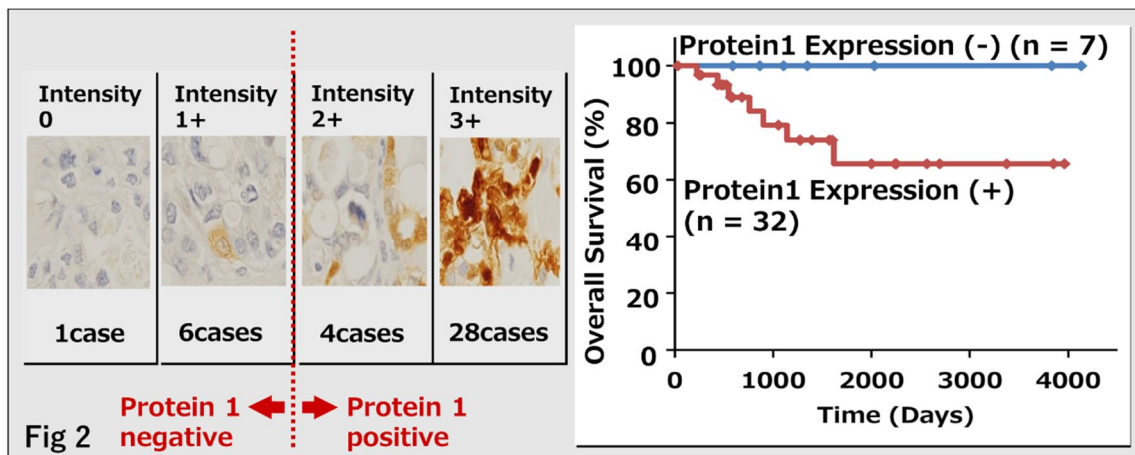
3. 研究の方法

蛍光標識二次元ディファレンシャルゲル電気泳動法(2D-DIGE)にて細胞株 1, 細胞株 2 でラボネーム protein1 の発現が低く、細胞株 3, 細胞株 4 ではラボネーム protein1 の発現が高かったが、Western blot 法でも再現性があるか確認した。ラボネーム protein1 の細胞株での発現の局在を免疫細胞染色法で検討した。卵巣明細胞腺癌臨床検体を用いて、ラボネーム protein1 抗体にて免疫組織化学染色を行い、ラボネーム protein1 タンパク発現の生命予後との関連を検討した。卵巣癌明細胞腺癌細胞株で 2D-DIGE にてラボネーム protein1 の発現が高いとわかっている細胞株 3, 4 を用いて CRISPR-Cas9 を利用したノックアウト細胞株の樹立を試みたが、ノックアウト細胞株の樹立はできなかったため、shRNA 法によるラボネーム 1 ノックアウト細胞株の樹立を行ったところ、細胞株 3 のみラボネーム protein1 shRNA によりラボネーム protein1 をノックダウン stable clone が作成できたため、これを用いてパクリタキセルを用いた Annexin assay を行った。また、ラボネーム protein1 の発現の低い細胞株 1, 細胞株 2 をもちいてラボネーム protein1 を overexpression させたところ、細胞株 1 のみラボネーム protein1 が overexpression した stable clone を作成することができたので、パクリタキセルを用いた Annexin assay を行った。ラボネーム protein1 の発現の高い細胞株 3, 細胞株 5、western blot 法ではラボネーム protein1 の発現がなかった細胞株 1 を使って、ラボネーム protein1 siRNA で処理した群と control siRNA で処理した群とでパクリタキセルの感受性に差があるか WST-8 assay を用いて検討した。

4. 研究成果

蛍光標識二次元ディファレンシャルゲル電気泳動法(2D-DIGE)でラボネーム protein1 の発現が高かった細胞株 3,4 では Western blot 法でもラボネーム protein1 の発現が高く、2D-DIGE でラボネーム protein1 の発現の低かった細胞株 1,2 では Western blot 法でもラボネーム protein1 の発現をみとめなかった。ラボネーム protein1 は Western blot 法で発現のある細胞株では免疫細胞染色上、細胞全体に発現していた。卵巣明細胞腺癌組織マイクロアレイ検体のラボネーム

protein 1 の免疫組織化学染色では、細胞質の免疫染色の強度が 3 段階にわかれ、免疫染色の強度 2 以上をラボネーム protein1 陽性として検討を進めた (Fig2 左図)。卵巣明細胞腺癌組織マイクロアレイ検体 39 例を用いた細胞質のラボネーム protein1 の発現別の生存率の違いを Kaplan-Meier 法で解析したところ (Fig2 右図) ラボネーム protein1 の発現の高い群で予後が悪い



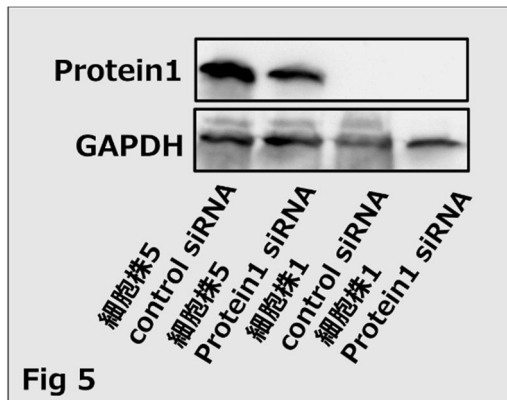
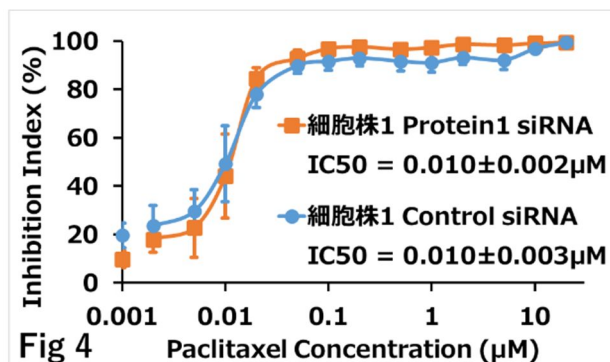
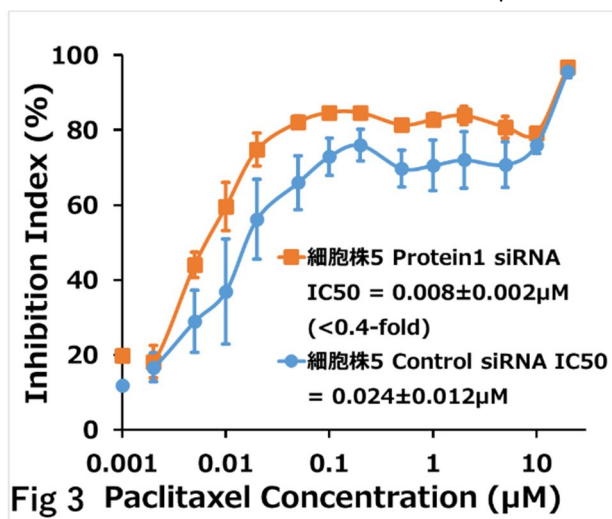
傾向がみられたが、ラボネーム protein1 の発現の低い群で死亡例がなかったため p 値に有意差はみられなかった。ハザード比 (Mantel-Haenszel) を計算するとは 3.639 であり、ラボネーム protein1 の細胞質での発現の高い群では低い群に比べて、死亡率が 3.6 倍高いと考えられた。また、ラボネーム protein1 の細胞質での発現のある例では発現のない例にくらべて、死亡例の多い傾向がみられた ($p=0.0789$, likelihood-ratio chi-square test)。ラボネーム protein1 の間質の発現別の生存率の違いを Kaplan-Meier 法で解析したところ、ラボネーム protein1 の発現の高い群で有意に無増悪生存率が悪かった ($p=0.0115$, log-rank test)。

2D-DIGE、western blot にてラボネーム protein1 の発現が高いとわかっている卵巣明細胞腺癌細胞株 3 とそのラボネーム protein1 の shRNA によるノックダウン株とラボネーム protein1 の発現が低いとわかっている細胞株 1 とそのラボネーム protein1 の overexpression 株を用いて、パクリタキセルの濃度別に Annexin assay を行った。

細胞株 3 の親株とラボネーム protein1 の shRNA でノックダウンした細胞株を用いてパクリタキセルの濃度別に Annexin assay を行ったところ、親株とラボネーム protein1 を shRNA でノックダウンした細胞株とでアポトーシス細胞の存在率に差はなかった。

細胞株 1 の親株とラボネーム protein1 を overexpression した細胞株を用いてパクリタキセルの濃度別に Annexin assay を行ったところ、親株とラボネーム protein1 を overexpression した細胞株とでアポトーシス細胞の存在率に差はなかった。

ラボネーム protein1 の発現の高い細胞株 5、ラボネーム protein1 siRNA で処理した群のパクリタキセルの IC₅₀ は control siRNA で処理した群の IC₅₀ と比べて低い傾向を示した (Fig 3)。



細胞株 3 ではパクリタキセルの IC₅₀ に差はみられなかったが、control siRNA にばらつきがみ

られたため、再度実験予定である。western blot 法ではラボネーム protein1 の発現がなかった細胞株 1 ではパクリタキセルの IC50 に差はみられなかった(Fig4)。Western blot 法で siRNA によって、ラボネーム protein1 の発現が低下していることは確認した(Fig5)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryoko Kikuchi-Koike, Kazunori Nagasaka, Hitoshi Tsuda, Yasuyuki Ishii, Masaru Sakamoto, Yoshihiro Kikuchi, Shiho Fukui, Yuko Miyagawa, Haruko Hiraie, Takayuki Kobayashi, Takayuki Kinoshita, Yae Kanai, Tatsuhiro Shibata, Issei Imoto, Johji Inazawa, Osamu Matsubara and Takuya Ayabe	4. 巻 19
2. 論文標題 Array comparative genomic hybridization analysis discloses chromosome copy number alterations as indicators of patient outcome in lymph node-negative breast cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 521-521
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-019-5737-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukui S, Nagasaka K, Miyagawa Y, Kikuchi-Koike R, Kawata Y, Kanda R, Ichinose T, Sugihara T, Hiraie H, Wada-Hiraie O, Sasajima Y, Ayabe T	4. 巻 10
2. 論文標題 The proteasome deubiquitinase inhibitor bAP15 downregulates TGF-β/Smad signaling and induces apoptosis via UCHL5 inhibition in ovarian cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 5932-5948
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.27219. eCollection 2019 Oct 15	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyagawa Y, Nagasaka K, Yamawaki K, Mori Y, Ishiguro T, Hashimoto K, Koike R, Fukui S, Sugihara T, Ichinose T, Hiraie H, Kido K, Okamoto K, Enomoto T, Ayabe T.	4. 巻 1
2. 論文標題 Evaluating the Angiogenetic Properties of Ovarian Cancer Stem-like Cells using the Three-dimensional Co-culture System, NICO-1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Vis Exp	6. 最初と最後の頁 166-166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/61751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中川 一平, 長屋 陽平, 小池 良子, 神田 蘭香, 岸本 倫太郎, 一瀬 隆行, 平池 春子, 松本 泰弘, 末永 昭彦, 梁 栄治, 綾部 琢哉
2. 発表標題 結腸癌術後経過観察中に卵巣奇形腫が小腸に穿通し, 同部位に結腸癌の血行性転移を認めた1例
3. 学会等名 日本産科婦人科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福井 志保, 長阪 一憲, 宮川 優子, 川田 淑子, 小池 良子, 神田 蘭香, 杉原 武, 平池 春子, 平池 修, 笹島 ゆう子, 梁 栄治, 綾部 琢哉
2. 発表標題 卵巣明細胞癌におけるUCL5の発現と予後についての検討
3. 学会等名 日本婦人科腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本 優, 堀川 真吾, 小池 勇輝, 原野 尚美, 鈴木 佳世, 小池 良子, 小屋松 安子, 馬屋原 健司, 田中 忠夫, 岡本 愛光
2. 発表標題 悪性腫瘍と感染症に対するPDTの最前線 子宮頸部上皮内腫瘍(CIN)に対するタラポルフィンナトリウム(Laserphyrin)と半導体レーザー(PDレーザー)を用いた次世代PDTの臨床試験
3. 学会等名 日本レーザー治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井 志保, 長阪 一憲, 宮川 優子, 川田 淑子, 小池 良子, 神田 蘭香, 杉原 武, 平池 春子, 平池 修, 梁 栄治, 綾部 琢哉
2. 発表標題 進行卵巣癌に対する脱コピキチン化酵素阻害剤bAP15およびVLX1570の抗腫瘍効果についての基礎的検討
3. 学会等名 日本婦人科腫瘍学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	坂本 優 (Sakamoto Masaru) (20260101)	公益財団法人佐々木研究所・附属研究所・副院長(移行) (72609)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	綾部 琢哉 (Ayabe Takuya) (00272568)	帝京大学・医学部・教授 (32643)	
研究分担者	中川 俊介 (Nakagawa Shunsuke) (70270874)	帝京大学・医学部・講師 (32643)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関