

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：	基盤研究(B)
研究期間：	2006 ~ 2008
課題番号：	18390448
研究課題名(和文)	プロモーターマイクロアレイを用いた卵巣癌の薬剤耐性化遺伝子の解析
研究課題名(英文)	Analysis of chemo-resistance genes with promoter micro-array in ovarian cancer
研究代表者	
	大道 正英 (Ohmichi Masahide)
	大阪医科大学・医学部・教授
	研究者番号： 10283764

研究成果の概要：プロモーター上にがんの浸潤・転移に関与する転写因子 NFκB の結合部位を有するプロモーターマイクロアレイを作成し、卵巣癌の薬剤耐性化遺伝子の解析を行った。ヒト卵巣癌細胞株および卵巣癌各症例において、IAP ファミリーの数種の遺伝子の関与が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	6,800,000	2,040,000	8,840,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：卵巣癌 マイクロアレイ 薬剤反応性 シグナル伝達 トランスレショナルサーチ

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は当初抗がん剤に感受性を示していてもしだいに耐性を示す場合が多く、生存率が最も低い婦人科癌である。したがって、1st line のレジメンとして代表的なシスプラチンおよびタキソールの耐性化の分子機構の解析は分子標的治療の開発にむけて重要な課題である。がんの浸潤・転移に関与する転写因子 nuclear factor-κB (NFκB) がシスプラチンおよびタキソールの耐性化に関与し、そ

れらの分子をブロックすれば両薬剤の感受性が増強することを *in vitro* および *in vivo* において明らかにしてきた。分子標的治療のためにはより特異的に、かつ安全に標的分子を阻害することが必要である。薬剤耐性化に関与するシグナル経路を全て阻害することは、生体にとって有用なシグナル経路をも阻害する可能性がある。そこで、薬剤耐性化に関与するシグナル経路の標的遺伝子だけを

阻害するほうがより特異的で、かつ安全である。効率的・特異的に薬剤耐性化に関与するシグナル経路の標的遺伝子をスクリーニングするためには、薬剤耐性化に関与するシグナル経路が活性化され、プロモーター領域に結合することにより標的遺伝子が誘導されるスクリーニングシステムを用いて解析することが必要である。我々は、DNA マイクロアレイには遺伝子のプロモーター領域を含んでいないため、それを進化させたプロモーターマイクロアレイを開発し、シスプラチンにより誘導される JNK の標的遺伝子解析に成功し、特許を得ている。

2. 研究の目的

薬剤耐性化のみならず、がんの浸潤・転移に関与する転写因子 NFκB の結合部位を含むプロモーターマイクロアレイを作成し、シスプラチンおよびタキソールにより NFκB を介してその発現が誘導され耐性化に関与する遺伝子を同定することである。

3. 研究の方法

(1) 1~1.5 kb 上流のプロモーター上に NFκB の結合部位を有する遺伝子をコンピューターリサーチし、アポトーシス関連遺伝子などの腫瘍関連の遺伝子のプロモーター領域を PCR 法にて増幅、精製した後、ハイブリッドスライド上にアレイプリンティングし、プロモーターマイクロチップを作成した。

(2) シスプラチン耐性ヒト卵巣癌細胞株 Caov-3 細胞・タキソール耐性ヒト卵巣癌細胞株 SW626 細胞にシスプラチンおよびタキソールを添加し、転写因子 NFκB は inhibitor of NFκB (IκB) がリン酸化されると核内に移行し転写活性が亢進するので、IκB のリン酸化特異的抗体を用い chromatin immuno-precipitation (CHIP) を施行するこ

とによって、細胞内で活性化された転写因子 NFκB が結合している DNA-protein complex (cross-linked DNA) を選択的に抽出した。その後、cross-linking を解除し、活性化状態の転写因子 NFκB が結合している DNA (active DNA) のみを精製・抽出した。その DNA を蛍光色素 (Cye-dye) にてラベルし、プロモーターマイクロチップ上でハイブリダイゼーションした。

(3) 5~7週令のメスヌードマウスの腹腔内に Caov-3 細胞および SW626 細胞を注入した。投与2週間して腫瘍が形成された後に、①シスプラチン(30 mg/kg)、②シスプラチン(30 mg/kg)+ siRNA 発現ウイルスベクター、③シスプラチン(30 mg/kg)+ scramble ウイルスベクター、④タキソール(20 mg/kg)、⑤タキソール(20 mg/kg)+ siRNA 発現ウイルスベクター、⑥タキソール(20 mg/kg)+ scramble ウイルスベクター、⑦vehicle (PBS)を週3回4週間腹腔内投与した。その間、腹囲と体重を週2回測定した。その後、炭酸ガスにて安楽死させ開腹し、腹水量及び腫瘍の大きさを計測した。腫瘍は4% paraformaldehyde で固定し、パラフィン切片を作成し、TUNEL 法にてアポトーシスを定量化した。また、siRNA 発現ウイルスベクターにより IκB のリン酸化が抑制されていることを免疫組織染色にて確認した。

(4) 初回手術により摘出した卵巣癌の各組織型の原発病巣と腹膜播種等の転移病巣、および初回手術後抗がん剤投与中に再発した症例の再発病巣を摘出したサンプルを homogenate し、cell lysate を作成。また、手術により摘出した卵巣癌の原発病巣と腹膜播種等の転移病巣のサンプルより初代培養細胞を作成しシスプラチンおよびタキソールを添加。その後、IκB のリン酸化特異的抗体を用い CHIP を施行し、活性化状態の転

写因子 NFκB が結合している DNA のみを精製・抽出した。その DNA を Cy5-dye にてラベルし、プロモーターマイクロチップ上でハイブリダイゼーションし解析した。

4. 研究成果

(1) 転写因子 nuclear factor-κB (NFκB) の結合部位を含むプロモーターマイクロアレイを作成し、シスプラチンおよびタキソールによりその発現が誘導され耐性化に関与する遺伝子を同定した。

(2) 標的遺伝子の発現をブロックさせる siRNA の効果を持続的に発現させるためにアデノウイルスのベクターに組み込んだ siRNA 発現ウイルスベクターを用い、シスプラチンおよびタキソールの耐性性が解除され感受性を示すようになることをマウス卵巣癌モデルを用い *in vivo* において確かめた。

(3) 卵巣癌各症例においてシスプラチンおよびタキソールの耐性化に関与する遺伝子が発現しているか否かをプロモーターマイクロアレイにより解析した結果、IAP ファミリーの数種の遺伝子とのハイブリダイゼーションを認めた。さらに、同定した遺伝子が、シスプラチンおよびタキソールにより卵巣癌症例の初代培養細胞で発現誘導されること、およびその遺伝子発現が NFκB 依存性であること確認した。それらの遺伝子の発現を siRNA 発現ウイルスベクターを導入し抑制すれば、シスプラチンとタキソールに対する耐性性が解除され感受性を示すようになった。

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 3 件)

- ① 第 19 回滋賀癌化学療法研究会／滋賀県 '09/2.21 大道正英
Molecular Profiling に基づく卵巣癌の治療戦略
- ② 第 80 回日本内分泌学会／東京都 '07/6.14 大道正英
卵巣ホルモンと血管新生
- ③ 周南婦人科癌治療セミナー／山口県 '07/1.12 大道正英
卵巣がんの治療戦略

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大道 正英 (Ohmichi Masahide)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：10283764

(2) 研究分担者

寺井 義人 (Terai Yoshito)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：90278531

山下 能毅 (Yamashita Yoshiki)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：50268207

金村 昌徳 (Kanemura Masanori)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：40298782

田辺 晃子 (Tanabe Akiko)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：70454543

佐々木 浩 (Sasaki Hiroshi)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：80432491

亀谷 英輝 (Kamegai Hideki)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30204639

田坂 慶一 (Tasaka Keiichi)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：50155058

田原 正浩 (Tahara Masahiro)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：00294091

早川 潤 (Hayakawa Jun)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：80397736

橋本 奈美子 (Hashimoto Namiko)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：60379253

(3) 連携研究者

坂田 正博 (Sakata Masahiro)
大阪大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10260639

竹原 幹雄 (Takehara Mikio)
大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：40298766