

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006 年度～2008 年度
 課題番号：18390451
 研究課題名（和文）
 婦人科腫瘍における細胞接着分子をターゲットとした新規治療の開発と治療戦略の個別化
 研究課題名（英文）
 Developing a novel treatment and an order made therapy for gynecologic cancers targeting cell adhesion molecules.
 研究代表者
 齋藤 豪 (TSUYOSHI SAITO)
 札幌医科大学・医学部・教授
 研究者番号：90145566

研究成果の概要：

初年度は *in vitro* において子宮内膜癌細胞での細胞間コミュニケーションによるバスタンダー効果を証明した。さらに性ステロイドホルモンやレチノイドなどを用いてより細胞間コミュニケーションを促進させることによりバスタンダー効果が増強されるか検証を行った。

1. RL-952 細胞におけるバスタンダー効果の発現

HSV-tk 遺伝子を導入した RL-952-HSV-tk 細胞に対する GCV の添加実験では、20mM と 2mM の濃度ではほとんどすべての細胞が 96 時間後には死滅し、200mM では 75%、20mM では 40% が 96 時間後に死滅した。以降の実験では GCV の濃度は 200・M と 20・M で行った。

また、RL-952-HSV-tk 細胞と RL-952-wild の混合培養に GCV を添加した実験では、フルシートの RL-952-wild に RL-952-HSV-tk 細胞を 100 個、150 個、200 個、250 個と増やしてゆくとそれに比例して死細胞数が増加した。

2. レチノイドがコネキシンの発現に与える影響

al trans-RA の添加実験では、レチノイドが 100・M の濃度でコネキシン 26 の発現が最も強く認められた。

3. *in vitro* でレチノイド投与がバスタンダー効果に与える影響

in vitro での実験を通じて生体内でのバスタンダー効果の変動と最終的には新しい治療法の開発について研究を進めた。本年度は腹腔内腫瘍の形成と、レチノイド投与によってコネキシンの発現が変動する事を証明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	8,000,000	2,400,000	10,400,000

研究分野：医師薬

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科

キーワード：子宮体癌、子宮内膜、遺伝子治療、コネクシン、卵巣癌

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦において婦人科腫瘍の中でもとりわけ子宮体癌と卵巣癌の罹患率が上昇している。これら子宮体癌と卵巣癌の進行期とその治療戦略は主に手術所見に基づいて決定されるが、進行期決定のためには後腹膜リンパ節転移の有無を郭清および生検によって確認する必要があり、またリンパ転移の有無が予後や補助療法などの治療方針決定に大きな影響を及ぼしていることは議論の余地がない。しかし、リンパ浮腫をはじめとする術後合併症による治療後のQOL低下も見逃すことはできず、症例による縮小手術は体癌・卵巣癌の治療戦略上の検討課題となっている。また、手術後の放射線療法についても、放射線腸炎や膀胱炎などの合併症が問題となる。しかし、これらの問題を解決するには従来の病理組織学的因子に加え、種々のバイオマーカーによる多面的解析によって治療の個別化を図る必要がある。また、進行あるいは再発癌の補助療法として放射線療法や化学療法が行われているが、これらの治療が充分癌を制御しているとは言えず、新しい治療法の開発が待たれている。

癌浸潤転移機構は細胞接着の異常、間質組織の破壊と細胞運動性の亢進などを含む多段階複合的な生物現象で、この解明とその阻害は癌研究のもっとも重要な課題の一つである。この複雑系としての転移浸潤機構も近年の分子生物学的アプローチにより徐々に解明されつつあり、我々も子宮体癌においてもその悪性度や予後を規定するいくつかの分子について報告してきた。子宮内膜は一層の円柱上皮からなる腺上皮と間質細胞よりなり、子宮体癌取り扱い規約ではこの腺構造の占める割合によってG1(高分化型腺癌)、G2(中分化型腺癌)、G3(低分化型腺癌)分類される。この細胞形態の分類は強く予後を反映することが知られている。たとえば、我々の教室のデータでは子宮体癌の五年生存率がG1で95.8%、G2で83%そしてG3で56.1%と細胞形態が正常

の腺構造から離れるほど予後が悪くなる。このような子宮内膜を始めとする腺上皮組織は接着装置を有しこれらが細胞の機械的結合や形態の維持に重要な働きを有していると考えられる。

2. 研究の目的

我々はこれまで、E-カドヘリン遺伝子の発現・メチル化と子宮内膜癌の進展、予後との関係について検討し、E-カドヘリン遺伝子メチル化の有無は子宮体部癌の筋層浸潤やリンパ転移の予測因子となりうる事が報告した。また、細胞接着装置の一つであるギャップ結合の正常子宮内膜、子宮内膜増殖症、子宮内膜癌での発現について、分子生物学的に解析した。子宮内膜上皮ではコネクシン26と32が発現しており、間質細胞には43が発現が認められた。ギャップ結合を形成するコネクシン26と32は正常子宮内膜増殖期ではほとんど観察されなかったにもかかわらず、排卵後・分泌初期からその発現は急速に増加し、分泌中期にピークを認めた。子宮内膜増殖症、子宮内膜癌の免疫染色ではコネクシンの発現は極端に減弱あるいは発現していても細胞質に局在するなどの局在異常を認め、これらの状態では細胞間コミュニケーションが低下していることを報告してきた。In vitroの検討ではこのギャップ結合を介する細胞間コミュニケーションはE-カドヘリンの発現低下によってコネクシンの局在異常を引き起こし抑制されることが明らかになった。

これまでわれわれは主に癌組織から得られた遺伝子を種々の側面より解析し、臨床あるいは病理学的パラメーターと対比し解析を行ってきたが、本研究ではこれらの知見を元に治療を行う前にこれらの遺伝子の解析を行って治療戦略の個別化を図る、われわれが癌組織で解析してきた遺伝子をターゲットとした新しい治療法の開発を目的として以下に示すように研究を進める。

3. 研究の方法

子宮体癌治療の個別化のための細胞接着分子測定

子宮体癌の初期診断には子宮内膜細胞診が通常行われる。これは子宮内膜ブラシで子宮内膜細胞を採取しその形態から癌の診断を行うが、ここで得られた細胞の一部より DNA を抽出し E-カドヘリン遺伝子のメチル化の有無を検討する。先にも述べたように E-カドヘリン遺伝子のメチル化の有無は体癌のリンパ転移を初めとした病理組織学的パラメーターと関連しており、リンパ郭清を初めとした手術の個別化に対する有用な情報となりうると思われる。また、ブラシで細胞を採取することにより 侵襲がほとんど無い、組織と異なり子宮体部全体から網羅的にサンプルを集めることが可能で偽陰性の可能性が低くなる、蛋白や RNA と異なり DNA の解析なので細胞変性などの影響を受けにくい、などのメリットがある。また、我々はこれまでも卵巣癌で種々の癌抑制遺伝子メチル化に関する検討を行ってきたが、得られた DNA を用いて E-カドヘリンばかりでなく p16, APC, hMLH1 などの癌関連遺伝子の網羅的検討も行う。ここで得られた遺伝子データを手術時に得られたリンパ転移や筋層浸潤などの病理組織学的パラメーターと対比させ、癌治療の個別化となりうるものかどうかを検討する。

細胞接着分子の遺伝子治療への応用 - 最小量のベクターで最大の効果をめざす

近年、悪性腫瘍に対する遺伝子治療の有効性が数多く報告されその臨床応用が期待されたが、ベクターの毒性や腫瘍に対する特異性などの問題が未だ解決されたとはいえない。遺伝子治療においては、通常は目的遺伝子が組み込まれた細胞のみが障害を受けるのであるが、時にこの組み込まれた周辺の細胞にも障害をおよぼすことがある。このことをバイスタンダー効果と言うが、このメカニズムの一つにギャップ結合を介した細胞間コミュニケーション(GJIC)が関与していることが知られている。本研究ではこのメカニズムの癌治療への応用を目指す。このことによって、少量のベクターで済むので副作用を最小限に抑えることが可能になる、GJICは同種の細胞(癌細胞)にしか及ばないと言う性質があるので投与の仕方によって治療の特異性を高めることが可能になる、などの問題が解決される可能性がある。本研究の具体目標としては、子宮体癌および卵巣癌細胞を用いて実際にGJICがバイスタンダー効果に寄与しているかを確認する、まだコネキシンの発現などが

検討されていない卵巣癌についてこれを行う、我々のこれまでの研究では性ステロイドがGJICを制御することを報告してきたが レチノイドや性ステロイドなどを用いて in vitro および in vivo でGJICあるいはバイスタンダー効果を増強する方法の検討を行う、ヌードマウスモデルを用いて実際に本研究の有効性を検証する、を到達点として研究を進める。

4. 研究成果

研究成果の概要：

(1) 細胞間コミュニケーションとバイスタンダー効果

初年度は in vitro において子宮内膜癌細胞での細胞間コミュニケーションによるバイスタンダー効果を証明した。さらに性ステロイドホルモンやレチノイドなどを用いてより細胞間コミュニケーションを促進させることによりバイスタンダー効果が増強されるか検証を行った。

(2) RL-952細胞におけるバイスタンダー効果の発現

HSV-tk 遺伝子を導入した RL-952-HSV-tk 細胞に対する GCV の添加実験では、20mM と 2mM の濃度ではほとんどすべての細胞が 96 時間後には死滅し、200mM では 75%、20mM では 40%が 96 時間後に死滅した。以降の実験ではGCVの濃度は200・Mと20・Mで行った。

また、RL-952-HSV-tk 細胞と RL-952-wild の混合培養に GCV を添加した実験では、フルシートの RL-952-wild に RL-952-HSV-tk 細胞を 100 個、150 個、200 個、250 個と増やしてゆくとそれに比例して死細胞数が増加した。

(3) レチノイドがコネキシンの発現に与える影響

all-trans-RA の添加実験では、レチノイドが 100・M の濃度でコネキシン 26 の発現が最も強く認められた。

(4) in vitro でレチノイド投与がバイスタンダー効果に与える影響

in vitro での実験を通じて生体内でのバイスタンダー効果の変動と最終的には新しい治療法の開発について研究を進めた。本年度は腹腔内腫瘍の形成と、レチノイド投与によってコネキシンの発現が変動する事を証明した。

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 17 件)

1. Matsuura M, Suzuki T, Morishita M, Tanaka R, Ito E, Saito T. Chemotherapy (CT) with radiotherapy versus CT alone for FIGO Stage IIIc endometrial cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2009; 30:40-4. (査読あり)
2. Baba T, Endo T, Kitajima Y, Kamiya H, Moriwaka O, Saito T. Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome and pituitary adenoma: incidental pregnancy triggers a catastrophic event. *Fertil Steril*. 2009. Apr 7. [Epub ahead of print] (査読あり)
3. Suzuki T, Morishita M, Ito E, Matsuura M, Tanaka R, Saito T. Analgesic efficacy of controlled-release oxycodone in patients with uterine or ovarian cancer. *Am J Ther*. 2008 15:31-5. (査読あり)
4. Fujimoto T, Tamagawa M, Kimura M, Tanaka R, Umemura K, Ito E, Suzuki T, Hareyama M, Saito T. Accuracy of magnetic resonance imaging for the evaluation of myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Tumor Res*, 2007,41:71-6. (査読あり)
5. Ishioka S, Hayashi T, Endo T, Baba T, Honma H, Saito T. Advanced epithelial ovarian carcinoma during pregnancy. *Int J Clin Oncol*. 2007 12:375-8. (査読あり)
6. Ushijima K, Yahata H, Yoshikawa H, Konishi I, Yasugi T, Saito T, Nakanishi T, Sasaki H, Saji F, Iwasaka T, Hatae M, Kodama S, Saito T, Terakawa N, Yaegashi N, Hiura M, Sakamoto A, Tsuda H, Fukunaga M, Kamura T. Multicenter phase II study of fertility-sparing treatment with medroxyprogesterone acetate for endometrial carcinoma and atypical hyperplasia in young women. *J Clin Oncol*. 2007, 25:2798-803. (査読あり)
7. Ishioka S, Endo T, Hayashi T, Baba T, Umemura K, Saito T. Pregnancy-related complications after vaginal radical trachelectomy for early-stage invasive uterine cervical cancer. *Int J Clin Oncol*. 2007, 12:350-5. (査読あり)
8. Baba T, Endo T, Sata F, Honma H, Kitajima Y, Hayashi T, Manase K, Kanaya M, Yamada H, Minakami H, Kishi R, Saito T. Polycystic ovary syndrome is associated with genetic polymorphism in the insulin signaling gene IRS-1 but not ENPP1 in a Japanese population. *Life Sci*. 2007 81:850-4. (査読あり)
9. Terasawa K, Toyota M, Sagae S, Ogi K, Suzuki H, Sonoda T, Akino K., Maruyama R, Nishikawa N, Imai K, Shinomura Y, Saito T, Tokino T. Epigenetic inactivation of TCF2 in ovarian cancer and various cancer cell lines, *Br J Cancer*, 2006, 94:914-921. (査読あり)
10. Yamazaki K, Endo T, Kitajima Y, Manase K, Nagasawa K, Honma H, Hayashi T, Kudo R, Saito T. Elevation of Both Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E(2) Receptor EP3 Expressions in Rat Placenta after Uterine Artery Ischemia-Reperfusion. *Placenta*. 2006, 27:395-401. (査読あり)
11. Kitajima Y, Endo T, Nagasawa K, Manase K, Honma H, Baba T, Hayashi T, Chiba H, Sawada N, Saito T. Hyperstimulation and a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Modulate Ovarian Vascular Permeability by Altering Expression of the Tight Junction Protein Claudin-5. *Endocrinology*. 2006, 147:694-9. (査読あり)
12. Ohya M, Nishitani C, Sano H, Yamada C, Mitsuzawa H, Shimizu T, Saito T, Smith K, Crouch E, Kuroki Y. Human pulmonary surfactant protein D binds the extracellular domains of Toll-like receptors 2 and 4 through the carbohydrate recognition domain by a mechanism different from its binding to phosphatidyl- inositol and lipopolysaccharide. *Biochemistry*. 2006, 45:8657-64. (査読あり)
13. Nagasawa K, Chiba H, Fujita H, Kojima T, Saito T, Endo T, Sawada N. Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells. *J Cell Physiol*. 2006, 208:123-32. (査読あり)
14. Manase K, Endo T, Chida M, Nagasawa K, Honma H, Yamazaki K, Kitajima Y, Goto T, Kanaya M, Hayashi T, Mitaka T, Saito T. Coordinated elevation of membrane type 1-matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 expression in rat uterus during postpartum involution. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006, 2:24-32. (査読あり)
15. Honma H, Endo T, Henmi H, Nagasawa K, Baba T, Yamazaki K, Kitajima Y, Hayashi T, Manase K, Saito T. Altered expression of Fas/Fas ligand/caspase 8 and membrane type 1-matrix metallo- proteinase in atretic follicles within dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries in rats. *Apoptosis*. 2006, 11:1525-33. (査読あり)
16. Baba T, Endo T, Honma H, Kitajima Y, Hayashi T, Ikeda H, Masumori N, Kamiya H, Moriwaka O, Saito T. Association between polycystic ovary syndrome and female-to-male transsexuality. *Hum Reprod*. 2006, 22(4):1011-6(査読あり)

17. Ishioka S, Ezaka Y, Umemura K, Hayashi T, Endo T, Saito T. Proteomic analysis of mechanisms of hypoxia-induced apoptosis in trophoblastic cells. Int J Med Sci. 2006, 4:36-44. (査読あり)

〔学会発表〕(計 4件)

1. 第61回日本産科婦人科学会総会・学術講演会(2009年4月3~5日:京都) 癌細胞におけるBAG3発現の意義 両坂 美和・岩崎 雅宏・斎藤 豪 .
2. 第61回日本産科婦人科学会総会・学術講演会(2009年4月3~5日:京都) 卵巣癌におけるオステオポンチンの発現の検討 . 松浦基樹・鈴木 孝浩・伊東 英樹・斎藤 豪 .
3. 日本癌治療学会 (2007年10月24日~26日:京都) バイスタンダー効果を応用した遺伝子治療の研究 . 鈴木孝浩、森下美幸、松浦基樹、藤本 尚、斎藤 豪 .
4. International Conference Physiology and Pathological Importance of GAP Junctions. (2006年10月22日:東京) Bystander killing of uterine endometrial cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase is mediated by ganciclovir and retinoids. Suzuki T, Morishita M, Matuura M, Tanaka R, Fujimoto T, Saito T.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

斎藤 豪(TSUYOSHI SAITO)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号:90145566

(2)研究分担者

鈴木 孝浩(TAKAHIRO SUZUKI)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号:60398328

藤本 尚(TAKASHI FUJIMOTO)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号:70398329

(3)連携研究者

なし