

平成21年5月29日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591928  
 研究課題名（和文） 浮遊卵巣癌細胞の転移能獲得に対するラミニン分子の役割—新たな分子治療開発に向けて  
 研究課題名（英文） The role of laminin peptides for acquirement of metastasis of the free floating of ovarian cancer spheroids  
 研究代表者  
 吉田 好雄（YOSHIDA YOSHIO）  
 福井大学・医学部・准教授  
 研究者番号：60220688

研究成果の概要： AG73T laminin peptide はシスプラチンの作用を増強し、卵巣がんの新たな治療法になる可能性がある

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：卵巣がん、 laminin peptide syndecan-1 cisplatin

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣癌の予後は、最近の種々の研究にもかかわらず、不良である。その最大の理由は、卵巣の解剖学的特徴にある。卵巣は、隣接した臓器が存在しない代わりに、骨盤腔というスペースの中で、腹水に浸された状態で存在する。このため、腫瘍の被膜破綻と共に、癌細胞が容易に腹水中に流出し、早期に腹膜播種を許すためである。従って、腹水中に流出した卵巣癌細胞が、如何に生存し、転移能を獲得するのかを解明することは卵巣がん転移機序、さらにはその治療法開発に有用である。

我々は、腫瘍の被膜破綻時に、腹水中に流出する細胞外マトリックス成分の重要な構成成分の一つであるラミニン、あるいはラミニン中に存在する active peptide が、腹水中

の卵巣癌細胞の転移能獲得に重要な役割を果たしているという仮説をたてた。

事実、福井大学病院産婦人科において informed consent を得た良性・悪性卵巣腫瘍を有する患者より、血清・腹水を採取し、血清・腹水中のラミニン濃度を EIA kits (Takara Shuzo Co) で測定したところ、血清中のラミニン濃度は良性(995ng/ml)・悪性卵巣腫瘍(992ng/ml)( $P>0.05$ )と有為差は認められなかったが、腹水中の濃度は、良性(960ng/ml)・悪性卵巣腫瘍(3300ng/ml)( $P<0.0001$ )と、明らかな有為差を認めた。また腹水中の濃度は、臨床進行期と相関し、さらに、同じ臨床進行期でも、腹水中のラミニン濃度が高い症例に再発率が高かった。

しかし、ラミニン分子は、分子量90万の巨大分子であり、実験的扱いが困難な

ことから、ラミニンが、腹水中の卵巣癌細胞の転移能獲得に果たす役割の分子機構はなお不明である。この点の解消の目的で、共同研究者である HK、Kleinmann らは、ラミニン-1 のアミノ酸配合をいくつかの構成ペプチド（機能単位）に分け、それぞれのペプチドを生合成した。当該研究者らは、これらの合成ペプチドの中から、卵巣がんの細胞接着・増殖に関し重要な分子（以下ラミニンペプチド）を同定することに成功し 2005、2006 年度のアメリカ癌学会で発表した。

一方、腹水中に存在する転移能を獲得した卵巣癌細胞に対する治療法の開発には、ヒトの臨床像を再現する実験モデルの存在が必要不可欠である。当該研究者らは、このような実験系の樹立、即ち、「ヒト臨床卵巣がん再現した卵巣癌転移動物モデル」の作成と、「卵巣癌腹膜播種 in vitro モデル」の作成に世界に先駆けて成功している。

## 2. 研究の目的

この研究の目的は、当該研究者らが開発した「ヒト卵巣癌マウスモデル」と「卵巣癌腹膜播種 In vitro モデル」を用いて、共同研究者である HK、Kleinmann らが生成したラミニンペプチドのなかで、これまで、同定した卵巣癌の細胞増殖に関し重要なラミニン-1 より生成された構成ペプチド（機能単位）について、

1) ラミニン・ペプチドが卵巣癌細胞の、腹水中での生存・増殖・転移能獲得にどのように関与するかを in vitro, in vivo 実験系を用いてその signal transduction 系を中心に検討すること。

2) また、各々のペプチドや、その antagonist type peptide が卵巣癌の腹膜播種や転移の抑制に有用か否かも検討する。

## 3. 研究の方法

### 1) 浮遊増殖性卵巣癌細胞(TAC3)に対するラミニン-1・ペプチドの接着能・増殖能の検討

卵巣がんの細胞増殖に関し重要な分子と判明した AG73 (RKRLQVQLSIRT) ラミニン-1ペプチドが、浮遊増殖性卵巣癌細胞(TAC3)と、どの程度接着するか否かを検討

する。また、その接着能は用量依存性か、時間依存性かを確認した。接着実験は Cell Counts あるいは Flow cytometer をもちいた。同様なことを、溶解した laminin-1 存在下で、laminin-1 peptide を添加し、増殖能・接着能に変化があるか否かを検討した。

### 2) laminin peptide の antagonist type peptide を用いた接着抑制実験

接着に重要と思われた AG73 の antagonist type が AG73 と TAC3 との接着をどの程度阻止するかどうかを検討した。同様なことを、溶解した laminin-1 存在下で、laminin-1 peptide を添加し、増殖能・接着能に変化があるか否かを検討する。また阻止した場合それは用量依存性か、時間依存性かを確認した。

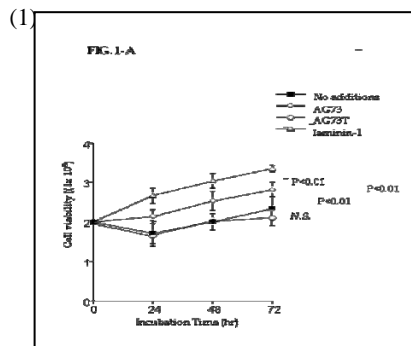
### 3) laminin peptide、あるいは antagonist type peptide の接着あるいは接着抑制の機序解明

laminin peptide、あるいは antagonist type peptide の TAC3 細胞における接着あるいは接着抑制の機序解明のために、まず、どの接着分子が重要かを、flow cytometry を用いて検討。次に細胞内情報伝達経路を検討するために、癌およびアポトーシス関連物質 (Bcl-2, Bcl-xlong, Bcl-xshort, Bax, p53, Mdm2, )、接着分子と細胞骨格分子の発現 (integrin, syndecan) を蛋白レベル (Western blot) で検討した。

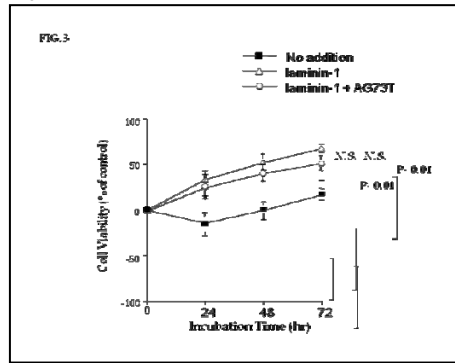
### 4) 各種抗癌剤がラミニンペプチドの作用に及ぼす影響の検討

上記の実験の条件に抗癌剤 (cisplatin) を投与し、この時の薬物効果を apoptosis の程度で検討した。この結果から、laminin peptide や、その antagonist type peptide と抗癌剤の組み合わせによる治療法の確立を模索した。

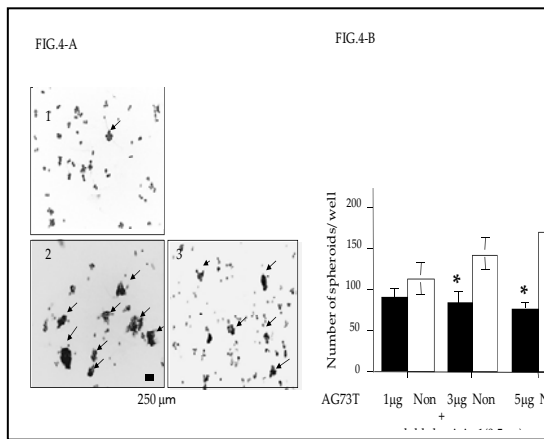
## 4. 研究成果



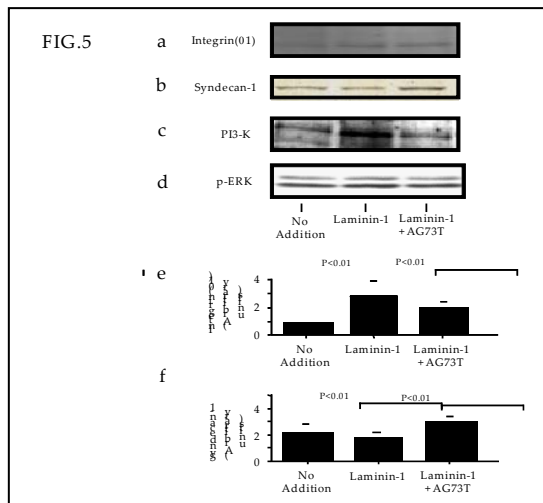
浮遊増殖細胞にLaminin-1 AG73Tを添加すると細胞は増殖するが AG73scramble typeは増殖能に変化しない



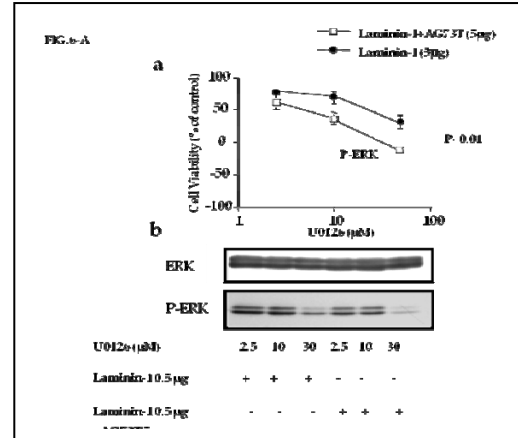
Laminin-1にAG73Tを添付すると細胞の増殖能はあまり変化させなかったがやや増殖能を抑制した



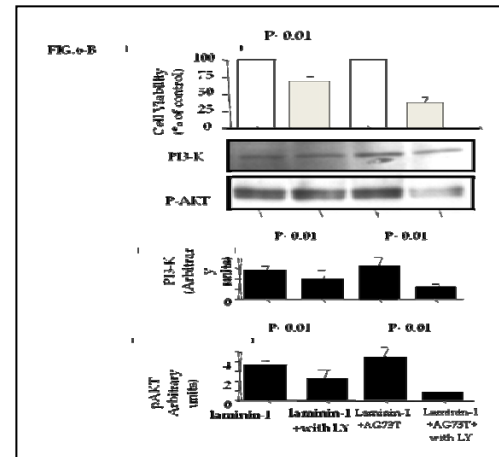
AG73Tを添加させると有意にapoptosisを誘発した



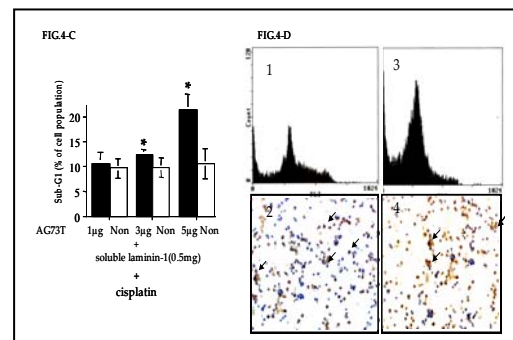
AG73Tはsyndecan-1を介して浮遊増殖細胞を増加させた



ERK抑制するU0126はP-ERKを阻害して細胞の増殖を抑制した



同様にPI3Kの活性を抑制した



AG73Tとcisplatinを投与すると相加的に細胞をapoptosisを誘引した

## 結論

従ってAG73Tはsyndecan-1による細胞間接着を阻害して細胞内のPI3-AKT活性を阻害して卵巣がん細胞のapoptosisを誘発する。さらにcisplatinと相加的に働いて卵巣がん細胞を効果的にcell deathに作用させる可能性があることが判明した。

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1件)

Yoshida Y, Kurokawa T, Nishikawa Y, Orisa M, Kleinman HK, Kotsuji F.  
Laminin-1-derived scrambled peptide AG73T disaggregates laminin-1-induced ovarian cancer cell spheroids and improves the efficacy of cisplatin. Int J Oncol. 2008 Mar;32(3):673-81.  
査読の有無：有

〔学会発表〕(計2件)

①Yoshida Y, Kurokawa T, Kotsuji F, Hynda K Kleinmann A potent peptide antagonist to an active laminin-1 sequence and cisplatin synergize in down regulation of Bcl-2/Bax ratios induction of apoptosis in human ovarian cancer cells.  
13 World Congress on Advances in Oncology Greece 2008

②Yoshida Y, Yagihara A, Kurokawa T, Kotsuji F, Hynda K Kleinmann  
Laminin-1 derived AG73 peptides inhibited formation of multicellular spheroids of free-floating ovarian cancer cells. Proceedings of American Association for Cancer Research Los Angeles USA 2007

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 好雄 (YOSHIDA YOSHIO)  
福井大学・医学部 産婦人科・准教授  
研究者番号：602206688

### (2) 研究分担者

澤村 陽子 (SAWAMURA YOKO)  
福井大学・医学部 産婦人科・助教  
研究者番号：40436845

品川 明子 (SHINAGAWA AKIKO)  
福井大学・医学部 産婦人科・助教  
研究者番号：90444223

### (3) 研究協力者

Hynda H Kleinmann  
NIH・教授