

平成 21 年 4 月 8 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19791152
 研究課題名（和文） Digital karyotyping を用いた卵巣明細胞腺癌の新規分子標的の検索
 研究課題名（英文） Digital Karyotyping in ovarian clear cell carcinoma
 研究代表者 中山 健太郎（ Nakayama Kentaro ）
 島根大学 医学部 講師
 研究者番号：70346401

研究成果の概要：

Disital Karyotyping (DK)、Serial Analysis Gene Expression (SAGE) を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、卵巣癌特有の遺伝子変化を同定し、卵巣癌の治療を目指した分子標的を同定する事を目的とした。近年、造血器腫瘍を中心に癌遺伝子の機能がクローズアップされている BTB/POZ 遺伝子群に注目した。BTB/POZ 遺伝子群の中で NAC-1 遺伝子が有意に高発現している事を発見した。NAC-1 は再発卵巣癌でタンパク、遺伝子発現共に有意に高かった。また、*in vitro*, *in vivo* の両方で NAC-1 は Oncogenic な機能を有する事を発見した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,500,000 | 0 | 2,500,000 |
| 2008年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 240,000 | 3,540,000 |

研究分野：外科系臨床

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：癌、ゲノム

1. 研究開始当初の背景

本邦での上皮性卵巣癌における卵巣明細胞腺癌の発生頻度は 21.4%であり、30 年間で約 5 倍に増加している。卵巣明細胞腺癌は白金製剤を主体とする現在の卵巣癌の化学療法に抵抗性で極めて予後不良であり増加傾向にあることから、婦人科腫瘍医にとって最も関心が高い腫瘍の一つである。そのため、卵巣明細胞腺癌に

対する新規分子標的治療薬の開発に関する期待は非常に大きい。一方で卵巣明細胞腺癌の分子生物学的特徴は殆ど解明されておらず、分子標的薬剤開発の標的因子が解明されていないのが現状である。

2. 研究の目的

今回、我々はゲノムワイドに遺伝子増幅、欠損を検討できる **Digital Karyotyping** を用いて、

卵巣明細腺癌特有の癌遺伝子を同定し、そのタンパクの機能解析を行い、卵巣明細腺癌の治療を目指した分子標的を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

当科でインフォームドコンセントの得られた卵巣明細腺癌手術後の臨床検体を初代培養し、上皮細胞に対する鉄ビーズ付加上皮細胞特異抗体(anti-EpiCAM-conjugated beads)とマグネットを用いたセルソーティングを用いて癌細胞のみの検体からDNAを抽出する。約5~7症例でDigital Karyotypingを用いて卵巣明細腺癌における遺伝子増幅領域を同定する。卵巣明細腺癌、卵巣漿液性腺癌を使用したTissue Microarrayを用いてdual color FISH法で大規模サンプルでの遺伝子増幅の頻度、予後等について検討する。

4. 研究成果

①卵巣癌のDK、SAGEライブラリーを作成した。その中でも、近年、造血器腫瘍を中心に癌遺伝子の機能がクローズアップされているBTB/POZ遺伝子群に注目した。BTB/POZ遺伝子群の中でNAC-1遺伝子が有意に高発現している事を発見した。抗NAC-1マウスモノクローナル抗体を作成し臨床病理学的検討及び機能解析を行った。抗NAC-1抗体を用いた免疫組織染色及びReal-time PCR法を用いた遺伝子発現解析にてNAC-1は再発卵巣癌で発現が有意に高かった。同一症例で初回手術時の組織と再発手術時の組織で比較すると、再発時のほうが有意にNAC-1の発現が上昇していた。初回手術時の組織で発現の高い症例は6ヶ月以内の再発率が有意に高かった。NAC-1を遺伝子導入した正常卵巣上皮細胞はVectorのみ導入した細胞に比べ、細胞増殖能、足場非依存性増殖能が亢進していた。NAC-1安定導入株をヌードマウスに移植すると腫瘍が産生された。NAC-1安定導入株はVector

のみ導入した細胞に比べ abnormal mitosis の数が有意に上昇していた。NAC-1安定導入株は低栄養下で抗アポトーシス能が亢進していた。

NAC-1は再発卵巣癌関連の新規癌遺伝子であり細胞生存に関与しており、再発卵巣癌治療の分子標的になり得ると考えられた。

②-1 NAC-1発現と子宮頸癌の関連

免疫組織染色にてNAC-1は扁平上皮癌に比べて腺癌で発現が有意に高かった。Real-time PCR法で遺伝子発現についても検討し、同様の結果を得た。扁平上皮癌では放射線療法を受けた症例に限ると、NAC-1高発現症例は有意に予後不良であった。腺癌では予後に影響しなかった。

②-2 NAC-1の機能解析

NAC-1未発現の子宮頸部癌細胞株にNAC-1を遺伝子導入した正常細胞はVectorのみ導入した細胞に比べ、低栄養下における増殖能、足場非依存性増殖能が亢進した。NAC-1安定導入株をヌードマウスに移植すると腫瘍産生能が有意に亢進した。NAC-1安定導入株は低栄養下で抗アポトーシス能が亢進した。

②-3 NAC-1の阻害実験

NAC-1のSi-RNAを用いた阻害実験ではNAC-1が高発現しているHela、HelaTG、ME180細胞で細胞死が誘導された。次にNAC-1のタンパクレベルでの機能について検討した。免疫沈降法を用いてNAC-1タンパクはホモダイマーを形成し機能している事を発見した。NAC-1タンパクのDeletion mutantを作成し免疫沈降法を用いるとN末端領域にてNAC-1はホモダイマーを形成していた。NAC-1が高発現しているHela細胞にN末端領域のSmall deletion mutantを遺伝子導入し発現させ、蛍光染色するとNAC-1の形態が点状からヌードル状に変化した。すなわち、N末端領域のDeletion mutantはドミナントネガティブタンパクとなり得る

事が示唆された。Tet-off system を用いて Deletion mutant の発現調節を行った。Deletion mutant を発現させると Hela 細胞には細胞死が誘導された。この Tet-off system を導入した Hela 細胞をヌードマウスに移植し腫瘍生成後、ドミナントネガティブタンパクを発現させると、腫瘍は縮小した。

BTB/POZ 遺伝子群の中に固形腫瘍でも増殖促進、抗アポトーシス機能を持ったものが存在することを初めて報告した。NAC-1 の N 末端結合領域に作用し、BTB 結合を抑制する small compound あるいは、peptide の合成が、子宮頸癌に対する新規分子標的治療になる事が示唆された。

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 7 件)

1. Ishibashi M, Nakayama K, Yeasmin S, Katagiri A, Iida K, Nakayama N, Miyazaki K. Expression of a BTB/POZ protein, NAC1, is essential for the proliferation of normal cyclic endometrial glandular cells and is up-regulated by estrogen. **Clin Cancer Res.** 15(3):804-809, 2009
2. Nakayama K, Nakayama N, Ishibashi M, Yeasmin S, Fukumoto M, Miyazaki K. Fractional allelic loss as a potential biomarker of risk prediction in early-stage mucinous ovarian tumors of low malignant potential. **European Journal of Gynecological Oncology** 2009 in press
3. Yeasmin S, Nakayama K, Ishibashi M, Katagiri A, Iida K, Manabe A, Nabika T, Nakayama N, Miyazaki K. Primary osteosarcoma of ovary.

International Journal of Clinical Oncology 2009 in press

4. Nakayama N, Nakayama K, Yeasmin S, Ishibashi M, Katagiri A, Iida K, Fukumoto M, Miyazaki K. KRAS or BRAF mutation status is a useful predictor of sensitivity to MEK inhibition in ovarian cancer. **Br J Cancer.** 16;99(12):2020-8, 2008
5. Ishibashi M, Nakayama K, Yeasmin S, Katagiri A, Iida K, Nakayama N, Fukumoto M, Miyazaki K. A BTB/POZ protein, NAC-1, a tumor recurrence associated gene, as a potential target for taxol resistance in ovarian cancer. **Clin Cancer Res.** 14(10):3149-55.2008.
6. Yeasmin S, Nakayama K, Ishibashi M, Katagiri A, Iida K, Purwana IN, Nakayama N, Miyazaki K. Expression of the Bric-a-Brac Tramtrack Broad Complex Protein NAC-1 in Cervical Carcinomas Seems to Correlate with Poorer Prognosis. **Clin Cancer Res.** 14(6):1686-91, 2008.
7. Huan Z, Nakayama K, Nakayama N, Ishibashi M, Yeasmin S, Katagiri A, Purwana IN, Iida K, Maruyama R, Fukumoto M, Miyazaki K. Genetic classification of ovarian carcinoma based on microsatellite analysis: relationship to clinicopathological features and patient survival. **Oncol Rep.** 19(3):775-81, 2008

[学会発表] (計 6 件)

1. 中山健太郎, 石橋雅子, ヤスミン・シヤミマ, 片桐敦子, 飯田幸司, 中山真美, 宮崎康二 『**卵巣癌、子宮頸部腺癌における転写制御因子 NAC-1 をターゲットとした分子標的治療確立のための基礎的検討**』, 第 61 回日本

婦人科がん分子標的研究会, 日本産婦人科学会総会, 2009年4月5日、京都

2. **中山健太郎**, シャミマ ヤスミン, 石橋雅子, 片桐敦子, 飯田幸司, 中山真美, 宮崎康二, 中山 理, 大月寛郎, 小林 寛:『転写制御因子 NAC-1 をターゲットにした子宮頸部腺癌の分子標的治療の確立』. 第 45 回特非日本婦人科腫瘍学会, 金沢, 2008 年 11 月 22 日
3. **中山健太郎**, 石橋雅子, ヤスミン・シャミマ, 片桐敦子, 飯田幸司, 中山真美, 宮崎康二:『卵巣癌における SAGE を用いた新規分子標的の検索—転写制御因子 NAC-1 の分子標的としての可能性—』. 第 7 回日本婦人科がん分子標的研究会, 名古屋, 2008 年 7 月 18 日
4. **中山健太郎**, 石橋雅子, ヤスミン・シャミマ, 片桐敦子, 飯田幸司, 中山真美, 宮崎康二:『卵巣癌におけるクロマチンリモデリング因子 RSF-1 の遺伝子増幅』. 第 49 回日本臨床細胞学会, 東京, 2008 年 6 月 7 日
5. **中山健太郎**, 石橋雅子, ヤスミン・シャミマ, 片桐敦子, 飯田幸司, 中山真美, 宮崎康二:『卵巣癌における SAGE を用いた新規分子標的の検索—転写制御因子 NAC-1 の分子標的としての可能性—』. 第 60 回日本婦人科がん分子標的研究会, 日本産婦人科学会総会, 2008 年4月11日、横浜
6. **中山健太郎**, 石橋雅子, ヤスミン・シャミマ, 片桐敦子, 飯田幸司, Tian-le Wang, le-ming Shin, 宮崎康二:『Sequence mutations and amplification of PIK3CA and AKT2 genes in purified ovarian serous neoplasms』. 第 66 回日本癌学会学術総会. 横浜, 2007 年 10 月

[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]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 健太郎 (NAKAYAMA KENTARO)

島根大学・医学部・講師

研究者番号: 70346401

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: