

機関番号：22701

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590363

研究課題名 (和文) 腫瘍微小環境を調節する G 蛋白質共役受容体と 4 回膜貫通蛋白質との
クロストーク研究課題名 (英文) Signaling cross-talk between G protein-coupled receptor and
tetraspanin in tumor inflammatory microenvironment

研究代表者

古屋 充子 (FURUYA MITSUKO)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：10361445

研究成果の概要 (和文)：

炎症性背景をもつ発癌モデルとして内膜症と明細胞腺癌とにおける炎症性微小環境変化を解析した。G 蛋白質共役受容体 CXCR3 を解析したところ、3 つの変異体がヒト組織で確認された。定性解析の結果、CXCR3A は内膜症、癌両者で上昇していた。CXCR3-alt は癌で特異的に発現し、CXCR3B は抑制されていた。CXCL11、CXCL4 の発現パターンは各々 CXCR3-alt、CXCR3B と相関した。局在解析では、CXCR3-alt は腫瘍血管に、CXCR3B は正常血管や内膜症血管にシグナルが認められた。以上の結果、G 蛋白質共役受容体 CXCR3 は変異体により発現組織・細胞が異なり、そのリガンド環境も疾患によって異なることが示唆された。CXCR3B では抑制性、CXCR3-alt では亢進性シグナルが作動すると予想された。今回期間内では変異体依存性シグナルと 4 回膜貫通蛋白 (TM4) との関連を明らかに出来なかったが、今後は細胞レベルで G 蛋白質共役受容体シグナルを介した浸潤・移動能調節機構にインテグリン/TM4 がどう応答するか解析する予定である。

研究成果の概要 (英文)：

The difference of inflammatory microenvironment between ovarian cancers and endometriosis was investigated. We detected three CXCR3 variants in human tissues. Quantitative analyses revealed differential expressions of three variants. CXCR3-alt was upregulated and CXCR3B was downregulated in caners compared with endometriosis. In situ hybridization demonstrated preferential expression of CXCR3B in non-cancerous vessels and CXCR3-alt was detectable mainly in tumor vessels. Collective data suggest that differential expression patterns of CXC chemokines and CXCR3 variants are involved in inflammatory microenvironments of ovarian cancers and cancer-associated conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：分子病理

1. 研究開始当初の背景

研究代表者(古屋)は腫瘍血管において特異的に高発現を呈するG蛋白質シグナル調節因子 RGS5 を初めて病理学的に同定した。(Furuya M, et al. J Pathol 2004). 更に慢性炎症である子宮内膜症を母体とする内膜症合併卵巣癌や、炎症細胞浸潤が高度な腎癌において、血管作動性G蛋白質 CXC ケモカインとその受容体を解析し (Furuya M, et al. Cancer 2005, Hum Pathol 2007), 腫瘍と基質の接触において4回膜貫通蛋白テトラスパニンが MMPs の産生に重要な役割を果たすことを示した (Furuya M, et. al. Cancer Res 2005, Lab Invest 2007). そのなかで、G蛋白質を介したシグナルが、炎症細胞浸潤や腫瘍細胞の移動に必要な chemotaxis を獲得するために、どのように骨格調節因子とクロストークするのか、腫瘍新生血管内皮や腫瘍間質細胞・基質が腫瘍細胞と接触する部位において発現変化する微小環境調節因子を治療の標的とした治療応用へ繋げるために、本研究を展開させてきた。

2. 研究の目的

炎症性疾患を背景とした発癌・癌進展におけるG蛋白質シグナル CXC ケモカインに着目し、炎症時に発現する CXCR3 と癌炎症性微小環境において上昇する CXCR3 の違いを検討し、癌環境における CXCR3 が関与する細胞移動・浸潤関連細胞質内シグナルクロストークを解明し、診断や治療に有用な分子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

発癌機構モデルとして卵巣子宮内膜症、内膜症関連卵巣癌サンプルを収集した。各疾患における CXCR3 シークエンスを検討した。変異体特異的プライマーを用いてQ-PCRを施行し、WBにて蛋白発現を検討した。CXCR3 作動性ケモカインの発現を網羅的に検討した。In situ hybridization を施行し卵巣癌や内膜症における CXCR3 の局在を検討した。

4. 研究成果

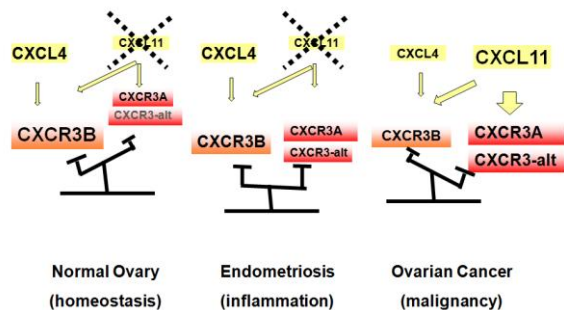
①シークエンス解析の結果、卵巣検体において古典的 CXCR3 である CXCR3A のほか2つの変異体(CXCR3B, CXCR3-alt) が卵巣組織に存在することが確認された。それらの発現を疾患別に検討したところ、CXCR3A は正常卵巣に比較し、内膜症と卵巣癌の両方で上昇していた。一方 CXCR3-alt は癌特異的に発現し、内膜症や正常卵巣には殆ど認められなかった。対照的に CXCR3B は正常卵巣では豊富に発現しているのに対し、殆どの卵巣癌で抑制されていた。卵巣癌を組織学的に内膜症合併卵巣癌 (EAOC, endometriosis-associated

ovarian carcinoma) と合併が認められない卵巣癌 (non-EAOC) の二群に分けて検討したところ、EAOC は内膜症と non-EAOC の中間値を示した。ウェスタンブロットにおいて蛋白発現を検討したところ、Q-PCR の結果を指示する結果が得られた。

②CXCR3 に作動するケモカインは少なくとも4種類以上あるが、CXCL4 および CXCL9-11 の発現を解析したところ、CXCL11 が卵巣癌特異的に上昇し、一方 CXCL4 は多くの卵巣癌症例で減弱することが分かった。さらに CXCL4 の発現は CXCR3B と、CXCL11 の発現は CXCR3-alt と相関する結果が得られた。これらのことから内膜症では CXCL4-CXCR3B axis が効力を発しているのに対し、卵巣癌では CXCL4-CXCR3B axis が破綻し、替って CXCL11- CXCR3-alt axis が優勢になることが示唆された。

③In situ hybridization を施行し、各変異体の局在を検討したところ、CXCR3B は正常卵巣の血管内皮 内膜症血管内皮にシグナルが認められた。CXCR3A は内膜症における炎症細胞や癌における炎症細胞のほか、癌細胞自身にもシグナルが認められた。CXCR3-alt のシグナルは癌で特異的に認められたがその発現は弱く、主に腫瘍新生血管に局在していた。これらの結果から、内膜症と内膜症を母地とする卵巣癌においては CXCR3 変異体が炎症性微小環境の違いに貢献しており、癌進展に有意な環境へと経時的に変化していく可能性も考えられる。これらの結果を総合すると、CXCL-CXCR3 変異体のバランス破綻が内膜症における発癌機構に関与する可能性が示唆された。次ページにそのシェーマを示す。

Hypothesis of CXC ligands-CXCR3 Axis



腫瘍細胞に発現する CXCR3 は CXCL11 によって惹起される細胞移動能亢進性シグナルを、一方炎症細胞に発現する CXCR3 は CXCL4 による増殖抑制性シグナルを反映することが予想される。今後は各変異体によって制御される細胞機能を詳細に解明することが課題となる。Chemotaxis, intravasation, extravasation などの細胞浸潤転移時に起こるダイナミックな細胞骨格変化、細胞外マトリクスとの相互作用に關与する各変異体シグナルをインテグリン/TM4 とのクロストークから解明していく予定である。

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, コレスポには *印)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Furuya M*, Tanaka R, Aoki I et al. Differential Expression Patterns of CXCR3 Variants and Corresponding CXC Chemokines in Clear Cell Ovarian Cancers and Endometriosis. *Gynecol Oncol*, in press (査読有).
- ② Furuya M*, Aoki I et al. Complexity of Tumor Vasculature and Molecular Targeting Therapies. *Front Biosci*, 3:549-61, 2011 (査読有).
- ③ Furuya M*, Nagahama K, Aoki I et al. Disrupted Balance of Angiogenic and Antiangiogenic Signalings in Preeclampsia. *Journal of Pregnancy*, 2011, Article ID 123717, 2011. doi:10.1155/2011/123717(査読有).
- ④ Tachibana T, Tomita N, Furuya M, et al. Aberrant CD20 expression in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Int Med* 50(5):495-9, 2011(査読有).
- ⑤ Murakami A, Furuya M, Nagahama K, et al. A novel method for isolating podocytes using magnetic activated cell sorting. *Nephrol Dial Transplant*. 25:3884-90, 2010 (査読有).
- ⑥ Shida T, Furuya M, Miyazaki M et al. Expression of an activated mammalian target of rapamycin (mTOR) in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 65:889-93, 2010 (査読有).
- ⑦ Koga S, Furuya M*, Nakatani Y BHD syndrome. *Nippon Rinsho*. 68, 361-369, 2010
- ⑧ Koga S, Furuya M*, Nakatani Y et al. Lung Cysts in BHD Syndrome: Histopathological characteristics and Aberrant Sequence Repeats. *Pathol Int*, 59:720-8, 2009. (査読有).

⑨ Yamashita M, Furuya M, Takahashi K et al. Metastasis of malignant struma ovarii to the lumbar spine. *J Clin Neurosci*. 17:269-72. 2009 (査読有).

⑩ Furuya M*, Yonemitsu Y, Aoki I. Complexity of Tumor Vasculature and Microenvironment. *Curr Pharm Des* 15:1854-67, 2009 (査読有).

⑪ Furuya M*, Ishida J, Fukamizu A et al. Pathophysiology of Placentation Abnormalities in Pregnancy-Induced Hypertension. *Vasc Health Risk Manag*, 4, 1301-1313, 2008 (査読有).

⑫ Furuya M*, Yonemitsu Y. Cancer Neovascularization and Proinflammatory Microenvironments. *Curr Cancer Drug Targets*, 8:253-265. 2008 (査読有).

⑬ Shida T, Furuya M, Miyazaki M et al. The expression of NeuroD and mASH1 in the gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Mod Pathol*. 21: 1363-1370, 2008 (査読有).

⑭ Furuya M, Ishida J, Fukamizu A et al. Impaired Placental Neovascularization in Mice with Pregnancy-Associated Hypertension. *Lab Invest*; 88:416-429. 2008 (査読有).

[学会発表] (計 20 件)

- ① 古屋充子, 田中玲子, 青木一郎ほか. 卵巣腫瘍における INF- γ 誘導性ケモカイン受容体 CXCR3 バリエーションの解析. 第 99 回日本病理学会春季総会 (東京), 2010. 4.
- ② 古屋充子, 古賀俊輔, 中谷行雄ほか. BHD 症候群と判明した多発性肺嚢胞の病理学的特徴. 第 99 回日本病理学会春季総会 (東京), 2010. 4.
- ③ 古屋充子, 宮城悦子, 青木一郎ほか. Distinct expression patterns of CXCR3 variants in tumor and tumor-associated inflammatory diseases of the ovary. 第 69 回日本癌学会学術総会 (大阪), 2010. 9.
- ④ 新野 史, 稲山嘉明, 古屋充子. 腹腔内再発を繰り返した子宮間葉系腫瘍の一例. 第 32 回日本婦人科病理学会 (東京), 2010. 6.
- ⑤ 立花崇孝, 富田直人, 古屋充子, ほか. 経過中に CD20 陽性を示した AITL の一例. 第 50 回日本リンパ網内系学会 (新潟), 2010. 6.
- ⑥ 古屋充子. 妊娠高血圧症候群における胎児・胎盤機能評価マーカーの検討. 神奈川県産婦人科医会地方部会 (平塚) 2010. 11
- ⑦ 米山朋那, 古屋充子, 青木一郎ほか: 卵巣腫瘍における血管作動性ケモカイン受容体 CXCR3 とそのリガンドの発現解析. 第 98 回日本病理学会総会 (京都), 2009. 5.
- ⑧ 古賀俊輔, 古屋充子, 中谷行雄ほか: BHD 遺伝子異常に基づく多発性肺嚢胞・嚢胞発症

機構に関する分子病理学的考察. 第 98 回日本病理学会総会 (京都), 2009. 5.

⑨ 古屋充子, 宮城悦子, 青木一郎ほか. Expression of CXCR3 variant in ovarian neoplasms. 第 68 回日本癌学会学術総会 (横浜), 2009. 10.

⑩ 古賀俊輔, 古屋充子, 中谷行雄ほか. Pathophysiology of the lung cysts caused by BHD mutation in BHD syndrome patients. 第 68 回日本癌学会学術総会 (横浜), 2009. 10.

⑪ 古屋充子, 石田純治, 深水昭吉ほか. 妊娠高血圧症候群における胎盤血管新生の病態解析 神奈川県産婦人科医会地方部会 (横浜) 2009. 7

⑫ 古屋充子, 石田純治, 深水昭吉ほか. 妊娠高血圧症候群における胎盤血管新生の病態解析 第 30 回日本妊娠高血圧学会総会 (岡山) 2009. 8.

⑬ 石田純治, 古屋充子, 深水昭吉ほか. 妊娠高血圧症モデルマウスにおける胎盤の血管構造変化に関する研究 第 30 回日本妊娠高血圧学会総会 (岡山) 2009. 8

⑭ 古屋充子: 妊娠高血圧症候群における胎盤解析の展望 神奈川県産婦人科医会地方部会 (相模大野) 2009. 11

⑮ 井畑穰, 宮城悦子, 古屋充子, ほか. 当院における絨毛性疾患 10 年の検討 第 47 回日本癌治療学会学術集会 (横浜), 2009. 10.

⑯ 古屋充子, 石田純治, 武内利直, 碓井宏和, 中谷行雄, 深水昭吉: 妊娠高血圧症候群における血管新生の病態解析. 第 97 回日本病理学会総会 (金沢), 2008. 5

⑰ 古賀俊輔, 古屋充子, 中谷行雄ほか. BHD syndrome が疑われる肺嚢胞性疾患の分子病理学的検討. 第 97 回日本病理学会総会 (金沢), 2008. 5.

⑱ Koga S, Furuya M, Nakatan Y et al: A Case of Multiple Pulmonary Cysts Associated with BHD Gene Mutation. 1st INAUGURAL BHD SYMPOSIUM (Roskilde), 2008. 9

⑲ 古屋充子, 宮城悦子, 青木一郎ほか. Implication of CXC-chemokines and their receptors for proinflammatory micro-environments of ovarian neoplasms. 第 67 回日本癌学会学術総会 (名古屋), 2008. 10.

⑳ 志田崇, 古屋充子, 宮崎勝ほか: The expression of Neuro D and mash in the gastroenteropancreatic NEC. 第 67 回日本癌学会学術総会 (名古屋), 2008. 10.

[図書] (計 1 件)

Furuya M: Complexity of Tumor Angiogenesis. M. A. Hayat, ed. STEM CELLS AND CANCER STEM CELLS, Springer, in press.

[その他]

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~byori2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古屋 充子 (FURUYA MITSUKO)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号: 10361445

(2) 研究分担者

田中 玲子 (TANAKA REIKO)
千葉大学・真菌研究医学センター・助教
研究者番号: 60143319

(3) 連携研究者

()

研究者番号: