

平成 23 年 5 月 31 日現在

機関番号 : 13601

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008 ~ 2011

課題番号 : 20591942

研究課題名 (和文) 卵巣癌における脱メチル化による S100A4 発現調節機序解析

研究課題名 (英文) Overexpression of S100A4 is associated with DNA hypomethylation and enhanced invasiveness in ovarian carcinomas

研究代表者 菊地 範彦 (KIKUCHI NORIHIKO)

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 50447728

研究成果の概要 (和文) : (1) 上皮性卵巣腫瘍113例に対して、抗S100A4抗体を用い免疫染色を行いその発現と細胞内局在を検討したところ、S100A4核発現陽性は癌で有意に高頻度であった。患者生存期間ではS100A4核陽性症例は陰性例に比し有意に短縮しており ($p=0.0045$)、多変量解析にて独立した予後因子であった。(2) S100A4低発現卵巣癌細胞にS100A4発現を誘導すると、細胞質のみならず、核にも発現が誘導され、同時に、*in vitro*での浸潤能が亢進した。(3) S100A4第一イントロンのこの領域のメチル化有無をbisulfate-PCR-sequence法にて検討した。OSE細胞およびS100A4低発現癌細胞ではメチル化されていたが、S100A4高発現細胞では脱メチル化されており、メチル化の有無がS100A4蛋白発現と相関していた。さらに、卵巣癌組織から採取したDNAを用いて解析した結果も同様に、脱メチル化率が高い症例はS100A4発現が増強していた。

研究成果の概要 (英文) : The S100A4 protein which belongs to calcium binding S100 protein family has been suggested to be linked to metastatic phenotypes of cancer cell. In this study, we investigated the association between the expression of S100A4 and hypomethylation of the S100A4 first intron in ovarian carcinoma cells. We first used immunohistochemistry to examine the expression and localization of S100A4 in 113 epithelial ovarian neoplasms and analyzed its prognostic significance in patients with ovarian carcinoma. Ovarian carcinoma patients with strong nuclear S100A4 expression showed a significantly shorter survival than those without ($p=0.0045$). Three ovarian cancer cell lines (SKOV3, A2780, A2780/CDDP) expressed S100A4, however, OVCAR3 and OSEs did not. Matrigel invasion assay showed that the expression level of S100A4 was associated with invasive ability in ovarian cancer cells. The specific siRNA for S100A4 suppressed S100A4 expression and the invasiveness of A2780/CDDP cells. We then studied the relationship between DNA methylation status and S100A4 expression by bisulfite-modified DNA sequencing in ovarian cancer cell lines and 51 cases of ovarian carcinoma tissues. We found that CpG sites in the first intron of the S100A4 gene were hypomethylated in S100A4 positive ovarian carcinoma cells. In contrast, these CpG sites were methylated in S100A4 negative ovarian carcinoma cells and S100A4 expression was altered by 5-aza-2deoxycytidine treatment. In ovarian cancer tissues, 24 cases of S100A4 strongly positive were hypomethylated in the first intron of S100A4 gene and 14 of all S100A4 negative cases were methylated.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：産婦人科

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、脱メチル化、S100A4

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、卵巣癌ではカルシウム結合蛋白の S100A4 発現が良性腫瘍に比べて増強していることを見出していることから、脱メチル化による S100A4 発現促進機構を検討することとした。

2. 研究の目的

卵巣癌における S100A4 発現亢進機序を解明するために、S100A4 遺伝子の第一イントロンの CpG サイトのメチル化の有無が関連するかどうかを解析し、卵巣癌における脱メチル化の意義を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 卵巣癌組織における S100A4 発現を検討し、予後との関係を解析した。不死化卵巣表層上皮細胞 (OSE2a) および卵巣癌細胞株における S100A4 の発現を RT-PCR、Western blot、蛍光抗体染色で検討した。2) 卵巣癌細胞の浸潤能を、Matrigel invasion assay によって評価し、S100A4 発現との相関を検討した。3) S100A4 発現を siRNA にて抑制し、その浸潤能の変化を Matrigel invasion assay にて検討した。4) OSE および S100A4 低発現細胞株 OVCAR3 に脱メチル化剤を添加し、S100A4 発現の変化を検討した。5) Bisulfite-sequence 法にて S100A4 発現と S100A4 遺伝子の第 1

exon の CpG サイトのメチル化との関連を検討した。

4. 研究成果

1) S100A4 核発現陽性は良性腫瘍に比べて癌で有意に高頻度であった。S100A4 核陽性症例は陰性例に比し有意に患者生存期間が短縮しており (p=0.0045)、独立した予後因子であった。卵巣癌細胞株においても悪性度の高い細胞株において S100A4 が発現していた。2) S100A4 低発現細胞株に比し、S100A4 発現細胞株においてその浸潤能が亢進していた。3) S100A4-siRNA によりその浸潤能が抑制された。4) 脱メチル化剤添加により S100A4 発現が回復した。5) OSE 細胞および S100A4 低発現癌細胞ではメチル化されていたが、S100A4 高発現細胞では脱メチル化されており、メチル化の有無が S100A4 蛋白発現と相関していた。

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 20 件)

- Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kanai Y, Shiozawa T, Tonegawa S, Konishi I. Molecular Approach to

- Uterine Leiomyosarcoma:
LMP2-Deficient Mice as an Animal Model
of Spontaneous Uterine
Leiomyosarcoma. *Sarcoma*.
2011;2011:476498. (査読あり)
2. Takano M, Kikuchi Y, Kudoh K, Goto T, Furuya K, Kikuchi R, Kita T, Fujiwara K, Shiozawa T, Aoki D. Weekly administration of temsirolimus for heavily pretreated patients with clear cell carcinoma of the ovary: a report of six cases. *Int J Clin Oncol*. 2011 Jan 18. (査読あり)
 3. Hayashi A, Horiuchi A*, Kikuchi N, Hayashi T, Fuseya C, Suzuki A, Konishi I, Shiozawa T. Type-specific roles of histone deacetylase (HDAC) overexpression in ovarian carcinoma: HDAC1 enhances cell proliferation and HDAC3 stimulates cell migration with down-regulation of E-cadherin. *Int J Cancer*. 2010;127(6):1332-46. (査読あり)
 4. Abiko K, Mandai M, Hamanishi J, Matsumura N, Baba T, Horiuchi A, Mikami Y, Yoshioka S, Wakasa T, Shiozawa T, Konishi I. Oct4 expression in immature teratoma of the ovary: relevance to histologic grade and degree of differentiation. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(12):1842-8. (査読あり)
 5. Okamoto T, Matsumura N, Mandai M, Oura T, Yamanishi Y, Horiuchi A, Hamanishi J, Baba T, Koshiyama M, Shiozawa T, Konishi I. Distinguishing primary from secondary mucinous ovarian tumors: an algorithm using the novel marker DPEP1. *Mod Pathol*. 2010 Nov 12. (査読あり)
 6. Suzuki A, Horiuchi A, Ashida T, Miyamoto T, Kashima H, Nikaido T, Konishi I, Shiozawa T. Cyclin A2 confers cisplatin resistance to endometrial carcinoma cells via up-regulation of an Akt-binding protein, periplakin. *J Cell Mol Med*. 2010 Sep;14(9):2305-17. (査読あり)
 7. Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kanai Y, Shiozawa T, Tonegawa S, Konishi I. Mice-lacking LMP2, immuno-proteasome subunit, as an animal model of spontaneous uterine leiomyosarcoma. *Protein Cell*. 2010 Aug;1(8):711-7. (査読あり)
 8. Fakhry H, Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A, Ke H, Konishi I, Shiozawa T. Immunohistochemical detection of histone deacetylases in endometrial carcinoma: involvement of histone deacetylase 2 in the proliferation of endometrial carcinoma cells. *Hum Pathol*. 2010 Jun;41(6):848-58. (査読あり)
 9. Suzuki A, Horiuchi A, Oka K, Miyamoto T, Kashima H, Shiozawa T. Immunohistochemical detection of steroid receptor cofactors in ovarian endometriosis: involvement of down-regulated SRC-1 expression in the limited growth activity of the endometriotic epithelium. *Virchows Arch*. 2010 Apr; 456(4):433-41. (査読あり)
 10. Hayashi T, Kobayashi Y, Horiuchi A, Hiraoka N, Kanai Y, Aburatani H, Tonegawa S, Konishi I, and Sano K. : Tumor immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape-in case of uterine leiomyosarcoma-. *Current Res. Immunol*. 2010; Inpress. (査読あり)
 11. Ohira S, Miyake M, Kobara H, Kikuchi N, Osada R, Ashida T, Hirabayashi K, Nishio S, Kanai M, Shiozawa T. Fetal goitrous hypothyroidism due to maternal thyroid stimulation-blocking antibody: a case report. *Fetal Diagn Ther*. 2010;28(4):220-4. (査読あり)
 12. Satoh T, Hatae M, Watanabe Y, Yaegashi N, Ishiko O, Kodama S, Yamaguchi S, Ochiai K, Takano M, Yokota H, Kawakami Y, Nishimura S, Ogishima D, Nakagawa S, Kobayashi H, Shiozawa T, Nakanishi T, Kamura T, Konishi I, Yoshikawa H Outcomes of fertility-sparing surgery for stage I epithelial ovarian cancer: a proposal for patient selection. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1727-32. (査読あり)
 13. 堀内晶子、布施谷千穂、林晶子、菊地範彦、塩沢丹里：卵巣癌腹膜播種性転移の分子機序。産婦人科の実際 vol.59 No.10, pp1501-1508. 2010. (査読なし)
 14. 堀内晶子、塩沢丹里：卵巣癌発生の自然史と早期診断。信州医誌, 48:143~151, 2010 (査読あり)
 15. Miyamoto T, Horiuchi A, Kashima H, Suzuki A, Yamada T, Kurai M, Konishi I, Shiozawa T. Inverse correlation between Skp2 and p27 (Kip1) in normal endometrium and endometrial carcinoma. *Gynecol Endocrinol*. 2009 Aug 31:1-10. (査読あり)

16. Yoshida J, Horiuchi A, Kikuchi N, Hayashi A, Osada R, Ohira S, Shiozawa T, Konishi I. Changes in the expression of E-cadherin repressors, Snail, Slug, SIP1, and Twist, in the development and progression of ovarian carcinoma: the important role of Snail in ovarian tumorigenesis and progression. *Med Mol Morphol.* 2009 Jun;42(2):82-91. (査読あり)
17. Kashima H, Shiozawa T, Miyamoto T, Suzuki A, Uchikawa J, Kurai M, Konishi I. Autocrine stimulation of IGF1 in estrogen-induced growth of endometrial carcinoma cells: involvement of the mitogen-activated protein kinase pathway followed by up-regulation of cyclin D1 and cyclin E. *Endocr Relat Cancer.* 2009 Mar;16(1):113-22. (査読あり)
18. Kashima H, Horiuchi A, Uchikawa J, Miyamoto T, Suzuki A, Ashida T, Konishi I, Shiozawa T. Up-regulation of nuclear receptor corepressor (NCoR) in progesterin-induced growth suppression of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Anticancer Res.* 2009 Apr;29(4):1023-9. (査読あり)
19. Horiuchi A*, Kikuchi N, Osada R, Wang C, Hayashi A, Nikaido T, Konishi I. Overexpression of RhoA enhances peritoneal dissemination: RhoA suppression with Lovastatin may be useful for ovarian cancer. *Cancer Sci.* 2008 Dec;99(12):2532-9. (査読あり)
20. 堀内晶子 : 卵巣癌の発生および進展のエピジェネティクス解析-BRCA1メチル化およびS100A4脱メチル化の臨床的意義 *日本産科婦人科学会雑誌.* 60: 1844-1854, 2008(査読なし)

[学会発表] (計 5件)

1. Horiuchi A : Possible role of hypoxia in ovarian cancer progression Special Oncology Seminar on "Hypoxia and Cancer" 婦人科腫瘍学セミナー 京都大学医学研究科がんプロフェッショナル養成プラン事業 2010年6月7日 京都
2. 長田亮介、堀内晶子、林 晶子、布施谷千穂、菊地範彦、三橋祐布子、塩沢丹里 卵巣癌における癌抑制遺伝子Int6およびhypoxia inducible factor(HIF)- α サ

ブユニット発現の検討 第62回日本産科婦人科学会総会・学術講演会、2010年4月23日、東京

3. 大平哲史、大久保奈緒、山崎悠紀、小野恭子、小原久典、菊地範彦、金井 誠、塩沢丹里 : 妊娠10週から嚢胞状エコー像が出現したplacental mesenchymal dysplasiaの1例 第18回日本胎盤学会学術集会 2010年9月30日、熊本
4. 菊地範彦、堀内晶子、林琢磨、林晶子、長田亮介、布施谷千穂、塩沢丹里、小西郁生: 低酸素環境卵巣癌細胞においてS100A4発現はHypoxia-inducible factor-1 α を介し亢進する。第60回日本産科婦人科学会・学術講演会 ポスター 2008年4月15日 東京
5. 堀内晶子 : 卵巣癌の発生および進展のエピジェネティクス解析-BRCA1メチル化およびS100A4脱メチル化の臨床的意義、第60回日本産科婦人科学会・学術講演会 シンポジウム 口演 2008年4月14日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地範彦 (KIKUCHI NORIHIKO)

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 50447728

(2) 研究分担者

堀内晶子 (HORIUCHI AKIKO)

信州大学・医学部・講師

研究者番号: 80334895

布施谷千穂 (FUSEYA CHIHO)

信州大学・医学部附属病院・助教 (診療)

研究者番号: 50447736

塩沢丹里 (SHIOZAWA TANRI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号: 20235493

(3) 連携研究者

なし ()