

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：20101  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22591945  
 研究課題名（和文）  
 視細胞特異蛋白質リカバリンの癌異所性発現がもたらす癌関連網膜症発症機序の解明  
 研究課題名（英文）  
 Study on molecular mechanism causing cancer-associated retinopathy by aberrant expression of photoreceptor specific recoverin  
 研究代表者  
 大黒 浩 (OHGURO HIROSHI)  
 札幌医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：30203748

## 研究成果の概要（和文）：

癌患者の一部に自己免疫機序で発症し、未だ有効な治療法が確立していない癌関連網膜症の発症機序特に、①癌に異所性発現した特異抗原に対してどのような生体内反応により自己免疫を獲得するのか②異所性発現した特異抗原が癌細胞に対してどのような影響を与えているのかの2点を解明することにより本症の分子病態の理解を深めて新たな予防策や治療法をデザインする基礎とするものである。

## 研究成果の概要（英文）：

To elucidate the molecular pathology in CAR, expressions of recoverin were examined. Recoverin was identified to be expressed in 30-70% of cancer tissues. We observed co-precipitation of G-protein-coupled-kinases (GRKs) and caveolin-1 with Rec from cell lysates of 293 or SSTW cells. Immunocytochemistry revealed that immunoreactivities toward recoverin within the cancer cells were almost identical to those toward GRKs and caveolin-1. The present data strongly suggests that aberrantly expressed recoverin should be involved in the GRK-dependent cellular regulation in cancer cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 眼科学

キーワード：癌関連網膜症、リカバリン、異所性発現

## 1. 研究開始当初の背景

癌患者の一部に腫瘍組織と神経組織に共通抗原が生じるためこれらに自己免疫を獲得し種々の神経障害を呈する paraneoplastic

syndrome が知られている。このうち癌関連網膜症では、同様な機序で網膜に対する自己免疫を獲得し、網膜色素変性様の進行性の網

膜変性をきたす疾患で、現在のところ原因が不明で有効な治療のない難病が知られている。これには肺癌等に随伴し、病理学的に視細胞が変性する狭義の癌関連網膜症 CAR(cancer-associated retinopathy)と、悪性黒色腫に随伴し、CARとは臨床像が異なり、病理学的に網膜双極細胞が障害される悪性黒色腫随伴網膜症 MAR (melanoma associated retinopathy)の2種類がある。

本疾患に関連して国内・国外では、CAR患者の血清中には網膜に特異なCa<sup>2+</sup>結合蛋白質リカバリンをはじめ種々の網膜抗原に対する自己抗体が検出され、これらの血清自己抗体がCARの発症に深くかかわることと臨床的に血清自己抗体の検出が確定診断として必須であることが明らかとされてきた。従って **CARの発症機序における血清自己抗体の役割を解明することは、未だ治療法が確立されていない本症に対して新たな治療法のデザインにつながる**ことが予想される。

当初比較的CARがまれな疾患であることから、応募者らの研究グループはリカバリンの癌における異所性発現もCARの発症頻度と一致するのではないかという作業仮説のもとに、癌に異所性発現された種々の異なる癌から樹立された30種類の培養癌細胞におけるリカバリンの異所性発現を検討を行った。ところが驚いたことに約60%の癌細胞にリカバリンが異所性発現を認め、さらに臨床的に癌患者から手術的にされた胃癌患者20名においても6名の癌にリカバリンが異所性発現していることが判明した。さらに興味深いことにそれら6名のいずれも臨床ステージが早期癌であり、従来から言われているCARでは原発癌の予後が良いことを裏付ける結果となった。

以上の我々の研究結果はリカバリンの異所性発現は癌の約30-60%と高頻度で

ある可能性があることから、**癌細胞にリカバリンが異所性発現する以外の機序が同時に働くことによりリカバリンに自己免疫を獲得し最終的に網膜症に発展する可能性やリカバリンの異所性発現が癌の予後を変化させる可能性**といった全く新たな応募者らの研究グループの研究成果に基づく独創性の高い研究課題の着想に至った。

## 2. 研究の目的

従って、**癌関連網膜症の発症機序の解明と癌に異所性発現したリカバリンの癌細胞での役割を明らかとする目的**で、今回申請者らの研究グループは平成22年より24年までの3年間に

リカバリン異所性発現の陽性率、リカバリン異所性発現をもたらす機序およびその意義を生化学的、分子生物学的及び組織学的手法を用いて検討する。

## 3. 研究の方法

種々の癌におけるリカバリン異所性発現の特異性についての検討

今回**種々の異なる臓器で異なる重症度の癌組織を網羅的に解析**するために、種々の異なる臓器で異なる重症度の癌患者の手術時に得られた複数のパラフィン組織を各腫瘍ごとに1枚のスライドガラスにマウントした腫瘍チップのプレパラート (Tissue Array Product Specification Sheet: Biomax US) を用い免疫組織学的手法および in situ hybridization 法によりリカバリン異所性発現の陽性率を検討する。またリカバリン異所性発現をもたらす機序およびその意義については癌細胞内でリカバリンがどのような因子とかかわるかを免疫沈降法を用いて検討した

## 4. 研究成果

1) リカバリン異所性発現の陽性率

手術で得られた種々ヒトの癌において約3-7割にリカバリン異所性発現が見られ、悪性度の低いもので頻度が高かった。

2) リカバリン異所性発現をもたらす機序およびその意義

ヒトリカバリンモノクローナル抗体を用い免疫共沈を行った。その結果、293やSSTW細胞の溶液から、リカバリンがG-protein coupled receptor kinases (GRKs)とcaveolin-1と共沈することが確認された。癌細胞の3重免疫染色では、リカバリンの免疫反応部位がGRKsやcaveolin-1とほぼ同じ部位であることが解った。

#### 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 36 件)

- ① Ohguro I, Ohguro H : The effects of a fixed combination of 0.5% timolol and 1% dorzolamide on optic nerve head blood circulation. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2012 ; 28(4) : 392-396. 査読あり
- ② Abe A, Hiraoka M, Inatomi S, Ohguro I, Ohguro H : Lysosomal phospholipase A2 activity in pig aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012 ; 53 : 152-156. 査読あり
- ③ Ohguro H, Ohguro I, Katai M, Tanaka S : Two-year randomized, placebo-controlled study of black currant anthocyanins on visual field in glaucoma. *Ophthalmologica* 2012 ; 228 : 26-35. 査読あり
- ④ Machida S, Ohguro H, Tateda M, Sato H, Kurosaka D : Melanoma-associated retinopathy associated with intranasal melanoma. *Doc Ophthalmol* 2011 ; 122 : 191-197. 査読あり
- ⑤ Osanai H, Abe S, Rodríguez-Vázquez J, Verdugo-López S, Murakami G, Ohguro H : Human orbital muscle; a new point of view from the fetal development of extraocular connective tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011 ; 52 : 1501-1506. 査読あり
- ⑥ Nakazawa M, Ohguro H, Takeuchi K, Miyagawa Y, Ito T, Metoki T : Effect of nilvadipine on central visual field in retinitis pigmentosa : A 30-month clinical trial. *Ophthalmologica* 2011 ; 225 : 120-126. 査読あり
- ⑦ Kondo M, Sanuki R, Ueno S, Nishizawa Y, Hashimoto N, Ohguro H, Yamamoto S, Machida S, Terasaki H, Adamus G, Furukawa T : Identification of autoantibodies against TRPM1 in patients with paraneoplastic retinopathy associated with ON bipolar cell dysfunction. *PLOS ONE* 2011 ; 6(5) : 1-7. 査読あり
- ⑧ Osanai H, Rodríguez-Vázquez J, Abe H, Murakami G, Ohguro H, Fujimiya M : Fetal check ligament connected between the conjunctiva and the medial and lateral recti. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011 ; 52 : 7175-7179. 査読あり
- ⑨ Tanaka G, Yamakoshi K, Sawada Y, Matsumura K, Maeda K, Kato Y, Horiguchi M, Ohguro H : A novel photoplethysmography technique to derive normalized arterial stiffness as a blood pressure independent measure in the finger vascular bed. *Physiol. Meas.* 2011 ; 32 : 1869-1883. 査読あり
- ⑩ Ohguro H, Ohguro I, Tsuruta M, Katai M, Tanaka S : Clinical distinction between nasal optic disc hypoplasia (NOH) and glaucoma with NOH-like

temporal visual field defects. Clin Ophthalmol 2010 ; 4 : 547-555. 査読あり

- ⑪ Ohguro H, Mashima Y, Nakazawa M : Low levels of plasma endothelin-1 in patients with retinitis pigmentosa. Clin Ophthalmol 2010 ; 4 : 569-573. 査読あり
- ⑫ Matsuo S, Ohguro H, Ohguro I, Nakazawa M : Clinicopathological roles of aberrantly expressed recoverin in malignant tumor cells. Ophthalmic Research 2010 ; 43 : 139-144. 査読あり
- ⑬ Hikage F, Hashimoto M, Ohguro H : Vascular compressive optic neuropathy caused by hypertensive intracranial ophthalmic artery. Jpn J Ophthalmol. 2010 ; 54 : 511-514. 査読あり

[学会発表] (計 77 件)

- ① Ohguro H, Hiraoka M, Ohguro I : Lysosomal phospholipase A2 activity in pig aqueous humor. The 27th Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress, April 13-16, 2012, BEXCO, Busan, South Korea
- ② Ohguro I, Ohguro H : The effects of a fixed combination of 0.5% timolol and 1% dorzolamide on optic nerve head blood flow. The 27th Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress, April 13-16, 2012, BEXCO, Busan, South Korea
- ③ Katai M, Ohguro I, Ohguro H : Age-, refraction-, and intraocular pressure levels-related differences in retinal nerve fiber layer thickness of normal healthy Japanese eyes. The 27th Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress, April 13-16, 2012, BEXCO, Busan, South Korea
- ④ Maeda K, Ishikawa F, Hiraoka M, Abe A, Ohguro I, Ohguro H : Analysis of mRNA expression of retinal angiogenic and vascular suppression factors in SDTorii (SDT) rat.
- ⑤ Umeda K, Ohguro I, Kamihara K, Inatomi S, Ohguro H : The effects of carteorol on ocular circulation in healthy subjects. The 27th Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress, April 13-16, 2012, BEXCO, Busan, South Korea
- ⑥ Kamihara K, Ohguro I, Umeda K, Inatomi S, Ohguro H : 48-hour-circadian changes of intraocular pressures in patients with glaucoma. The 27th Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress, April 13-16, 2012, BEXCO, Busan, South Korea
- ⑦ Ohguro H, Ohguro I, Katai M, Tanaka S : Beneficial effects of systemic administration of black currant anthocyanins on glaucomatous optic neuropathy : A randomized placebo-control double-masked trial. Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress 2011, March 20-24, 2011, Sydney Convention and Exhibition Centre, Sydney, Australia
- ⑧ Ohguro I, Ohguro H : Beneficial effects of fixed combination of timolol and dorzolamide on optic nerve head blood circulation. Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress 2011, March 20-24, 2011, Sydney Convention and Exhibition Centre, Sydney, Australia
- ⑨ Wang Y, Hashimoto M, Hiraoka M, Tanaka S, Ohguro H : A case of retro bulbar optic neuritis associated with anti-tumor necrosis factor (infliximab). The 6th Congress of Asian Neuro-Ophthalmology Society,

- November 25-26, 2011, Kobe Convention Center, Japan.
- ⑩ Ohguro H, Ohguro I : Pathophysiological roles of anti-neuron specific enolase in glaucoma and its diagnostic and therapeutic applications. BIT Life Sciences' 2<sup>nd</sup> Annual International Congress of Antibodies 2010, March 24-26, 2010, International Convention Center, Beijing, China
- ⑪ Hashimoto M, Harada K, Ohguro H : Vascular compressive cranial neuropathy disclosed by 3-Tesla MRI with FIESTA-C sequence. 第18回国際神経眼科学会, June15-18, 2010, Lyon, France
- ⑫ Kawata H, Hashimoto M, Ohguro H : Infantile Ewing sarcoma in the sphenoid sinus presenting as acute visual loss. 第18回国際神経眼科学会, June 15-18, 2010, Lyon, France
- ⑬ Yoshida K, Hashimoto M, Ishikawa F, Maeda K, Ohguro H : A case of transient monocular blindness disclosed by 3-Tesla three-dimensional MR angiography. 第18回国際神経眼科学会, June 15-18, 2010, Lyon, France
- ⑭ Uno H, Hashimoto M, Tsuda S, Imai T, Ohguro H : Oculomotor nerve palsy associated with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. 第18回国際神経眼科学会, June 15-18, 2010, Lyon, France
- ⑮ Maeda K, Ishikawa F, Saito Y, Yoshida K, Inatomi S, Ohguro I, Ohguro H : Analysis of mRNA expressions of retinal angiogenic factors in SDTorii (SDT) rat. XIXth ICER, July 18-23, 2010, Montoriol, Canada
- ⑯ Inatomi S, Maeda K, Ishikawa F, Ohguro H : Primary cell culture of neural microvessel endothelium cell from diabetic retinopathy model rat. X IX th ICER, July 18-23, 2010, Montoriol, Canada
- ⑰ Ohguro H, Ohguro I, Katai M, Tanaka S : Beneficial effects of systemic administration of black currant anthocyanins on glaucomatous optic neuropathy : A randomized placebo-control double-masked trial. Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress 2011, March 20-24, 2011, Sydney Convention and Exhibition Centre, Sydney, Australia
- ⑱ Ohguro I, Ohguro H : Beneficial effects of fixed combination of timolol and dorzolamide on optic nerve head blood circulation. Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress 2011, March 20-24, 2011, Sydney Convention and Exhibition Centre, Sydney, Australia
- [図書] (計6件)
- ① 大黒 浩 : 眼外傷. 「今日の治療指針 私はこう治療している」p1233-1234, 医学書院, 2012
- ② Katai M, Ohguro H : "Study of effects of aging, refraction and intraocular pressure levels on retinal nerve fiber layer thickness of normal healthy eyes" Selected topics in optical coherence tomography. p171-184, INTECH, 2012
- ③ Inatomi S, Ohguro H, Nishikiori N,

Sawada N : "Glial cell-derived cytokines and vascular integrity in diabetic retinopathy" Visual dysfunction in diabetes. p 325-338, HUMANA PRESS, 2012

- ④ 大黒 浩 : 専門医のための眼科診療クオリファイ⑭網膜機能 A to Z. 3.自覚的機能検査「光覚と暗順応検査 ロドプシン代謝による暗順応のしくみについて教えてください」 p128-130, 中山書店, 2012
- ⑤ 大黒 浩 : 光受容の分子機構. 「からだと光の事典」 p199-204, 朝倉書店, 2010
- ⑥ 大黒 浩, 大黒 幾代 : paraneoplastic optic neuropathy. 「専門医のための眼科診療クオリファイ⑦視神経疾患のすべて」 p246-248, 中山書店, 2011

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大黒 浩 (OHGURO HIROSHI)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 30203748

(2) 研究分担者

石川 太 (ISHIKAWA FUTOSHI)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 00419962

前田 貴美人 (MAEDA KIMIHIITO)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 00452970

大黒 幾代 (OHGURO IKUYO)  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号 : 90305235

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :