

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011年～2012年
 課題番号：23791834
 研究課題名(和文) 卵巣癌におけるモルフォゲンシグナルのシステム生物学的解析による治療開発
 研究課題名(英文) The development of therapeutic target with system biological analysis of morphogen signals in ovarian cancer
 研究代表者
 吉岡 弓子 (YOSHIOKA YUMIKO)
 京都大学・大学院医学研究科婦人科学産科学・助教
 研究者番号：10402918

研究成果の概要(和文)：本研究では腫瘍の転移や腫瘍と周囲環境の相互作用に重要と思われる形態形成因子である BMP の卵巣癌における役割について研究をおこなった。漿液性卵巣癌組織片での BMP シグナリングの細胞内伝達物質である SMAD5 の発現を検討したところ、SMAD 高発現のグループは予後が不良であった。卵巣がん細胞株を用いて BMP シグナルを促進すると腫瘍の増大を認め、反対に SMAD5 のリン酸化を阻害して BMP シグナルを抑制すると腫瘍増殖は抑制された。以上より BMP シグナリングは卵巣癌の予後に関与しており治療ターゲットとなりうることを示された。

研究成果の概要(英文)：We would like to identify the function of BMP/SMAD5 signaling in serous ovarian cancer. The protein levels of total SMAD5 and phosphorylated SMAD5 (pSMAD5) were examined by immunohistochemical analysis using clinical serous ovarian cancer samples. Cell proliferation is promoted by BMP signaling, otherwise suppressed by inhibiting BMP signaling, both *in vitro* and *in vivo*. Our data suggests that BMP/SMAD5 signaling plays an important role and, therefore, becomes a potential therapeutic target in serous ovarian cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,390,000 | 690,000 | 2,990,000 |

研究分野：医師薬学

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：婦人科腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは婦人科悪性腫瘍の中で死亡原因として最も多い。現在の治療法は手術療法および化学療法が主体であるが、半数以上の患者は再発し、再発後は化学療法に抵抗性を示すことが多く、長期的予後が望めない。そのため、治療効果予測のためのマーカー同定や、新規治療法開発のための薬物標的同定が強く望まれている分野である。本研究では、腫瘍の転移や腫瘍と周囲環境の相互作用に重要と思われるモルフォゲンである BMP, Hedgehog に着目して研究し、治療マーカーや薬物指標同定を目指す。

モルフォゲン（形態形成因子）は発生中の様々な組織において分泌され、組織内で濃度勾配を作ることで位置情報を与え、形態形成、分化、アポトーシス、組織再生などを制御することが知られている。興味深いことに、モルフォゲンは悪性腫瘍との関連も深い。まず、悪性腫瘍そのものが BMP や Hedgehog などのモルフォゲンを産生することが報告されている。また、Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT; 上皮間葉移行) は上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象であり、癌細胞の浸潤、転移との関連が示唆されているが、BMP, hedgehog いずれもその誘導因子

の一つと言われている。これまでの臨床研究により、BMP および hedgehog が実際に卵巣がんが発現し、予後に影響をあたえるとの報告が複数なされているが、予後の良・不良について一定の見解は得られておらず、またそのメカニズムについても不明である。

最近、BMP2 が末梢 CD4+ T 細胞において、その増殖、分化、機能を調節すること報告されている。(1) 過剰量の BMP により T 細胞の増殖が促進され、T 細胞の活性化と Interleukin-2 (IL-2) 産生が促進されること、(2) 過剰量の BMP は、細胞性免疫を担いがん細胞を攻撃するとされる type1 helper T 細胞への分化を促進すること、(3) 一方で、生理的濃度の BMP は、免疫細胞に対して濃度依存的な多相性の活性を持つことの3点を見いだした。ここで特に重要な点は、生理的濃度の BMP は、より低濃度で T 細胞の IL-2 産生を促進し、中程度濃度で抑制するが、比較的高濃度で再び促進するという多相的な活性を持つことである。また、生体内には Noggin, Chordin といった BMP の細胞外拮抗タンパクが存在することが知られており、これらの拮抗タンパクとの濃度勾配のバランスにより器官の形成、細胞の分化が調節される。

2. 研究の目的

本研究は卵巣癌におけるモルフォゲン（形態形成因子）の役割に着目し、モルフォゲンシグナルのシステム生物学的解析により、新たな分子標的や治療マーカーの同定を目指す。目標は次の3段階である。(1) 分子生物学的手法により代表的モルフォゲンである BMP の卵巣がん細胞における活性を評価。(2) 1に基づきシステム生物学的解析を行い、卵巣癌の進展におけるモルフォゲンの役割を理解し、卵巣がん進展に中心的な役割をもつ可能性がある因子を予測。(3) 2の予測を、臨床検体を用いて評価し、治療や診断に有用な分子標的を提示する。

3. 研究の方法

BMP シグナルの卵巣癌細胞における機能を分子生物化学的手法にて検討する。

a. 卵巣がん細胞株における BMP、BMP レセプター、hedgehog の発現を検討する。

・定量 PCR により mRNA 発現/ELISA による卵巣がん細胞株の培養上清中の BMP タンパク測定。

b. BMP、hedgehog による腫瘍細胞の増殖能、浸潤能、分化の変化について解析をおこなう。

以下の方法で腫瘍における BMP シグナルの賦活あるいは抑制をおこない、増殖能、浸潤能を評価する。また上皮間葉移行について上皮系マーカー、間葉系マーカーの発現を評価する。

- ・リコンビナント BMP タンパクの添加
- ・細胞外拮抗タンパク (Noggin、Chordin) の添加
- ・レトロウイルスベクターを用いた腫瘍細胞への遺伝子強制発現
- ・BMP レセプター活性化阻害である Dorsomorphin の添加

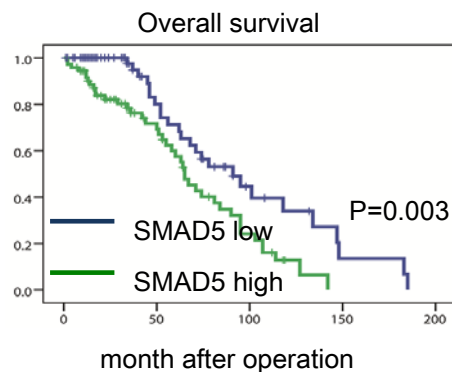
- ・BMP の細胞内伝達物質である SMAD1/5/8 の siRNA によるノックダウン

c. BMP による腫瘍内、または腫瘍近傍の免疫細胞に与える影響の解明

- ・腫瘍細胞とリンパ球を共培養し、リンパ球の表現型、増殖能、サイトカイン産生能を解析。

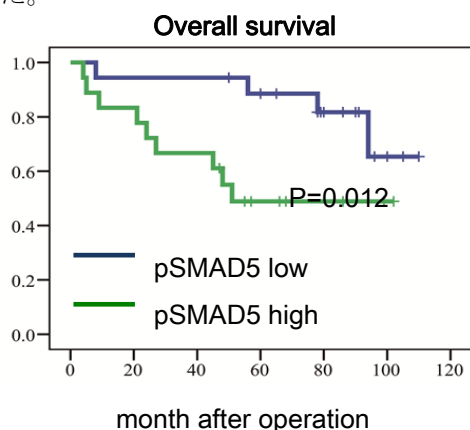
4. 研究成果

Web 上で入手可能なマイクロアレイデータセット GSE3149 を用いて漿液性卵巣癌患者の原発病変組織片における BMP シグナリングの細胞内伝達物質である SMAD5 の発現を検討した。その結果、SMAD5 高発現を示す症例のグループは低発現を示す症例のグループと比較して有意に予後が不良であった。



2002年から2008年に京都大学附属病院にて初回治療をおこなった36人の漿液性卵巣癌患者の標本を用いて、BMPシグナル活性化の細胞内指標であるリン酸化SMAD5の発現を検討した。リン酸化SMAD5の免疫組織染色を行ったところ、リン酸化SMAD5高発現のグルー

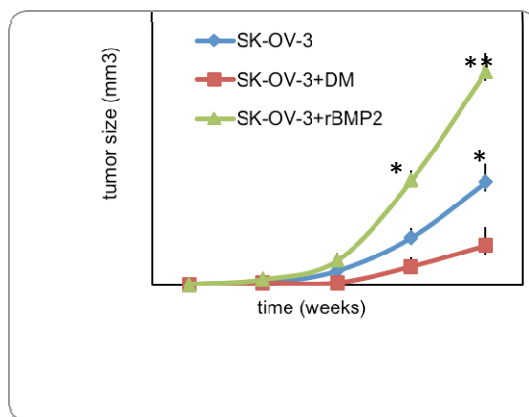
プは低発現のグループと比較して、全生存率、無病生存率ともに有意に予後が不良であった。



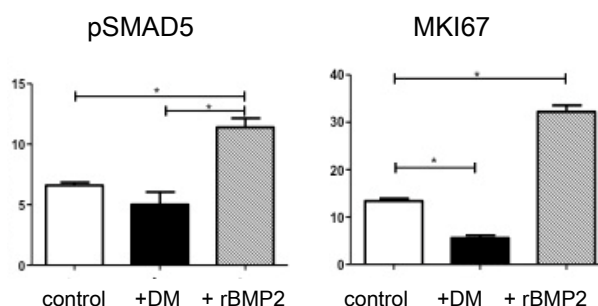
以上の結果から漿液性卵巣癌患者において、SMAD5 の発現とそのリン酸化が腫瘍の病勢に 関与していると推測された。

次に複数種類の漿液性卵巣癌細胞株を用いて BMP シグナリングの作用について検討した。BMP シグナル亢進にはリコンビナント BMP2、シグナル抑制には BMP レセプターのリン酸化を特異的に阻害する低分子阻害剤である Dorsomorphin を用いて実験を行った。ウェスタンブロットにてたんぱく発現を検討したところ、卵巣癌細胞株も正常卵巣上皮細胞株も BMP2 刺激により SMAD5 のリン酸化が亢進しており、卵巣癌細胞株では正常卵巣上皮細胞株よりもリン酸化がより亢進していた。Dorsomorphinにより SMAD5 のリン酸化はいずれも抑制された。細胞質と核それぞれからたんぱくを抽出し、リン酸化 SMAD5 の発現を検討したところ、卵巣癌細胞株では正常卵巣上皮細胞株と比較して核内のリン酸化 SMAD5 発現が亢進していた。蛍光免疫染色にても同様の結果が確認された。以上の結果から、卵巣癌では細胞質内でリン酸化された SMAD5 の核内への移行が促進されていると推測された。

次に細胞増殖について検討した。BMP2 または Dorsomorphin を添加した卵巣癌細胞株の増殖能を WST-1 アッセイにて検討したところ、BMP により増殖が亢進していた。フローサイトメトリーにて検討したところ、この細胞増殖のメカニズムは G1/S 期移行の亢進によるものであった。免疫不全マウスに漿液性卵巣癌細胞株を皮下投与して腫瘍を形成させたと、BMP は腫瘍増大を促進させ、Dorsomorphin 投与にて抑制された。



またこの腫瘍を摘出して免疫染色を行ったところ、投与群ではリン酸化 SMAD5 が高発現し、また増殖活性を示す KI67 の発現も亢進しており、両者は正の相関を示した。以上より BMP シグナリングは卵巣癌の予後に関与しており、治療ターゲットとなりうることを示した。



Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT; 上皮間葉移行) は上皮細胞が間葉系細胞に形態変化する現象であり、癌細胞の浸潤、転移との関連が示唆されているが、BMP シグナル促進にて EMT に特徴的な分子の発現が変化し、形態学的にも上皮細胞が間葉系細胞に類似した形態に変化することが確認できた。以上より、BMP シグナルは細胞増殖だけではなく、癌細胞の浸潤、転移と関連する事が示唆された。

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 1 件)

Yumiko Yoshioka, Masahiro Ono, Motono Osaki, Ikuo Konishi, Shimon Sakaguchi
 “Differential effects of inhibition of bone morphogenetic protein (BMP) signaling on T-cell activation and differentiation”
 European Journal of Immunology, 2012, vol. 42, 749-759, DOI:10.1002/eji.201141702 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

① Peng Jin, Yumiko Yoshioka

The BMP signaling pathway leads to enhanced proliferation in serous ovarian cancer -A potential therapeutic target-
第 64 回日本産婦人科学会学術集会
2012 年 04 月 13 日～2012 年 04 月 15 日
神戸国際展示場(兵庫県)

② Yumiko Yoshioka, Peng Jin

The BMP signaling pathway leads to enhanced proliferation in serous ovarian cancer -A potential therapeutic target-
第 10 回アジア臨床腫瘍学会議
2012 年 06 月 13 日～2012 年 06 月 15 日
Seoul, Korea

〔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 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

吉岡弓子 (YOSHIOKA YUMIKO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：10402918

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：