

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791842

研究課題名(和文) VAV1 - Rac1 - PAK1 経路の制御による卵巣癌の新たな治療戦略の開発

研究課題名(英文) VAV1 represses E-cadherin expression through the transactivation of Snail and Slug: a potential mechanism for aberrant epithelial to mesenchymal transition in human epithelial ovarian cancer

研究代表者

若橋 宣 (Wakahashi, Senn)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80596651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌は、婦人科悪性腫瘍のなかでも予後不良疾患であり、比較的早期癌であるI-II期症例であっても20-30%の患者はこの疾患で死亡する。このような状況のなかで新規治療戦略の開発は喫緊の課題となっている。

VAV1は本来骨髄系の細胞にのみ発現している分子である。臨床検体の検討ではこのVAV1が卵巣癌に発現すると、とくに早期卵巣癌において予後不良因子となることを明らかにした。さらに研究成果からは、VAV1が卵巣癌の浸潤転移に重要な役割をになっている上皮間葉移行に関与していることを明らかにした。VAV1とその関連する細胞内シグナル経路を制御することは卵巣癌の新たな治療戦略となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We analyzed 88 samples from patients with ovarian cancer, which were divided into FIGO stages I and II, and III and IV. Prognostic analysis revealed that upregulated VAV1 expression correlated with poor prognosis in patients with early-stage ovarian cancer, but not with other clinicopathologic features. Stable overexpression of VAV1 in SKOV3 cells induced morphologic changes indicative of loss of intercellular adhesions and organized actin stress fibers. Western blotting and real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction demonstrated that these cells had downregulated E-cadherin, respectively. This downregulation is associated with EMT and invasive cancer. Furthermore, VAV1 overexpression in both SKOV3 and HOSE demonstrated that its upregulation of an E-cadherin transcriptional repressor, Snail and Slug, was not confined to ovarian cancer cells. Our findings suggest that VAV1 may play a role in the EMT of ovarian cancer, and may serve as a potential therapeutic target.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：VAV1 卵巣癌 上皮間葉移行 E-cadherin

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は女性の癌死の原因として第5位に位置づけられている癌であり、婦人科悪性疾患による死因としては最も多いものである。初期の症状が乏しく、発見された時にはすでに手術不能の進行癌として発見されることが多い。従って化学療法が重要となるが一旦腫瘍が縮小し軽快しても、再発、転移するなど極めて予後が悪く、分子標的薬をはじめ新たな治療方法の開発が喫緊の課題となっている。

2. 研究の目的

(1) 本研究は Rho family を活性化する guanine nucleotide exchange factor (GEFs) のひとつ VAV1 から始まる VAV1-Rac1-PAK1 経路活性化が、卵巣癌の細胞周期及び浸潤接着シグナルを活性化する機構の解明をおこない、VAV1-Rac1-PAK1 経路を標的とした新規分子標的薬の開発を目的とした。

(2) VAV1-Rac1-PAK1 経路活性化機構の解明から得られた知見をもとに臨床検体を再評価し、卵巣癌の分子生物学的リスク評価を行うことで新たな治療指針の確立を目指す。

3. 研究の方法

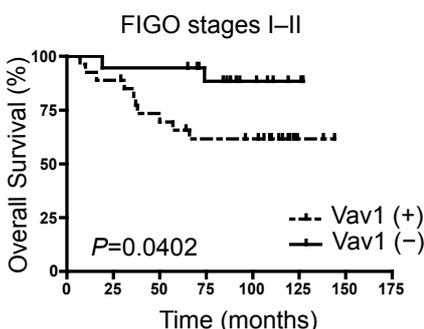
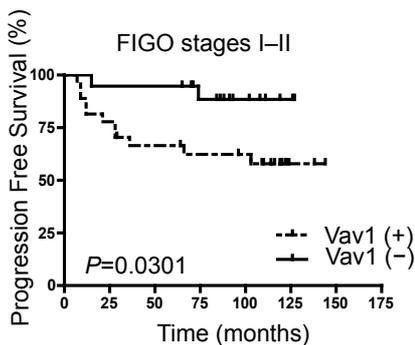
(1) 卵巣癌臨床検体 88 例を用いた免疫組織学的検討をおこない。予後解析を行なった。

(2) 卵巣癌細胞株 (SKOV3) に VAV1 発現ベクターを導入し VAV1 恒常的発現細胞株 (SKOV3-Vav1) を樹立し VAV1 の下流に存在するどの分子が活性化しているか検討した。

4. 研究成果

(1) 臨床検体の予後解析

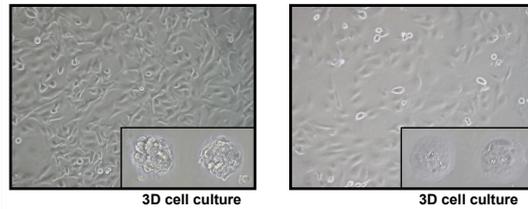
卵巣癌臨床検体 88 例の免疫組織学的検討では 59% にあたる 52 症例に VAV1 発現を認めた。予後解析では VAV1 発現の有無が early-stage にあたる FIGO stage I-II 期で全生存期間、無増悪生存に影響を与えることが明らかになった。



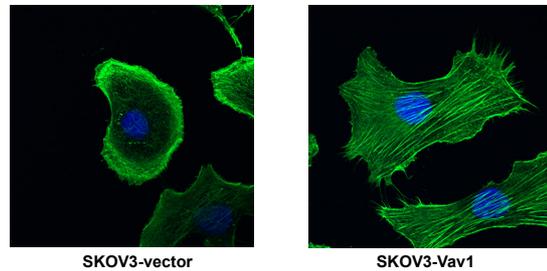
(2) VAV1 恒常的発現細胞株 (SKOV3-Vav1) の検討。

① VAV1 発現は細胞の形態を変化させる。

SKOV3-Vav1の形態変化を3D cultureで検討した。MOCK細胞 (SKOV3-vector) は桑実状に増殖することが可能であったが、SKOV3-Vav1は桑実状に増殖することができなかった。

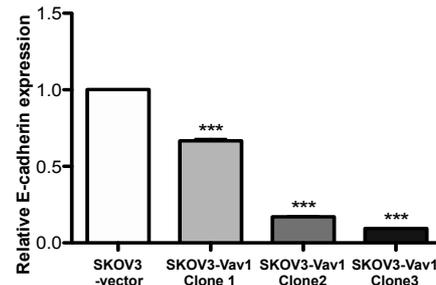
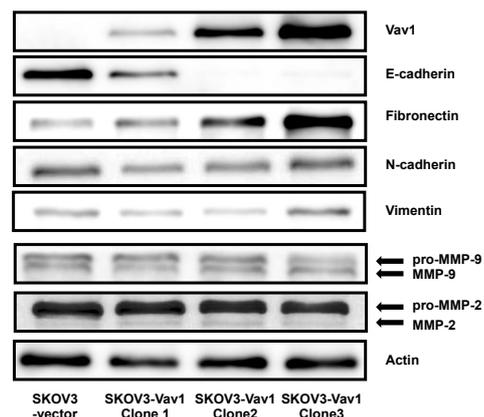


F-actin染色によるactin cytoskeletonの検討をおこなった。SKOV3-Vav1はstress fiberの増殖を認め、VAV1発現がCell morphologyに変化を誘導することが明らかになった。



② VAV1 発現は E-cadherin 発現を抑制し Fibronectin 発現を誘導する。

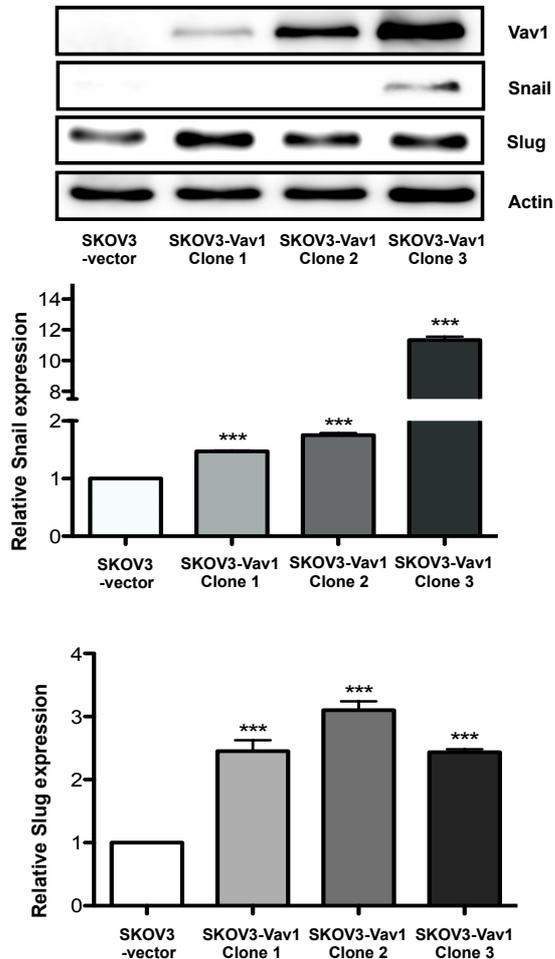
Cell morphology の変化は、VAV1 発現と上皮間葉移行の関係を示唆している。上皮系マーカー、間葉系マーカー発現の検討では、VAV1 発現によってタンパクレベル、mRNA レベルで E-cadherin 発現の低下が確認された。



Quantification of reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of E-cadherin messenger RNA levels in SKOV3-Vav1 compared with SKOV3-vector.

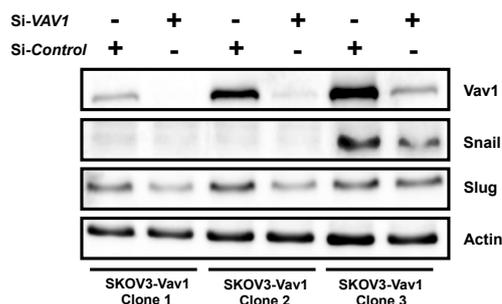
③ VAV1のE-cadherin発現制御は transcriptional factorであるSnail, Slugを介している。

VAV1のE-cadherin発現制御のメカニズムを検討するために、E-cadherinの転写因子の発現を検討した。複数の因子を検討した結果、VAV1発現に依存してSnail, Slug発現の増加をタンパクレベル、mRNAレベルで認めた。



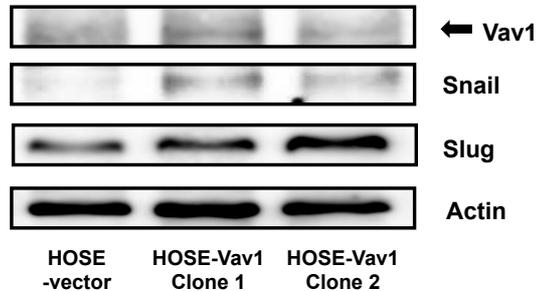
Quantification of reverse transcriptase- polymerase chain reaction analysis of Snail and Slug messenger RNA levels in SKOV3-Vav1 compared with SKOV3-vector.

また、siVAV1によりSnail, Slug発現は低下することから、VAV1のE-cadherin発現の制御はSnail, Slugを介していることが示唆される。



④ VAV1発現は正常卵巣上皮細胞株でも Snail, Slug発現を誘導する。

正常卵巣上皮不死化細胞株 (HOSE) にもVAV1発現vectorを導入し検討した。E-cadherin発現はもともと少ないため検討できなかったが、Snail, Slugともタンパクレベルでの発現促進が確認された。



今回の研究からは以下の3つの点を明らかにすることができた。

(1) VAV1発現は卵巣癌FIGO stage I-II期で全生存期間、無増悪生存に影響を与えることが明らかになった。

(2) VAV1発現は細胞のStress fiberを減少させ、filopodia, lamellipodia の形態を誘導する。3D cultureの検討では桑実状増殖をすることができなかった。

(3) VAV1発現は卵巣癌細胞株 (SKOV3) においてSnail, Slug発現を誘導することで、E-cadherin発現を抑制している。

VAV1蛋白は元来、骨髄系の細胞から発見されたRho familyに作用するguanine nucleotide exchange factor (GEFs)であり、上皮性組織では本来メチル化されている蛋白である。しかし近年、膵臓癌の検討でVAV1蛋白発現が生命予後を悪化させるとの報告 (Martin E et al. Cancer Cell 2005 Jan;7(1):39-49.) があり、膵臓癌以外の上皮性腫瘍でもVAV1蛋白が何らかの役割を果たしている可能性が高い。臨床検体の検討では膵臓癌同様に早期卵巣癌の予後にVAV1発現の有無が関与していることが示されており、VAV1が新たなバイオマーカーとなる可能性が示唆されている。症例数を増やし、さらなる検討を行ってきたい。

細胞株での検討ではVAV1導入によりCell morphologyが変化していくことが確認され、その変化からはVAV1が上皮間葉移行に関与している可能性が示唆された。

上皮間葉移行は悪性腫瘍の浸潤転移において重要な役割を持つことが明らかになっている。特にE-cadherinの消失は多くの悪性腫瘍で予後の関連が報告されている。

本研究ではVAV1がE-cadherinの転写因子であるSnail, Slugの制御を行うことで、E-cadherin発現制御を行っていることを明らかにした。

本研究から得られた知見は、VAV1の関与する経路を制御することで、癌の浸潤転移を制御する新たな治療戦略の開発につながると考えられる。

本研究成果は” VAV1 represses E-cadherin expression through the transactivation of Snail and Slug: a potential mechanism for aberrant epithelial to mesenchymal transition in human epithelial ovarian cancer.”として2013年、雑誌Translational research に発表された。

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 Muraji M, Sudo T, Iwasaki S, Ueno S, Wakahashi S, Yamaguchi S, Fujiwara K, Nishimura R. Histopathology predicts clinical outcome in advanced epithelial ovarian cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy and debulking surgery. *Gynecol Oncol.* 131, 531-534, 2013 (査読あり)
- ② Wakahashi S, Sudo T, Oka N, Ueno S, Yamaguchi S, Fujiwara K, Ohbayashi C, Nishimura R. VAV1 represses E-cadherin expression through the transactivation of Snail and Slug: a potential mechanism for aberrant epithelial to mesenchymal transition in human epithelial ovarian cancer. *Transl Res.* 162, 181-190, 2013 (査読あり)

- ③ Ueno S, Sudo T, Oka N, Wakahashi S, Yamaguchi S, Fujiwara K, Mikami Y, Nishimura R. Absence of human papillomavirus infection and activation of PI3K-AKT pathway in cervical clear cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 23, 1084-1091, 2013 (査読あり)
- ④ Iwasaki S, Sudo T, Miwa M, Ukita M, Morimoto A, Tamada M, Ueno S, Wakahashi S, Yamaguchi S, Fujiwara K, Sakuma Y, Mikami Y, Nishimura R. Endometrial stromal sarcoma: clinicopathological and immunophenotypic study of 16 cases. *Arch Gynecol Obstet.* 288, 385-391, 2013 (査読あり)
- ⑤ Muraji M, Sudo T, Iwasaki S, Ueno S, Wakahashi S, Yamaguchi S, Fujiwara K, Nishimura R. The effect of abdominal radical trachelectomy on ovarian reserve: serial changes in serum anti-müllerian hormone levels. *J Cancer.* 3, 191-195, 2012 (査読あり)
- ⑥ Muraji M, Sudo T, Nakagawa E, Ueno S, Wakahashi S, Kanayama S, Yamada T, Yamaguchi S, Fujiwara K, Nishimura R. Type II versus type III fertility-sparing abdominal radical trachelectomy for early-stage cervical cancer: a comparison of feasibility of surgical outcomes. *Int J Gynecol Cancer.* 22, 479-483, 2012 (査読あり)
- ⑦ Wakahashi S, Sudo T, Nakagawa E, Ueno S, Muraji M, Kanayama S, Itami H, Kawakami F, Yamada T, Yamaguchi S, Fujiwara K, Nishikawa H, Nishimura R, Ohbayashi C. Endometrioid adenocarcinoma with high-grade transformation with serous and choriocarcinomatous differentiation - a case report. *J Cancer.* 3, 14-18, 2012 (査読あり)

[学会発表] (計4件)

- ① 若橋宣、卵巣癌におけるVAV1-Rac1-PAK1 シグナル経路の活性化、第63回日本産科婦人科学会学術講演会、2011.8.29、大阪国際会議場(大阪府)
- ② 若橋宣、VAV1はE-cadherinを制御することで上皮性卵巣癌の上皮間葉移行に関与する、第70回日本癌学会学術総会、2011.10.3、名古屋国際会議場(愛知県)

- ③ 連 美穂、術前化学療法を施行した上皮性卵巣癌症例での予後規定因子、第 70 回日本癌学会学術総会、2011. 10. 3、名古屋国際会議場（愛知県）
- ④ 若橋 宣、Vav1 は E3 ligase である HAKAI を介して E-cadherin を抑制し上皮性卵巣癌の上皮間葉移行に関与する、第 70 回日本癌学会学術総会、2012. 9. 19、ロイトン札幌（北海道）

〔図書〕（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若橋 宣 (WAKAHASHI, Senn)
神戸大学・医学（系）研究科（研究院）・
医学研究員
研究者番号：23791842

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：