

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592506

研究課題名(和文)細胞極性崩壊による発癌機構に着目した婦人科腫瘍の悪性化予測バイオマーカーの開発

研究課題名(英文)Development of a biomarker in gynecologic cancer to predict outcome with abnormal expression of cell polarity molecules.

研究代表者

長阪 一憲 (NAGASAKA, KAZUNORI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30624233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：CAGE法による網羅的転写産物解析を行い、異形成細胞に比べて頸癌細胞では細胞極性、接着系遺伝子群が制御されていることがわかった。また、異形成細胞に特異的なHPV由来のPolyA付加のないアンチセンスRNAを新規に同定した。分子生物学的検討では、細胞極性制御因子であるhScribがRas-ERK経路を制御する機能を持つこと、脱リン酸化酵素Protein Phosphatase 1 (PP1)がhScribと直接結合することで、ERK経路を負に制御することを証明した。また、PP1が、子宮頸部の前癌状態から癌への進行に伴い細胞内局在異常をきたしており、病変の進展マーカーとなり得ることを報告した。

研究成果の概要(英文)：We performed CAGE (Cap Analysis Gene Expression) analysis to investigate transcriptome start sites (TSSs) from the perspective of both the HPV and human genomes. The result showed that the cell polarity and adhesion pathway is dramatically downregulated, and we found a novel antisense viral transcript only seen in CIN cervical cells. Using the molecular and biochemical analyses, we found that cell polarity protein hScrib regulates Ras-ERK pathway, and the activity is mediated in part through recruitment of protein phosphatase 1 (PP1). Furthermore, we have explored the potential role of PP1 in HPV-induced cervical malignancy. Then, we have found a striking concordance with cellular redistribution in pattern of expression, and this loss of PP1 expression and redistribution in pattern of expression occurs progressively as the lesions develop. Taken together, we have concluded that PP1 would be a novel biomarker to predict disease progression for HPV induced malignancy.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：細胞極性制御機構 バイオマーカー 網羅的解析 転写産物 脱リン酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

妊孕能を有する若年女性を中心に急速に子宮頸癌人口が増えていくのは予測される。そのため、さらなる HPV の分子生物学的な研究、感染-発癌メカニズムの解明は急務である。異常増殖をはじめた癌細胞が、遠隔転移によって別の組織で新たに増殖をはじめるとは、基底膜の接着、基底膜成分の分解、癌細胞の運動の3段階のステップを要する。そして、免疫排除機構から逃れ、細胞競合で勝者となった細胞が新しい足場で増殖を始める。この上皮間葉移行 (EMT) に関する重要な蛋白である、細胞極性決定因子と、キナーゼ、リン酸化制御メカニズムの解明は、新規バイオマーカー、創薬開発に有用と考えられる。

2. 研究の目的

ハイリスクヒトパピローマウイルス (以下 HPV) による子宮頸癌発癌メカニズムを解析する目的で、転写産物を対象とした網羅的解析を行い、癌化のリスクを評価できるようなバイオマーカーを樹立することを目的とする。また、癌の遠隔転移、浸潤に関わる上皮間葉移行に着目し、細胞浸潤、転移に関する細胞極性決定因子である hScrib を始めとした PDZ ドメイン蛋白と、関連するキナーゼ経路の役割を解明し、癌の進行度を評価できるバイオマーカーの同定を試みる。

3. 研究の方法

1. 異形成から癌になる過程における HPV ゲノムの転写産物レベルでの検討を培養細胞など用いて基礎的な検討を展開する。方法は網羅的転写産物解析が可能な CAGE 法を用いる。このデータを元に、さらに、子宮頸部上皮異形成より癌化へ向かう過程で分子生物学的検討を行い、新規癌化診断マーカーの同定を試みる。

2. 細胞極性崩壊、浸潤、転移に関する hScrib などの PDZ ドメイン蛋白に焦点を合わせ、癌の遠隔転移、浸潤に関わる過程における、役割を解明する。マススペクトロメトリ解析など用いて、hScrib などの細胞極性決定因子のリン酸化部位とリン酸化伝達系について検討を行い、さらに正常上皮細胞に遺伝子あるいは機能を失活した変異体を過剰発現もしくはノックダウンさせ、それに伴う細胞形態、増殖能、細胞内局在の変化を、共焦点顕微鏡、増殖能アッセイ、細胞分画法、ウエスタンブロッティング法で検討することで、責任蛋白を同定、検出を試みる。臨床検体を使用し、悪性化を評価できるシステムを明らかにする。

4. 研究成果

CAGE 法による網羅的転写産物解析を行い、異形成細胞に比べて頸癌細胞では細胞極性、接着系遺伝子群が制御されていることがわかった。また、異形成細胞からは、HPV 由来の PolyA 付加のないアンチセンス RNA を新規に同定した。分子生物学的検討では、細胞極性制御因子である hScrib が、Ras-ERK 経路を制御する機能を持つこと、脱リン酸化酵素 Protein Phosphatase 1 (PP1) が hScrib と直接結合することで、ERK 経路を負に制御することを証明した。また、PP1 が、子宮頸部の前癌状態から癌への進行に伴い細胞内局在異常をきたしており、病変の進展マーカーとなり得ることを報告した。

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15件)

Arimoto T, Kawana K, Adachi K, Ikeda Y, Nagasaka K, Tsuruga T, Yamashita A, Oda K, Ishikawa M, Kasamatsu T, Onda T, Konishi I, Yoshikawa H, Yaegashi N; Gynecologic Cancer Study Group of the Japan Clinical Oncology Group. Minimization of curative surgery for treatment of early cervical cancer: a review. *Jpn J Clin Oncol*. 2015 Apr 16. (査読あり)

Seiki T, Nagasaka K, Kranjec C, Kawana K, Maeda D, Nakamura H, Taguchi A, Matsumoto Y, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Oda K, Nakagawa S, Yano T, Fukayama M, Banks L, Osuga Y, Fujii T. HPV-16 impairs the subcellular distribution and levels of expression of protein phosphatase 1 γ in cervical malignancy. *BMC Cancer*. 2015 Apr 7;15:230. doi: 10.1186/s12885-015-1141-0. (査読あり)

Taguchi A, Nagasaka K, Kawana K, Hashimoto K, Kusumoto-Matsuo R, Plessy C, Thomas M, Nakamura H, Bonetti A, Oda K, Kukimoto I, Carninci P, Banks L, Osuga Y, Fujii T. Characterization of novel transcripts of human papillomavirus type 16 using cap analysis gene expression technology. *J Virol*. 2015 Feb;89(4):2448-52. doi: 10.1128/JVI.03433-14. Epub 2014 Dec 10. (査読あり)

Nagasaka K, Kawana K, Tomio K, Tsuruga T, Mori-Uchino M, Miura S, Tanikawa M, Miyamoto Y, Ikeda Y, Sone K, Adachi K, Matsumoto Y, Arimoto T, Oda K, Osuga Y, Fujii T. Positive peritoneal cytology at interval surgery is a poor prognostic factor in patients with stage T3c advanced ovarian carcinoma: A retrospective study. *J Obstet Gynaecol Res* 2014 in press. (査読あり)

Azuma Y, Kusumoto-Matsuo R, Takeuchi F, Uenoyama A, Kondo K, Tsunoda H, **Nagasaka K**, Kawana K, Morisada T, Iwata T, Aoki D, Kukimoto I. Human Papillomavirus Genotype Distribution in Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2/3 and Invasive Cervical Cancer in Japanese Women. *Jpn J Clin Oncol* 2014. (査読あり)

Kawana K, Adachi K, Kojima S, Taguchi A, Tomio K, Yamashita A, Nishida H, **Nagasaka K**, Arimoto T, Yokoyama T, Wada-Hiraike O, Oda K, Sewaki T, Osuga Y, Fujii T. Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients. *Vaccine* 2014. (査読あり)

Miyasaka A, Oda K, Ikeda Y, Wada-Hiraike O, Kashiyama T, Enomoto A, Hosoya N, Koso T, Fukuda T, Inaba K, Sone K, Uehara Y, Kurikawa R, **Nagasaka K**, Matsumoto Y, Arimoto T, Nakagawa S, Kuramoto H, Miyagawa K, Yano T, Kawana K, Osuga Y, Fujii T. Anti-tumor activity of olaparib, a poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, in cultured endometrial carcinoma cells. *BMC Cancer* 14:179, 2014. (査読あり)

Taguchi A, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Isobe Y, **Nagasaka K**, Koga K, Inoue T, Nishida H, Kojima S, Adachi K, Matsumoto Y, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Oda K, Kang JX, Arai H, Arita M, Osuga Y, Fujii T. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 in cancer-associated fibroblasts (CAFs) is suppressed by omega-3 polyunsaturated fatty acids in vitro and in vivo. *PLoS One* 9(2):e89605, 2014. (査読あり)

Inaba K, **Nagasaka K**, Kawana K, Arimoto T, Matsumoto Y, Tsuruga T, Mori-Uchino M, Miura S, Sone K, Oda K, Nakagawa S, Yano T, Kozuma S, Fujii T. High-risk human papillomavirus correlates with recurrence after laser ablation for treatment of patients with cervical intraepithelial neoplasia 3: a long-term follow-up retrospective study. *J Obstet Gynaecol Res* 40(2):554-60, 2014. (査読あり)

Yamashita A, Kawana K, Tomio K, Taguchi A, Isobe Y, Iwamoto R, Masuda K, Furuya H, Nagamatsu T, **Nagasaka K**, Arimoto T, Oda K, Wada-Hiraike O, Yamashita T, Taketani Y, Kang JX, Kozuma S, Arai H, Arita M, Osuga Y, Fujii T. Increased tissue levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids prevents pathological preterm birth. *Sci Rep* 3:3113, 2013. (査読あり)

Nagasaka K, Kawana K, Osuga Y, Fujii T. PDZ Domains and Viral Infection: Versatile Potentials of HPV-PDZ Interactions in relation to Malignancy. *Biomed Res Int* 369712. Epub, 2013. (査読あり)

Ikeda Y, Oda K, Hiraike-Wada O, Koso T, Miyasaka A, Kashiyama T, Tanikawa M, Sone K, **Nagasaka K**, Maeda D, Kawana K, Nakagawa S, Fukayama M, Tetsu O, Fujii T, Yano T, Kozuma S. Cyclin D1 harboring the T286I mutation promotes oncogenic activation in endometrial cancer. *Oncol Rep* 30(2):584-8, 2013. (査読あり)

Nagasaka K, Seiki T, Yamashita A, Massimi P, Subbaiah VK, Thomas M, Kranjec C, Kawana K, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Fujii T, Kozuma S, Banks L. A novel interaction between hScrib and PP1 γ downregulates ERK signaling and suppresses oncogene-induced cell transformation. *PLoS One* 8(1):e53752, 2013. (査読あり)

Miyamoto Y, Nakagawa S, Wada-Hiraike O, Seiki T, Tanikawa M, Hiraike H, Sone K, **Nagasaka K**, Oda K, Kawana K, Nakagawa K, Fujii T, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. Sequential effects of the proteasome inhibitor bortezomib and chemotherapeutic agents in uterine cervical cancer cell lines. *Oncol Rep* 29(1):51-7, 2013. (査読あり)

Kojima S, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Taguchi A, Miura S, Adachi K, Nagamatsu T, **Nagasaka K**, Matsumoto Y, Arimoto T, Oda K, Wada-Hiraike O, Yano T, Taketani Y, Fujii T, Schust DJ, Kozuma S. The prevalence of cervical regulatory T cells in HPV-related cervical intraepithelial neoplasia (CIN) correlates inversely with spontaneous regression of CIN. *Am*

[学会発表](計3件)

長阪一憲, 川名敬, 佐藤雅和, 鈴木なな, 高橋樹里, 藤川朋奈, 宮本雄一郎, 曾根献文, 三浦紫保, 松本陽子, 有本貴英, 織田克利, 矢野哲, 藤井知行, 上妻志郎 CIN3+・子宮頸癌 la1 期に対する子宮頸部円錐切除術の有用性と再発に関する検討、横浜、第 50 回日本癌治療学会学術総会、2012

Kazunori Nagasaka, Takayuki Seiki, Christian Kranjec, Kei Kawana, Hiroe Kamoto-Nakamura, Ayumi Taguchi, Daichi Maeda, Lawrence Banks, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii HPV16 E6 interferes with hScrib regulation of ERK through protein phosphatase 1 γ DNA tumour Virus Meeting 2013, UK

Ayumi Taguchi, Kazunori Nagasaka, Kei Kawana, Kosuke Hashimoto, Rika Kusumoto-Matsuo, Hiroe Kamoto, Alessandro Bonetti, Osamu Wada-Hiraike, Katsutoshi Oda, Iwao Kukimoto, Piero Carninci, Lawrence Banks, Yutaka Osuga, and Tomoyuki Fujii

29th International Papillomavirus conference, USA

〔図書〕(計 3 件)

長阪一憲、矢野哲 ヒトパピローマウイルス DNA 検査 臨床検査ガイド 2013-2014 文光堂

長阪一憲、川名敬 子宮頸がんに対する薬物治療の実際 4) 新しい薬物療法の可能性-分子標的治療薬と個別化治療 臨床腫瘍プラクティス ヴァンメディカル

長阪一憲、川名敬 HPV ジェノタイプングと臨床的意義 産科と婦人科 診断と治療社

〔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：
出願年月日：
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

長阪一憲 (NAGASAKA, Kazunori)
東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30624233

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：