

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293338

研究課題名(和文) ミュラー管由来漿液性腺癌の分子生物学的特徴の解明と新たな治療標的の同定

研究課題名(英文) Identification of molecular characteristics in serous carcinoma of Mullerian origin

研究代表者

榎本 隆之 (ENOMOTO, Takayuki)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：90283754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣および子宮体部漿液性腺癌における分子生物学的特徴を明らかにし、卵巣・子宮体部に発生する類内膜腺癌と比較することによって、ミュラー管由来漿液性腺癌の分子生物学的共通性を同定することを目的とした。網羅的タンパク質発現解析の結果、漿液性腺癌は発生部位にかかわらず、臓器を超えた類似性を示した。特にIMP2とMCM2高発現は漿液性腺癌に特徴的であり、これらのタンパク質が癌細胞増殖に関与することを証明した。

研究成果の概要(英文)：Our aim is to clarify the similarity of molecular characteristics in both ovarian and uterine endometrial serous carcinoma. We performed protein expression profiling on 14 cases of serous carcinomas (7 ovarian and 7 endometrial) and 18 endometrioid carcinomas (9 ovarian and 9 endometrial) using iTRAQ. Hierarchical clustering showed the similarity of protein expression profiles between ovarian and endometrial serous carcinomas. Using 45 statistically highly expressed proteins in serous carcinomas, protein ontology analysis detected two enriched terms and proteins composing each term: IMP2 and MCM2. Immunohistochemical analyses confirmed the higher expression of IMP2 and MCM2 in ovarian and endometrial serous carcinomas. The knockdown of either IMP2 or MCM2 by siRNA interference significantly decreased the proliferation rate of ovarian serous carcinoma cell line. We suggest that increased IMP2 and MCM2 expression may underlie some of the rapid serous carcinoma growth observed clinically.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：Translational research microarray genome cancer proteome

1. 研究開始当初の背景

漿液性腺癌は、卵巣、卵管、子宮などミューラー管由来の臓器あるいは secondary müllerian system 由来である腹膜に発生する。いずれの臓器に発生する漿液性腺癌も、組織学的にあるいは生物学的に多くの類似点を持ち、いずれもほとんどの症例で分化度が低く腹膜播種を伴った進行がんとして発見されることが多く、予後不良な疾患である。漿液性腺癌の起源については、卵巣原発、あるいは腹膜原発の多くと子宮体部原発の一部は卵管采の上皮由来であるという説がある一方、腹膜原発の中には多中心性に発生するものがあるという説がある。また子宮体部原発のものは子宮内膜の上皮内病変から発生するという説もあり未だ明らかでない。

近年、網羅的ゲノムデータ取得及び解析技術の急速な進歩により、癌研究における Genomics の意義は日々増大している。The Cancer Genome Atlas や International Cancer Genome Consortium といった大規模プロジェクトが進むにつれて、網羅的ゲノムデータ解析により、乳癌、肺癌、膠芽腫、卵巣癌、大腸癌など様々な癌種で分子生物学的特徴が同定され、肺がんや乳がんを中心に分子診断及び分子標的薬がすでに臨床応用されているが、婦人科癌領域ではこういったトランスレーショナルリサーチは他の癌種と比較すると立ち遅れている。

2. 研究の目的

本研究では婦人科癌の中でも予後不良なミューラー管由来漿液性腺癌を対象とし、isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ) 法を用いたプロテオミクス解析を行うことにより、その分子生物学的特徴を明らかにすること、また、で明らかにされた分子生物学的特徴を基にミューラー管由来漿液性腺癌に対する新たな治療標的を同定すること、を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍細胞のタンパク質抽出

32 症例 (卵巣漿液性腺癌 7 例、子宮体部漿液性腺癌 7 例、卵巣類内膜腺癌 9 例、子宮体部類内膜腺癌 9 例) を対象とした。

腫瘍組織には腫瘍細胞の他に免疫細胞や間質細胞が含まれているため、レーザーマイクロディセクション法を用いて腫瘍細胞だけをサンプリングし、タンパク質抽出を行った。

(2) iTRAQ 法

各サンプルは iTRAQ 試薬 (AB SCIEX) で同位体標識ラベル化し、脱塩精製後 LTQ-Orbitrap XL Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて液体クロマトグラフィーにより分画し、蛋白質の同定と定量解析を行った。複数のサンプルで iTRAQ 法を行うにあたり、細胞株から抽出されたタンパク質を標準化サンプルとしてすべての iTRAQ

実験に含めることで、各 iTRAQ 実験間のデータの標準化を行い、データバイアスの影響を除外した。

(3) プロテオミクス解析

抽出されたタンパク質発現プロファイルについて中央値標準化を行い、発現変動の大きい (標準偏差 > 0.3) タンパク質を選択後、教師なしクラスター解析を行い、各症例間の類似性を評価した。

漿液性腺癌に有意な発現変化を認めるタンパク質を抽出後、The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) を用いてタンパク質オントロジー解析を行い、漿液性腺癌で機能的に変動しているタンパク質カテゴリーを同定した。そのうち、注目されるタンパク質について卵巣癌、子宮体癌のホルマリン固定パラフィン包埋スライドを用いて免疫組織染色を行った。

(4) 注目したタンパク質の機能解析

高悪性度卵巣漿液性腺癌由来の細胞株を用いて、注目されるタンパク質の knock-down 実験を行い、細胞増殖への影響を検討した。さらに、FACS を用いて knock-down 実験後の細胞周期変化を検討した。

4. 研究成果

(1) 臓器を超えた漿液性腺癌の分子生物学的特徴

各 iTRAQ 実験により得られたタンパク質発現データから共通するタンパク質を抽出後 QC コントロールを施行し、828 個のタンパク質発現プロファイルを同定した。そのうち、全サンプル間で発現変動の大きい (標準偏差 > 0.3) タンパク質 356 個を選択し、教師なし階層型クラスター解析を行った (図 1)。

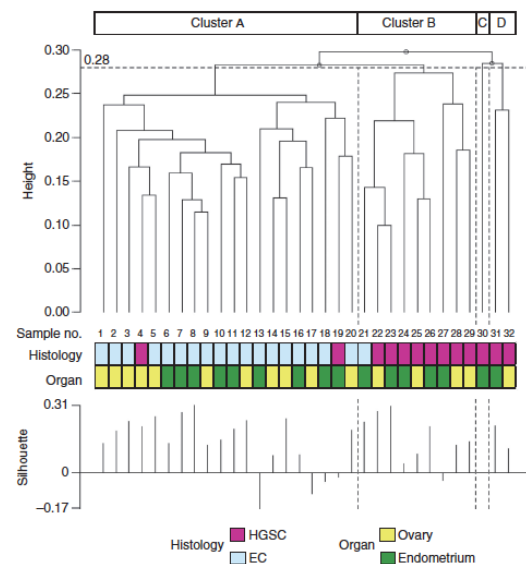


図 1. 臓器を超えた漿液性腺癌の類似性

2つの大きなクラスター(AとB)が存在し、クラスターAは16例中14例が類内膜腺癌、クラスターBは8例中7例が漿液性腺癌であり、組織型に有意な偏りを認めた($p < 0.01$)。発生臓器でのクラスター間の偏在性を評価したが、有意差を認めず、臓器を超えた漿液性腺癌の類似性が存在することがあきらかになった。

(2) タンパク質オントロジー解析を用いたタンパク質発現プロファイルの特徴付け

356個のタンパク質発現プロファイルを用いて漿液性腺癌と類内膜腺癌の2群間でタンパク質発現比較を行い、類内膜腺癌に比し漿液性腺癌で発現が有意に上昇している45個のタンパク質を同定した。45個のタンパク質についてタンパク質オントロジー解析を行い、「negative regulation of metabolic process」と「DNA replication initiation」の2つのカテゴリーが有意な関連を示した($q = 0.29$)。上記2つのカテゴリーに属するタンパク質のうち、IMP2とMCM2が最も各カテゴリーにおいて発現差の大きいタンパク質であった。そこで、IMP2とMCM2のタンパク質発現レベルについて検証するため、114症例(卵巣漿液性腺癌44例、子宮体部漿液性腺癌39例、卵巣類内膜腺癌18例、子宮体部類内膜腺癌13例)のホルマリン固定パラフィン包埋スライドを用いて免疫組織染色を行った(表1)。

Organ	HGSC		EC		P-value
	High	Low	High	Low	
(a) IMP2					
Ovary	39 (89%)	5 (11%)	2 (11%)	16 (89%)	<0.01
Endometrium	23 (79%)	6 (21%)	2 (15%)	11 (85%)	<0.01
Total	62 (85%)	11 (15%)	4 (13%)	27 (87%)	<0.01
(Fisher's exact test)					
(b) MCM2					
Ovary	38 (86%)	6 (14%)	3 (17%)	15 (83%)	<0.01
Endometrium	24 (83%)	5 (17%)	1 (8%)	12 (92%)	<0.01
Total	62 (85%)	11 (15%)	4 (13%)	27 (87%)	<0.01
(Fisher's exact test)					

表1 . IMP2 と MCM2 タンパク質発現の検証

免疫組織染色においても、IMP2とMCM2のタンパク質発現レベルは、類内膜腺癌に比し漿液性腺癌で有意に高かった。さらに卵管(10症例)および腹膜(8症例)原発の漿液性腺癌においても上記2つのタンパク質は高発現であり、「骨盤漿液性腺癌」に特徴的なタンパク質発現であることが示唆された。

(3) 漿液性腺癌におけるIMP2及びMCM2発現の意義

高悪性度卵巣漿液性腺癌由来の細胞株Kuramochiを用いてsiRNAによるIMP2 knock-down実験を行い、IMP2のタンパク質の有意な発現低下を確認するとともに、細胞増殖の低下を確認した($p < 0.01$)。同様に

MCM2のsiRNA knock-down実験においてもMCM2タンパク質発現レベルと細胞増殖との間に正の相関を認めた($p < 0.01$)。

IMP2の細胞周期への影響を検討するため、FACSを用いた細胞周期解析を行った。IMP2発現抑制後G0/G1期の細胞割合の増加とS期の割合の低下を認めた。

上記結果より漿液性腺癌は臓器を超えてタンパク質発現レベルでの類似性が存在することが判明した。さらに漿液性腺癌に特徴的な高い細胞増殖能に、IMP2及びMCM2のタンパク質発現が関連している可能性があり、今後治療ターゲットになりうる可能性が示唆された。

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 17 件)

1 Hiramatsu K, Yoshino K, Serada S, Yoshihara K, Hori Y, Fujimoto M, Matsuzaki S, Egawa-Takata T., Kobayashi E, Ueda Y, Morii E, Enomoto T, Naka T, Kimura T. Similar protein expression profiles of ovarian and endometrial high-grade serous carcinomas. Br J Cancer, 査読有、114(5) 2016, pp.554-61, DOI:10.1038/BJC.2016.27.

2 Nakaoka H, Gurumurthy A, Hayano T, Ahmadloo S, Omer WH, Yoshihara K, Kurose K, Enomoto T, Akira S, Hosomichi K, Inoue J. Allelic Imbalance in Regulation of ANRIL through Chromatin Interaction at 9p21 Endometriosis Risk Locus. PLoS Genet, 査読有、1、2016, pp.1-23, DOI:10.1371/journal.pgen.1005893.eCollection2016

3 Ishiguro T, Sato A, Ohata H, Ikarashi Y, Takahashi RU, Ochiya T, Yoshida M, Tsuda H, Onda T, Kato T, Kasamatsu T, Enomoto T, Tanaka K, Nakagama H, Okamoto K. Establishment and Characterization of an In Vitro Model of Ovarian Cancer Stem-like Cells with an Enhanced Proliferative Capacity. Cancer Res, 査読有、76(1)、2016, pp.1-23, DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-0361.

4 Matsuo K, Hasegawa K, Yoshino K, Murakami R, Hisamatsu T, Stone RL, Previs RA, Hansen JM, Ikeda Y, Miyara A, Hiramatsu K, Enomoto T, Fujiwara K, Matsumura N, Konishi I, Roman LD, Gabra H, Fotopoulou C, Sood AK. Venous thromboembolism, interleukin-6 and survival outcomes in patients with advanced ovarian clear cell carcinoma. Eur J Cancer, 査読有、51(14)、2015, pp.1978-88, DOI:10.1016/j.ejca.2015.07.012

- ⁵ Matsuo, K. Yoshino, K., Hasegawa K, Murakami R, Ikeda Y, Adachi, S., Hiramatsu K, Yokoyama T, Nishimura M, Sheridan TB, Enomoto, T., Fujiwara K, Matsumura N, Konishi I, Fotopoulou C, Roman LD, Sood AK., Survival outcome of stage I ovarian clear cell carcinoma with lympho-vascular space invasion. *Gynecol Oncol.* 査読有、136(2)、2015、pp.198-204、
DOI:10.1016/j.ygyno.2014.12.006.
- ⁶ Tamura R, Yoshihara K, Yamawaki K, Suda K, Ishiguro T, Adachi, S., Okuda S, Inoue, I., Verhaak RG, Enomoto, T., Novel kinase fusion transcripts found in endometrial cancer. *Sci Rep.*、査読有、5、2015、p18657、
DOI:10.1038/srep18657
- ⁷ Hiramatsu, K. Serada, S. Kobiyama, K. Nakagawa, S. Morimoto, A. Matsuzaki, S. Ueda, Y. Fujimoto, M. Yoshino, K., Ishii, K. Enomoto, T. Kimura, T. Naka, T.、CpG ODN potentiates the anti-tumor activity of anti-BST2 antibody. *Cancer Science*、査読有、106(10)、2015、pp.1474-82、
DOI:10.1111/cas.12738.
- ⁸ Hayano, T. Yamada, S. Hosomichi, K. Nakaoka, H. Yoshihara, K. Adachi, S. Kashima, K. and Enomoto, T. Inoue, I.、Identification of novel exonic mobile element insertions in epithelial ovarian cancers. *Human Genome Variation*、査読有、2、2015、15030、
DOI:10.1038/hgv.2015.30
- ⁹ Hayano, T. Yokota, Y. Hosomichi, K. Nakaoka, H. Yoshihara, K. Adachi, S. Kashima, K. Tsuda, H. Moriya, T. Tanaka, K. Enomoto, T. Inoue, I. Molecular Characterization of an Intact p53 Pathway Subtype in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *PLoS One*、査読有、9(2)、2014、e114491、
DOI:10.1371/journal.pone.0114491
- ¹⁰ Tamura, R. Kashima, K. Asatani, M. Nishino, K. Nishikawa, N. Sekine, M. Serikawa, T. Enomoto, T. Preoperative Ultrasound-Guided Needle Biopsy of 63 Uterine Tumors Having High Signal Intensity Upon T2-Weighted Magnetic Resonance Imaging. *Int J of Gynecological Cancer*、査読有、24(6)、2014、pp.1042-1047、
DOI:10.1111/cag.12069
- ¹¹ Ueda, Y. Sobue, T. Morimoto, A. Egawa-Takata, T. Hashizume, C. Kishida, H. Okamoto, S. Yoshino, K. Fujita, M. Enomoto, T. Tomita, Y. Fujiyoshi, J. Kimura, T. Evaluation of a free-coupon program for cervical cancer screening among the young: A nationally funded program conduct by local government in Japan. *J Epidemiol*、査読有、25(1)、2014、pp.50-56、
DOI:10.2188/jea.JE20140080
- ¹² Matuzaki, S. Enomoto, T. Serada, S. Yoshino, K. Nagamori, S. Morimoto, A. Yokoyama, T. Kim A. Kimura, T. Ueda, Y. Fujita, M. Fujimoto, M Kanai, Y. Kimura T. Naka T. Annexin A4-coferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A. *Int J Cancer*、査読有、134(8)、2014、pp.1796-809、
DOI:10.1002/ijc.28526.
- ¹³ Miyatake, T. Ueda, Y. Morimoto, A. Enomoto, T. Nishida, S. Shirakata, T. Oka, Y. Tsuboi, A. Oji, Y. Hoson, N. Nakatsuka, S. Morita, S. Sakamoto, J. Sugiyama, H. Kimura, T. WT1 peptide immunotherapy for gynecologic malignancies resistant to conventional therapies: a phase II trial. *J Cancer Res Clin*、査読有 139(3)、2013、pp. 457-63、
DOI:10.1007/s00432-012-1348-2
- ¹⁴ Ueda, Y. Miyatake, T. Nagamatsu, M. Yamasaki, M. Nishino, Y. Yoshino, K. Fujita, M. Tsutsui, T. Enomoto, T. Kimura, T. A phase II study of a combination chemotherapy using docetaxel and irinotecan for TC-refractory or TC-resistant ovarian carcinomas (GOGO-OV2 Study) and for primary clear or mucinous ovarian carcinomas (GOGO-OV3 Study). *Eur J Obstet Gyn R B*、査読有、170(1)、2013、pp.259-63、
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.06.035
- ¹⁵ Yokoyama, T. Enomoto, T. Serada, S. Morimoto, A. Matsuzaki, S. Ueda, Y. Yoshino, K. Fujita, M. Kyo, S. Iwahori, K. Fujimoto, M. Kimura, T. Naka, T. Plasma membrane proteomics identifies bone marrow stromal antigen 2 as a potential therapeutic target in endometrial cancer. *Int J Cancer*、査読有、132(2)、2013、pp.472-84、
DOI:10.1002/ijc.27679
- ¹⁶ Ueda, Y. Enomoto, T. Matsuzaki, S. Kobayashi, E. Kimura, T. Yoshino, K. Fujita, M. Tsutsui, T. Kimura, T. Taxane-sensitivity of ovarian carcinomas previously treated with paclitaxel and carboplatin. *Cancer Chemoth Pharm*、査読有、71(6)、2013、pp.1411-1416、
DOI:10.1007/s00280-013-2138-5
- ¹⁷ Yoshino, K. Enomoto, T. Fujita, M. Ueda, Y. Kimura, T. Kobayashi, E. Tsutsui, T. Kimura, T. Salvage chemotherapy for recurrent or persistent clear cell carcinoma of the ovary: a single-institution experience for a series of 20 patients. *Int J Clin Oncology*、査読有、18(1)、2013、pp.148-153、
DOI:10.1007/s10147-011-0357-5

〔学会発表〕(計 3 件)

1 Hiramatsu, K. Yoshino, K. Serada, S. Yoshihara, K. Fujimoto, M. Ueda, Y. Morii, E. Enomoto, T. Naka, T. Kimura, T., A proteomic analysis demonstrates similar expression pattern between ovarian and endometrial high-grade serous carcinoma beyond an organ 2015,6,5、24th Asian and Oceanic Congress Obstetrics and Gynaecology、Borneo Convention Centre Kuching、Malaysia.

2 平松宏祐、榎本隆之、吉原弘祐、上田豊、吉野潔、森井英一、仲哲治、木村正、卵巣および子宮体部の high- grade serous carcinoma の類似性の証明、2015,4,10、第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会、パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市

3 榎本隆之、子宮がんワクチン、第 30 回日本臨床細胞学会北陸支部連合学術集会、2013,9,8、金沢大学十全講堂、石川県、金沢市

〔図書〕(計 2 件)

1 Yokoyama, T. Yoshino, Y. Ueda, Y. Enomoto, T.、Nova science publishers, Inc、Endometriosis: Risk Factors, Symptoms and Management、2013、33

2 Adachi, S. Enomoto, T.、Nova science publishers, Inc、Endometriosis: Risk Factors, Symptoms and Management.、2013、5

〔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

榎本 隆之 (ENOMOTO, Takayuki)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：90283754

(2) 研究分担者

井ノ上 逸朗 (INOUE, Iturou)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授

研究者番号：00192500

仲 哲治 (NAKA, Tetuji)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所・免疫シグナルプロジェクト・招へいプロジェクトリーダー

研究者番号：30303936

吉野 潔 (YOSHINO, Kiyoshi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：903627730

上田 豊 (UEDA, Yutaka)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10346215

関根 正幸 (SEKINE, Masayuki)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：70345502

安達 聡介 (ADACHI, Sousuke)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：50613147