

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460695

研究課題名(和文)新規卵巣癌バイオマーカーTFPI2の血中発現メカニズムと機能解析

研究課題名(英文)Blood expression mechanism and function of TFPI2: a new biomarker for ovarian cancer

研究代表者

荒川 憲昭 (ARAKAWA, Noriaki)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・主任研究官

研究者番号：60398394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、卵巣明細胞がん(OCCC)のバイオマーカー候補タンパク質TFPI2の血中発現機構を解析し、TFPI2とOCCCとの関連性を明らかにするとともに、血清診断マーカーとしての有用性を評価した。TFPI2遺伝子は、OCCC患者組織中で特徴的に発現していた。他の組織癌由来の細胞とは異なり、TFPI2遺伝子のプロモーター領域の異常メチル化は認められなかった。遺伝子発現抑制系を用いた解析では、OCCC特異的なTFPI2発現にp53が関与する可能性が示唆された。組織中の遺伝子発現量に反映して、血清TFPI2はOCCC患者血清中で特徴的に増加しており、OCCCの血清診断における有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined relationship between TFPI2 and OCCC by investigating mechanisms underlying blood expression of TFPI2 in OCCC patients, and sought to evaluate the serum biomarker performance of TFPI2 in preoperative prediction of OCCC. TFPI2 gene was highly expressed in tumor tissues from OCCC patients. Unlike other cancer cell lines, and hypermethylation of TFPI2 promoter was undetected in OCCC-derived cell lines. Gene knockdown experiments showed that p53 is a more likely candidate for transcription factor involved in the characteristic expression of TFPI2 in OCCC. Serum TFPI2 was specifically elevated in OCCC patients, consistent with the gene expression level in the tumor tissues. These results suggest that TFPI2 is a useful serum biomarker for clinical diagnosis of OCCC.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：卵巣がん 明細胞がん TFPI2 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

婦人科がんの中で最も死亡率が高い卵巣癌は、多様な組織型が存在し、組織型によって化学療法の感受性、進展形式、予後などが異なる。中でも卵巣明細胞癌 (OCCC) は、化学療法抵抗性を有し、予後不良例が多い組織型である。卵巣がんの代表的マーカー CA125 は、OCCC では低値である症例が多く、また、CA125 は OCCC の発生源地の子宮内膜症においても上昇することから、OCCC を精度高く検出できるバイオマーカーの開発が望まれていた。

私たちは、OCCA 細胞株の細胞外分泌タンパク質のプロテオーム解析を実施し、組織因子経路インヒビター 2 (TFPI2) が CCA 細胞株の培養上清から特徴的に検出されることを見いだした。TFPI2 に対するモノクローナル抗体を作製し、TFPI2 測定のためのイムノアッセイ系を構築し、海外購入検体中の血清 TFPI2 量を測定した結果、TFPI2 は CCA 群で有意に高い値を示した。TFPI2 の臨床的有用性を評価するためには、日本人の検体解析を行うこと、また血中動態だけでなく、TFPI2 がどのようにしてがん細胞から発現するのかも含めて研究することが重要であると考えた。

2. 研究の目的

OCCC における TFPI2 の細胞外分泌発現機構を解析することで、本バイオマーカー候補タンパク質と OCCC との関連性を明らかにし、バイオマーカーの有用性を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 臨床検体：

婦人科腫瘍患者の組織検体は横浜市立大学と神奈川県立がんセンターにおいて、血清検体は横浜市立大学と奈良県立医科大学において、患者の同意を文書で得て集積された検体を用いた。

3-2. qPCR 解析：

卵巣癌組織検体からの total RNA を AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit にて抽出し、さらに RNeasy spin columns (Qiagen 社) を用いて精製した。SYBR OneStep RT-PCR Kit II 試薬 (タカラバイオ社) および Mx3000P Real-Time QPCR System (アジレントテクノロジー社) を用いて TFPI2 mRNA の定量解析を行った。内部標準物質として培養細胞には 18S-rRNA を、組織検体には β -アクトリン遺伝子を用いた。

3-3. TFPI2 測定：

培養上清中および血清中の TFPI2 測定は、2 種類の抗 TFPI2 モノクローナル抗体を用いた、磁性ビーズベースの in-house イムノアッセイ系を用いて測定した。

3-4. 細胞培養および siRNA の導入：

卵巣癌細胞株の培養および siRNA の導入は推奨されている方法に従った。p53 および HNF1b 遺伝子に対する Stealth siRNA (Thermo Fisher Scientific 社) を OVISE および OVMANA 細胞にリバーストランスフェクション法にて導入し、72 時間後の培養上清中の TFPI2 濃度を測定した。

3-5. メチル化解析：

TFPI2 遺伝子プロモーター領域のメチル化を解析するために、まず、種々のがん細胞株の染色体 DNA を AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit を用いて抽出し、bisulfite 処理を行った。Bisulfite 処理 DNA をテンプレートにして、PyroMark CpG アッセイ試薬および PyroMarkQ24 システム (Qiagen 社) を用いてパイロシーケンス解析を行った。

4. 研究成果

4-1. OCCC における TFPI2 遺伝子の発現：

OCCC を含む婦人科疾患 95 例の組織検体を用いて、組織中 TFPI2 mRNA の発現解析を定量 PCR 法により比較した。図 1 に示すように、TFPI2 mRNA は、子宮内膜症などの良性疾患や他の組織型卵巣癌では発現が認められず、OCCC 患者のがん組織中で特異的に発現していることがわかった。

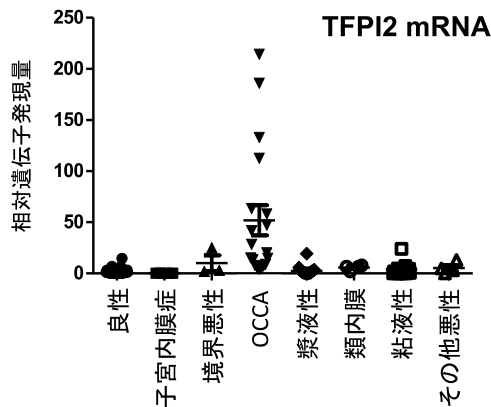


図 1. 様々な婦人科腫瘍組織における TFPI2 mRNA 発現量の比較。

4-2. TFPI2 遺伝子発現調節機構：

TFPI2 は様々な組織がんで、プロモーターの異常メチル化が起こり、発現が低下することが知られている。そこで、OCCC における TFPI2 遺伝子の発現調節機構を検討するために、まず、様々な組織癌由来の細胞株における TFPI2 プロモーター領域のメチル化をパイロシーケンス法により調べた。卵巣粘液性がんの細胞株、前立腺がん細胞株 LNCaP、大腸がん細胞株 Caco-2 細胞においては、高頻度なメチル化が認められたのに対し、OCCC 細胞株群においては、メチル化は検出されなかった (図 2)。

次に、OCCC 細胞にて特徴的に機能することが知られている転写因子 p53 および HNF-1 β に焦点を当て、これらの転写因子が TFPI2 の発現に関与しているのか siRNA を用

いて検証した。OCCC 細胞株 OVMANA において、p53 の発現抑制により TFPI2 mRNA の発現量および培養上清中の TFPI2 分泌量が 20%以下にまで低下したが、HNF-1 β の発現抑制では顕著な低下は見られなかった (図 3)。OCCC における TFPI2 遺伝子発現において、p53 が関与する可能性が示唆された。

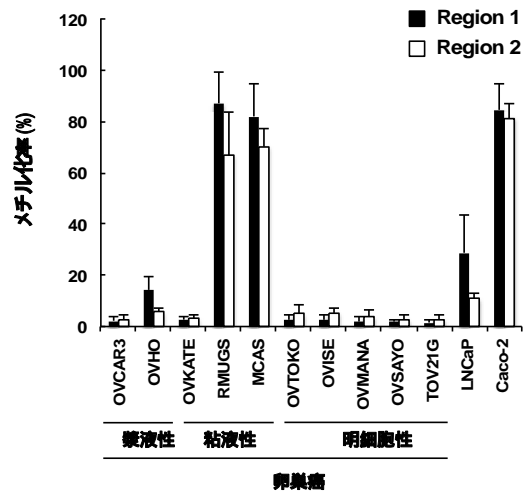


図 2. 様々ながん細胞株における TFPI2 プロモーターのメチル化率の比較。TFPI2 遺伝子のプロモーターの 2 力所の領域におけるメチル化率を示す。図示した細胞株のメチル化をパイロシーケンス法によって解析した。

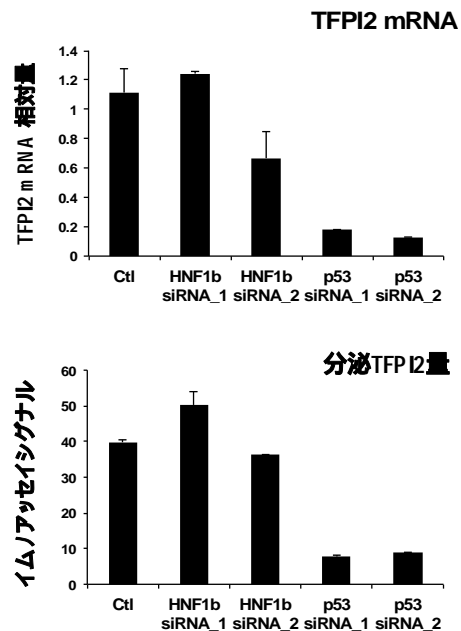


図 3. TFPI2 発現における p53 ノックダウンの影響。OCCC 細胞株 OVMANA に対し、各 siRNA 処理を行い、72 時間後の細胞中の TFPI2 mRNA 量を qPCR 法により、培養上清中の TFPI2 量をイムノアッセイにて測定した。

4-4. 患者血清中の TFPI2 の測定：

種々の日本人の婦人科腫瘍患者(268症例)における血清中 TFPI2 濃度を測定した。OCCC 患者(29例)の血清中 TFPI2 濃度(中央値 [四分位偏差]:781.8 [381.4-1410] pg/mL)は、他の組織型の卵巣癌患者(79例, TFPI2 濃度 208.5 [137.7-307.3] pg/mL)や子宮内膜症患者(71例 137.7 [104.0-191.0] pg/mL)に比べて有意に高い値を示した。この血清中 TFPI2 量は、図1で示した組織中 TFPI2 遺伝子発現量とも相関しており、OCCC の血中 TFPI2 量の増加は、卵巣組織中の TFPI2 遺伝子の発現上昇に依存することが示唆された。

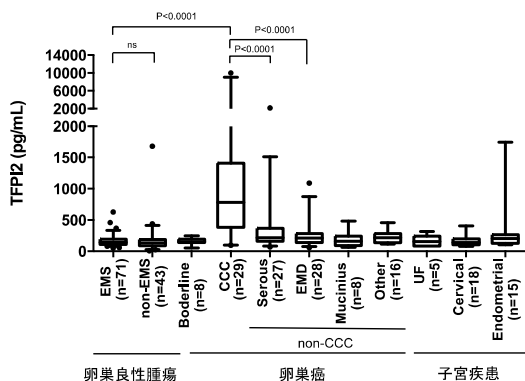


図4. 血清中 TFPI2 量の比較. 様々な婦人科腫瘍患者の血清中 TFPI2 量をイムノアッセイにより測定した. 箱ひげ図の箱は、第1四分位, 中央値, 第3四分位を示し、鬚は、5%点と95%点を示す. EMS, 子宮内膜症; EMD, 類内膜性癌; UF, 子宮筋腫; Cervical, 子宮頸がん; Endometrial, 子宮体がん.

受信者動作特性曲線(Receiver operating characteristic curve)の曲線下面積(AUC)を比較したところ、様々な卵巣疾患の患者の中で、OCCC 患者を識別する力は、CA125(AUC 0.595)と比べて TFPI2 (AUC 0.893)の方が高かった。TFPI2 は従来の CA125 よりも明細胞腺癌の診断精度が高い可能性が示された。Youden Index が最大となる血清 TFPI2 値をカットオフ値に設定すると、OCCC と他の組織型卵巣癌を識別能力は、感度 79%、特異度 85%、正診率 90% であり、子宮内膜症との識別能力は、感度 83%、特異度 93%、正診率 90%であった。こ

のマーカー性能は、別に前向き収集された156例の検体でも同等の結果が得られたこと、さらに血清 TFPI2 値は患者の年齢や月経周期とは明瞭な相関が認められなかったことから、本バイオマーカー測定は、卵巣癌疑いの患者が OCCC であるか否かを診断するために有用である可能性が示された。

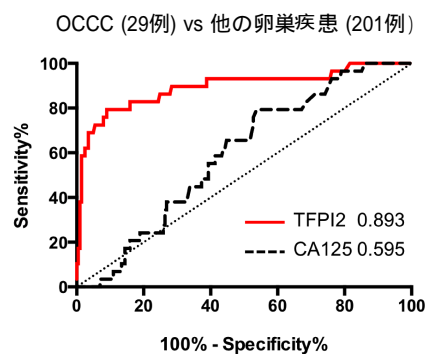


図5. TFPI2 と CA125 の OCCC 診断性能の比較. OCCC とその他の卵巣疾患の患者血清中 TFPI2 量と CA125 量に基づいて行った ROC 曲線解析結果を示した.

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6件)

1. Arakawa N, Kobayashi H, Yonemoto N, Masuishi Y, Shigetomi H, Furukawa N, Ohtake N, Miyagi Y, Hirahara F, Hirano H, Miyagi E. Clinical significance of tissue factor pathway inhibitor 2, a serum biomarker candidate for ovarian clear cell carcinoma. Plos One. 31;11(10):e0165609. 2016.
2. Arakawa N and Hirano H. Cell Culture-based Biomarker Discovery and Clinical Applications. Proteome Letters 1; 1-7, 2016.
3. Masuishi Y, Kimura Y, Arakawa N, Hirano H. Identification of glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteins and ω-sites using TiO₂-based affinity purification followed by hydrogen fluoride treatment. J Proteomics. 29;139:77-83, 2016.
4. Kimura A, Arakawa N, Hirano H. Mass spectrometric analysis of the phosphorylation levels of the SWI/SNF chromatin remodeling/tumor suppressor proteins ARID1A and Brg1 in ovarian

clear cell adenocarcinoma cell lines. J Proteome Res, 13(11): 4959-69, 2014.

5. Arakawa N, Miyagi E, Nomura A, Morita E, Ino Y, Ohtake N, Miyagi Y, Hirahara F, Hirano H. Secretome-based identification of TFPI2, a novel serum biomarker for detection of ovarian clear cell adenocarcinoma. J Proteome Res, 12: 4340-4350, 2013.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Arakawa N, Uemura H, Ito Y, Ino Y, Myoba S, Ohtake N, Yao M, Hirano H. Identification of a new biomarker for castration resistant prostate cancer by secretome analysis. HUPPO 15th Annual World Congress, 2016 年 9 月, 台北.
2. Arakawa N, Masuishi Y, Myoba S, Ohtake N, and Hirano H. MRM-based quantifications of blood biomarkers using a quantification peptide-tagged fusion protein. HUPPO 14th Annual World Congress, 2015 年 9 月, バンクーバー.
3. 荒川憲昭 卵巣がんの新しい血清診断マーカーTFPI-2の同定と臨床的有用性, 日本病態プロテオーム学会, 2015 年 8 月, 名古屋.
4. 荒川憲昭 培養細胞を起点としたバイオマーカー探索と診断応用, 日本プロテオーム学会 2015 年会, 2015 年 7 月, 熊本.
5. 荒川憲昭 培養細胞を利用した新規卵巣がん血清診断マーカー候補蛋白質の同定. 日本プロテオーム学会 2014 年 7 月, つくば.
6. 荒川憲昭 セクリトーム解析による卵巣明細胞腺癌血清マーカーの開発. 北里疾患プロテオーム研究会, 2012 年 8 月, 相模原
7. 荒川憲昭 セクリトーム解析による新規卵巣癌マーカーの同定と臨床的有用性 日本電気泳動学会 2012 年 8 月, 沖縄

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 組織因子経路阻害因子 2(TFPI2)測定による卵巣明細胞腺癌の検査方法および検査薬発明者:

権利者: 荒川憲昭, 平野久, 宮城悦子, 大竹則久

種類: 特許

番号: 特願 2014-239433

出願年月日: 2014.11.27

国内外の別: 国内

取得状況 (計 1 件)

名称: 組織因子経路阻害因子 2(TFPI2)測定による卵巣明細胞腺癌の検査方法および検

査薬

発明者: 荒川憲昭, 平野久, 宮城悦子, 大竹則久

権利者: 立大学法人横浜市立大学、東ソー株式会社

種類: 特許

番号: 特許第 6074676 号

取得年月日: 2017.1.20

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川憲昭 (ARAKAWA, Noriaki)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・主任研究官

研究者番号: 60398394

(2) 連携研究者

宮城悦子 (MIYAGI, Etsuko)

横浜市立大学・医学部産婦人科・教授

研究者番号: 40275053

増石有佑 (MIYAGI, Etsuko)

福島県立医科大学・医学部衛生学・予防医学講座・助教

研究者番号: 20626767