

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：72609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462623

研究課題名(和文) 各種婦人科癌特異的糖鎖を利用した転移・抗癌剤耐性に関わる細胞特性の解明とその応用

研究課題名(英文) Investigation of cell characteristics of cancer metastasis and drug resistance using gynecological cancer's specific sugar chains.

研究代表者

坂本 優 (SAKAMOTO, Masaru)

公益財団法人佐々木研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：20260101

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)：婦人科癌のPDT(光線力学的療法)でより腫瘍特異的に光感受性物質取り込ませるために、糖鎖およびその結合分子であるレクチンの応用を目指すため、癌細胞特異的な光感受性物質(レザフィリン)の取り込みに関与する糖タンパクの同定を試みた。子宮頸癌細胞株と子宮頸部正常上皮由来不死化細胞株や正常線維芽細胞とを比較してもレザフィリンの取り込み量は変わらなかったが、組織レベルでは腫瘍部は非腫瘍部に比べ、レザフィリンの取り込みが高いことが分かった。癌細胞特異的なレザフィリンの取り込みに関与する糖タンパクを同定するには組織レベルでの解析が必要と考えられた。また、糖結合に関与するガレクチン-4に関する解析を行った。

研究成果の概要(英文)：To take a photosensitizer more specifically in cancer at PDT (photodynamic therapy) of gynecological cancer by application of sugar chains and its binding molecules, lectins, we tried to identify the glycoproteins which participate in cancer specific uptake of the photosensitizer, laserphyrin. We compared laserphyrin uptake of the cell lines of cervical cancer with the uptake of immortalized cells from normal cervix uteri or normal fibroblasts, the uptakes were much the same. However, at an organizational level, tumors took laserphyrin more than non-tumor tissues. To identify the glycoproteins that involve in the cancer specific laserphyrin uptake, we have to make an analysis at tissue level. We also performed analysis of galectin-4, the molecule that participates in sugar binding.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：レザフィリン PDT 子宮頸癌 ガレクチン-4

1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮頸部初期がんの子宮温存療法として、子宮頸部円錐切除術が標準治療となっているが、その後遺症として早産、低出生体重、帝王切開のリスクが高くなることが問題である。一方、子宮頸がんに対する光感受性物質フォトリンによる PDT(光線力学的療法)では著効率が 97%と高く、上記の産科的リスクが低いにも関わらず、光過敏症という副作用が強く入院期間も長い為、標準治療には至っていない。そこで、代謝が早く光過敏症のより少ないレザフィリンの使用が試みられている。この PDT 治療の作用機序として、腫瘍親和性光感受性物質とレーザー光線との併用により悪性腫瘍内で光化学反応を起こし活性酸素を産生させ、腫瘍組織選択的に細胞死を起こすと言われている。しかしながら、細胞レベルでこの機構の制御メカニズムはいまだ詳細に解明されていない。

(2) ガレクチンは α -ガラクトシドを認識する動物レクチンファミリーであり、発生分化、糖蛋白質輸送、腫瘍転移、細胞死等の多くの生命現象に関与する。これまでに、消化管上皮組織に強く発現しているガレクチン-4 の糖結合特異性に注目して研究を行い、ガレクチン-4 が硫酸化糖蛋白質や硫酸化糖脂質の硫酸化糖鎖を認識し、その機能的ホモログとして同定した線虫ガレクチンが、感染防御に関与することがあきらかになっている。これらガレクチン-4 結合リガンドは細胞外に存在するが、他のガレクチン同様シグナル配列をもたず細胞質蛋白質としての属性をもつガレクチン-4 の細胞外への分泌機構は不明である。

2. 研究の目的

(1) より低濃度で、がん細胞特異的に効率的に腫瘍親和性光感受性物質を腫瘍にとりこませ、効率的に細胞死に至らしめる為に、婦人科系がん細胞を使ってレザフィリンを用いた PDT のメカニズムを明らかにするために、癌細胞特異的なレザフィリンの取り込みに関与する糖タンパクの同定を目指し、糖鎖およびその結合分子であるレクチンを用いた臨床への応用を目指した。

(2) ガレクチン-4 の細胞外への分泌機構の解明をめざし実験をおこなった。

3. 研究の方法

(1)

子宮頸部腺癌細胞株 HeLaS3 と子宮頸部扁平上皮癌細胞株 Caski にレザフィリンを 24 時間暴露させ、培地交換した後に、664nm の波長のレーザーを照射することで細胞死を起こさせることができるかどうか検討した。

レザフィリンの癌細胞内、正常細胞内での取り込みの状態を調べるため、HeLaS3、

Caski と正常子宮頸部腺上皮由来不死化細胞株 NCC16-P11 と正常子宮頸部扁平上皮由来不死化細胞株 NCE を用いて、レザフィリン 24 時間暴露後、培地交換し、レザフィリン蛍光を継時的に測定した。

細胞癌化の必要条件の一つである無限増殖性の獲得がなされていない正常線維芽細胞 HUC-F と子宮頸部扁平上皮癌細胞株 Caski とでレザフィリンの取り込みに差がみられるかどうか検討した。HUC-F と Caski にレザフィリン(30 μ g/ml)を 4 時間接触させた後、PBS で洗浄し、培地交換を行い、0 時間後、4 時間後、16 時間後、28 時間後、48 時間後のレザフィリンの取り込み状態を検討した。

組織レベルでのレザフィリンの取り込みを検討するために、半導体レーザーを用いた PDT の第一相臨床試験として子宮頸部異形成の症例にレザフィリンを投与 4 時間後に子宮頸部組織を生検しレザフィリンの取り込みの状態を検討した。

(2) ガレクチン-4 を高発現しているスキルス胃癌細胞株(NUGC-4)を用い、チロシンホスファターゼの阻害、活性型 Src キナーゼのトランスフェクションにより、細胞内のチロシンリン酸化を亢進させ、ガレクチン-4 の細胞内局在、分泌への影響を調べた。

4. 研究成果

(1)

子宮頸部腺癌細胞株 HeLaS3 と子宮頸部扁平上皮癌細胞株 Caski に光感受性物質(レザフィリン)を 24 時間暴露させ、培地交換した後に、664nm の波長のレーザーを照射することでレザフィリン投与量依存性に細胞死を起こさせることができた。

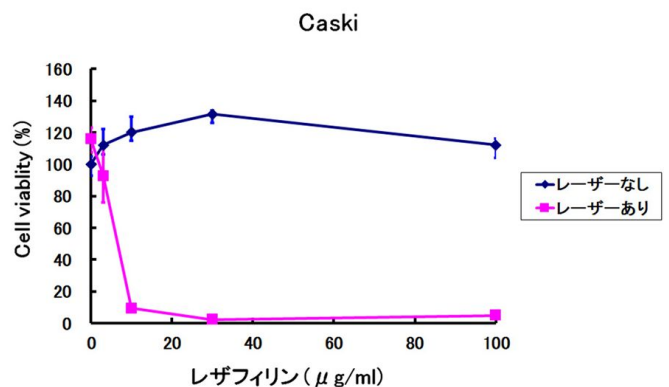
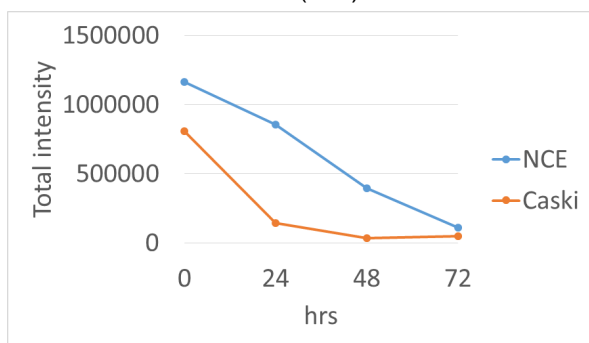


図 1 レザフィリン投与量とレーザー照射後の Cell Viability

レザフィリン 24 時間暴露後、培地交換して 72 時間経っても、癌細胞株、正常子宮頸部上皮由来不死化細胞株においてもレザフィリン蛍光が認められ、文献的に言われている癌組織と正常組織とのレザフィリン取り込みの時間差は、細胞レベルでは認められな

かった。

図 2 癌細胞株(Caski)と正常子宮頸部上皮由来不死化細胞株(NCE)の細胞 1 個当たり



のレザフィリン取り込み量

どの時間帯でも HUC-F と Caski でレザフィリンの取り込みの差を認めず細胞レベルでは癌細胞特異的なレザフィリンの取り込みは見られないと考えられた。

腫瘍部は非腫瘍部に比べてレザフィリンの取り込みが明らかに高い傾向を示した。そのため、レザフィリンは生体内では組織レベルにおいて癌細胞に多く取り込まれることがわかった。

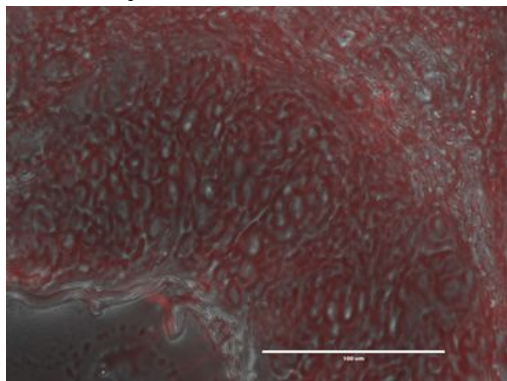


図 2 レザフィリンの組織での取り込みの様子

そのため、癌細胞特異的なレザフィリンの取り込みに関与する糖タンパクを同定するためには、組織レベルの違いを検討する必要があることが分かった。

(2) ガレクチン-4 は Src Family kinase によってチロシンリン酸されることを見だし、そのリン酸化に C 末端ペプチドが重要であることを明らかにした。細胞のチロシンリン酸化亢進状態で、ガレクチン-4 の細胞外放出は亢進するが、C 末端ペプチドを欠失した変異体ではチロシンリン酸化が抑制されると共に、その細胞外放出も抑制された。病原性細菌やウイルスの感染によって、シグナル伝達系が活性化され、その後の様々な生体反応が引き起こされるのが知られているが、それらの感染の重要な侵入経路となる消化管に多く存在するガレクチン-4 の細胞外への放出がシグナル伝達分子により制御されることが明らかになった。

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9件)

Fujii T, Saito M, Hasegawa T, Iwata T, Kuramoto H, Kubushiro K, Ohmura M, Ochiai K, Arai H, Sakamoto M, Motoyama T, Aoki D, Performance of p16INK4a/Ki-67 immunocytochemistry for identifying CIN2+ in atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion specimens: a Japanese Gynecologic Oncology Group study., International Journal of Clinical Oncology, 査読有, Vol. 20, No. 1, 2015, pp. 134-142
DOI:10.1007/s10147-014-0688-0

池田 さやか、工藤 一弥、佐々木 直樹、後藤 友子、高野 政志、菊池 良子、坂本 優、喜多 恒和、菊池 義公、カボザンチニブの併用は再発子宮平滑筋肉腫へのテモゾロミドとペパシズマブの治療効果を高める、日本婦人科腫瘍学会雑誌、査読有、Vol.33、No. 3、2015、pp. 564-564

Mikami M, Aoki Y, Sakamoto M, Shimada M, Takeshima N, Fujiwara H, Matsumoto T, Kita T, Takizawa K, Surgical principles for managing stage IB2, IIA2, and IIB uterine cervical cancer (Bulky Tumors) in Japan: a survey of the Japanese Gynecologic Oncology Group., International Journal of Gynecological Cancer, 査読有, Vol.24, No.7, 2014, pp. 1333-1340
DOI:10.1097/IGC.0000000000000202

Fujii T, Saito M, Hasegawa T, Iwata T, Kuramoto H, Kubushiro K, Ohmura M, Ochiai K, Arai H, Sakamoto M, Motoyama T, Aoki D, Performance of p16INK4a/Ki-67 immunocytochemistry for identifying CIN2+ in atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion specimens: a Japanese Gynecologic Oncology Group study., International Journal of Clinical Oncology, 査読有, Vol.20, No.1, 2014, pp. 134-142
DOI: 10.1007/s10147-014-0688-0

Kikuchi R, Kikuchi Y, Tsuda H, Maekawa H, Kozaki KI, Imoto I, Tamai S, Shiotani A, Iwaya K, Sakamoto M, Sekiya T, Matsubara O, The expression and clinical significance of connective tissue growth factor in advanced head and neck squamous

cell cancer., Human Cell, 査読有、Vol.27、
No.3、2014、pp. 121-128
DOI:10.1007/s13577-014-0092-0

Mikami M, Aoki Y, Sakamoto M, Shimada M, Takeshima N, Fujiwara H, Matsumoto T, Kita T, Takizawa, K, Disease Committee of Uterine Cervical and Vulvar Cancer, Japanese Gynecologic Oncology Group. Current surgical principle for uterine cervical cancer of stages Ia2, Ib1, and IIa1 in Japan: a survey of the Japanese Gynecologic Oncology Group, International Journal of Gynecological Cancer, 査読有、Vol.23, No.9, 2013, pp. 1655-1660
DOI:10.1097/IGC.0000000000000005

Ideo H, Hoshi I, Yamashita K, Sakamoto M, Phosphorylation and externalization of galectin-4 is controlled by Src family kinases., Glycobiology, 査読有、Vol.23, No.12, 2013, pp. 1452-1462
DOI:10.1093/glycob/cwt073

Kawate T, Iwaya K, Kikuchi R, Kaise H, Oda M, Sato E, Hiroi S, Matsubara O, Kohno N, DJ-1 protein expression as a predictor of pathological complete remission after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients., Breast Cancer Research and Treatment, 査読有、Vol.139, No.1, 2013, pp. 51-59
DOI:10.1007/s10549-013-2523-0

三宅 清彦、嘉屋 隆介、茂木 真、田中 忠夫、坂本 優、岡本 愛光、子宮体癌術後に発症した原発性腹膜癌の一例、日本婦人科腫瘍学会誌、査読有、Vol.31、No.4、2013、pp. 1055-1061

〔学会発表〕(計 12 件)

Kazuya Kudoh, Yuji Ikeda, Masashi Takano, Hiroko Kouta, Tsunekazu Kita, Ryoko Kikuchi, Morikazu Miyamoto, Tomoyuki Yoshikawa, Tomoko Goto, Kenichi Furuya, Yutaka Tamada, Arata Suga, Yoshihiro Kikuchi, Weekly administration of bevacizumab, eribulin and oxaliplatin in patients with platinum-resistant ovarian carcinomas: a phase II study with biomarker analysis., 2013年5月29日~6月2日、The 51th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), 「Chicago (USA)」

Masashi Takano, Hiroko Kouta, Kazuya Kudoh, Tsunekazu Kita, Ryoko Kikuchi, Morikazu Miyamoto, Tomoyuki Yoshikawa, Tomoko Goto, Kenichi Furuya, Yutaka Tamada, Arata Suga, Yoshihiro Kikuchi, Combination

therapy with temsirolimus and trabectedin for recurrent clear cell carcinoma of the ovary: A phase II study with biomarker analysis.、2013年5月29日~6月2日、The 51th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), 「Chicago (USA)」

Sayaka Ikeda, Kazuya Kudoh, Naoki Sasaki, Masashi Takano, Tomoko Goto, Ryoko Kikuchi, Masaru Sakamoto, Tsunekazu Kita, Nobuyuki Susumu, Daisuke Aoki, Hiroko Kouta, Yoshihiro Kikuchi, Synergistic effects of cabozantinib to temozolomide and bevacizumab in patients with heavily pretreated relapsed uterine leiomyosarcoma., 2013年5月29日~6月2日、The 51th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), 「Chicago (USA)」

Masaru Sakamoto, Takafumi Kuroda, Keiji Morimoto, Ryoko Kikuchi, Kiyohiko Miyake, Yasuko Koyamatsu, Tadao Tanaka, Aikou Okamoto, PDT for CIN3 and early stage cervical cancer might be superior therapy for fertility preservation in comparison with conization.、2015年4月9日~4月12日、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)」

坂本 優、子宮頸部細胞診ベセスダシステムとCINの管理、2014年7月19日、第32回日本臨床細胞学会東京都支部総会・学術集会、「東京医科大学病院 6F 臨床講堂(東京都・新宿区)」

坂本 優、黒田 高史、森本 恵爾、三宅 清彦、小屋松 安子、室谷 哲弥、落合 和徳、田中 忠夫、岡本 愛光、婦人科領域におけるPDTの現状と展望、2014年6月28日~6月29日、第24回日本光線力学学会学術講演会、「アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡県・浜松市)」

坂本 優、嘉屋 隆介、三宅 清彦、小屋松 安子、茂木 真、室谷 哲弥、落合 和徳、田中 忠夫、岡本愛光、シンポジウム「管腔臓器の治療における適応拡大と普及を目指して」 婦人科領域におけるPDTの適応拡大に向けて、2013年11月9日~11月10日、第34回日本レーザー医学会総会、「国際研究交流会館(東京都・中央区)」

菊池 良子、新規卵巣癌抑制遺伝子候補CTGF(Connective Tissue Growth Factor)およびANGPTL2(Angiopoietin-Like Protein 2)の同定について、2013年8月10日~8月11日、第31回日本ヒト細胞学会学術集会、「所沢市民文化センター・ミューズ(埼玉県・所沢

市)」

坂本 優、嘉屋 隆介、三宅 清彦、小屋松 安子、茂木 真、大浦 訓章、落合 和徳、田中 忠夫、岡本 愛光、広汎子宮頸部摘出術の適応と婦人科学的ならびに産科学的予後について、2013年7月19日~7月21日、第54回日本婦人科腫瘍学会学術講演会、「ホテルグランパシフィック LE DAIBA (東京都・港区)」

菊池 良子、アレイ CGH 法を用いたリンパ節転移陰性乳癌におけるゲノムコピー数変化の検出とその臨床応用に向けて、2013年6月22日~6月23日、第23回日本サイトメトリ学会学術集会、「日本医科大学橘桜会館 (東京都・文京区)」

坂本 優、嘉屋 隆介、三宅 清彦、小屋松 安子、茂木 真、室谷 哲弥、落合 和徳、田中 忠夫、岡本 愛光、婦人科領域におけるPDTの適応拡大に向けて、2013年6月7日~6月8日、第23回日本光線力学学会学術講演会、「旭川グランドホテル(北海道・旭川市)」

Masaru Sakamoto, Ryusuke Kaya, Kiyohiko Miyake, Yasuko Koyamatsu, Tadao Tanaka, Aikou Okamoto, PDT for CIN3 and early stage cervical cancer might be superior therapy for fertility preservation in comparison with conization.、2013年5月28日~5月31日、The 14th International Photodynamic Association、「Seoul (Korea)」

〔図書〕(計2件)

坂本 優、田中忠夫、金原出版、メディックブック . 患者さんによくわかる薬の説明 2015年版、2015年、pp. 1011-1012

坂本 優、田中忠夫、金原出版、メディックブック . 患者さんによくわかる薬の説明 2013年版、2013年、pp. 943-944

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 優 (SAKAMOTO, Masaru)
公益財団法人佐々木研究所・
附属研究所・研究員
研究者番号：20260101

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

菊池 良子 (KIKUCHI, Ryoko)
公益財団法人佐々木研究所・
附属研究所・研究員
研究者番号：80535063