

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861326

研究課題名(和文)新しい3次元培養法とiTRAQ法を用いた子宮頸部小細胞癌特異的膜蛋白質の探索

研究課題名(英文) Research about specific membrane proteins of small cell carcinoma of uterine cervix by innovative 3D culture and iTRAQ

研究代表者

高田 友美 (Takata, Tomomi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30437420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸がんの1種で難治性の子宮頸部小細胞癌について、特異的な蛋白質を見出し、新たな治療法などを探るため、手術で採取した組織から新しい培養法；CTOS (Cancer tissue- originated spheroid) 法で癌細胞を培養した。培養した子宮頸部小細胞癌と子宮頸部扁平上皮癌、子宮頸部粘液性腺癌、肺小細胞癌と肺扁平上皮癌、肺粘液性腺癌の蛋白質の量を比較した。小細胞癌でその他の癌に比べて多く発現している蛋白質を14個認め、そのうち4個について調べることにした。手術で摘出した子宮頸癌の組織で比較したところ、選んだ4個の蛋白質は小細胞癌で扁平上皮癌に比べて多く認められた。

研究成果の概要(英文)：To find a new therapy for small cell carcinoma of uterine cervix which is difficult to cure, we tried to find specific proteins of small cell carcinoma of uterine cervix by innovative 3D culture; CTOS method (Cancer tissue- originated spheroid) and iTRAQ. Cancer cells of small cell carcinoma, squamous cell and mucinous adenocarcinoma which were derived from lung and uterine cervix were cultured by innovative 3D culture and compared about its protein profile by iTRAQ. We identified 14 proteins which were much in small cell carcinoma than other types of cancer. 4 proteins were selected from 14 proteins by literature review. Then surgically resected specimens were investigated about these proteins by immunohistochemistry. All these proteins were confirmed that they were seen much in small cell carcinoma than in squamous cell or mucinous adenocarcinoma.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：婦人科腫瘍

1. 研究開始当初の背景

子宮頸部小細胞癌は子宮頸癌の 1-3%と稀な腫瘍であるが、血行性、リンパ行性に急激に進行する。発症年齢の中央値は 40 歳と若い、5 年生存率は IA2 期-IB1 期では 55-85%、IB2 期-II 期で 25-30%、III 期-IV 期で 0-16%と報告されており、他の婦人科腫瘍と比べて予後が悪い。手術や化学療法や放射線療法が一旦は奏功するものの、すぐに再燃、再発し、良好な生存率が得られていない。また、頻度が低く、治療法確立のために十分な臨床試験及び基礎研究が行われていないのが現状である。子宮頸部小細胞癌の cell line としては、CELL BANK では 1 種類、JCRB 細胞バンクで 1 種類が入手可能であるが、樹立された cell line が少ない。

現在、共同研究を行っている大阪府立成人病センター研究所の井上らが、2011 年に大腸癌手術検体から採取した癌細胞を、無血清培地で 3 次元培養を行う方法を報告した。(Kondo et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011) 3 次元培養された癌細胞塊は球状 (spheroid) を呈し、井上らが cancer tissue-originated spheroid (CTOS) と命名した。CTOS は間質細胞を含まない純粋な癌細胞の集塊であり、安定した増殖培養が可能であり、マウスでの造腫瘍能、また元の腫瘍の性質を保持していることが肺癌、尿路上皮癌でも示されている。(Endo et al. Thorac Oncol. 2013, Okuyama et al. J Urol. 2013) また、我々の研究で、婦人科癌においても CTOS 作成が可能であることが明らかとなっている。

現在、腫瘍の研究は細胞株を用いることが一般的であるが、細胞株のほとんどは血清含有培地で接着培養されている。株化する過程で遺伝子変化が蓄積するため、細胞株は元の癌細胞の性質を忠実に反映していない。また、腫瘍内では癌細胞同士が接着して存在するが、接着培養では擬似細胞外マトリクスとの接着で培養されている。さらに、通常の培養条件では生体内と比較して過剰な酸化、栄養状態に曝されている。また、細胞株は継代の過程で増殖能に優れたものが選択されることが明らかにされている。CTOS は従来の細胞株より元の腫瘍の性質を維持していることが示されており、癌研究の対象として、今後重要性が増すと考えられる。

また、我々は、膜蛋白質に対する iTRAQ 法を用いて正常子宮内膜細胞株と子宮内膜癌細胞株の蛋白発現を網羅的に比較し、子宮内膜癌に特異的に発現している膜蛋白質、BST-2 を同定し、ヌードマウスにおいて抗体療法に成功した。(Yokoyama T et al, Int J Cancer. 2013)

2. 研究の目的

当研究では、手術検体より培養して得られた cancer tissue - originated spheroid (CTOS) を用いて、子宮頸部小細胞癌の治療

ターゲットとなりうる蛋白質を iTRAQ 法を用いて網羅的に解析し、診断・創薬の鍵となる蛋白質を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

子宮頸部小細胞癌に特異的に発現する蛋白質を解析するため、子宮頸部小細胞癌 3 例、子宮頸部粘液性腺癌 1 例、子宮頸部扁平上皮癌 1 例、肺小細胞癌 1 例、肺粘液性腺癌 1 例の手術検体から作成した 3 次元培養細胞塊 (CTOS) と子宮頸部小細胞癌と子宮頸部粘液性腺癌細胞株をそれぞれ 1 種用いて、iTRAQ 法を行ない、網羅的蛋白解析を行った。細胞株をリファレンスとし、それぞれの検体のタンパクの相対的な発現量を得た。

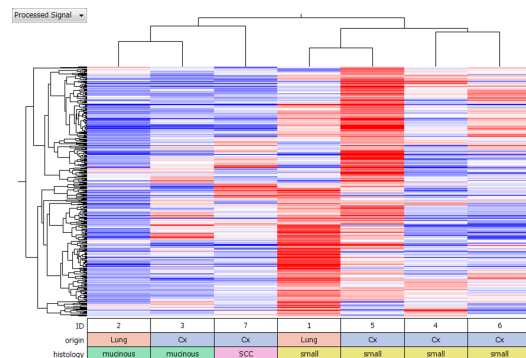
iTRAQ 法を用いて得られた結果及び文献的検索で小細胞癌に特異的と考えられる蛋白を選定し、手術検体に対して免疫組織化学染色を行い、手術検体を用いて検討した。

子宮頸部小細胞癌の細胞株を用いて細胞増殖 assay を行い、選定した蛋白の機能を解析した。

4. 研究成果

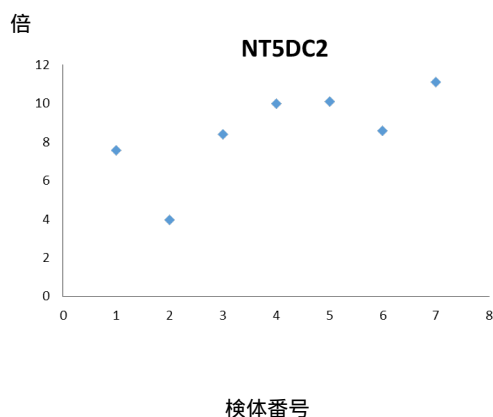
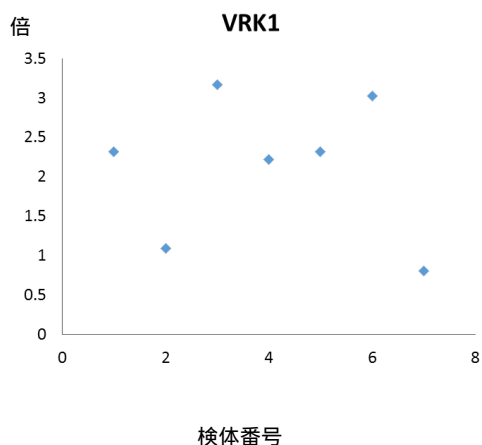
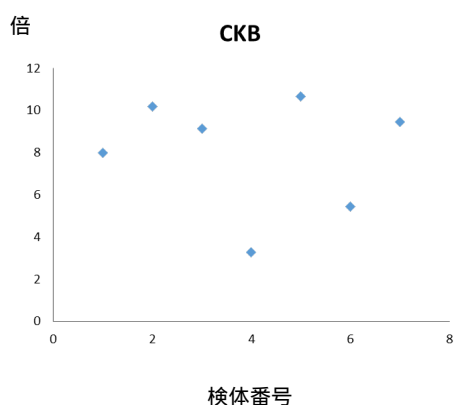
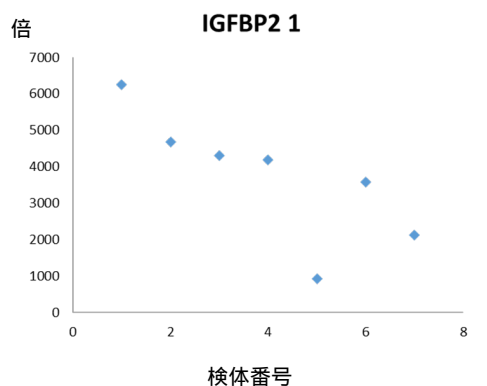
iTRAQ による網羅的な蛋白解析により、肺、子宮における、小細胞癌、粘液性腺癌の蛋白質の発現パターンは臓器特異性を超え、組織型でそのパターンが共通することが判明した。(図 1)

図 1



また、粘液性腺癌、扁平上皮癌の両方に比して小細胞癌で発現が増強している蛋白質を 14 種類同定した。これらの蛋白質について文献的検索を行い、標的とする蛋白質の評価を行うこととした。まず、その一つの secretagogin に着目し、免疫組織化学染色を行ったが、iTRAQ 法に使用したうち、2 種類の子宮頸部小細胞癌については発現を認めしたが、その他の臨床検体では発現が陰性であった。そのため、さらに mRNA の発現を検討し、子宮頸部小細胞癌の各症例で、腺癌に対して発現が高い 4 種類の蛋白(図 2)を iTRAQ 法で同定した 14 種類の蛋白の中から、文献的考察を踏まえ選定した。

図 2 (縦軸は腺癌に比した発現量)



続いて、IGFBP-2、CKBB、VRK-1、NT5DC2 について子宮頸部の扁平上皮癌、小細胞癌、粘液性腺癌について免疫染色にて検討したところ、いずれも小細胞癌と扁平上皮癌を比べると、小細胞癌の方が陽性の症例が有意差をもって陽性率が高いことが分かった。一方、小細胞癌と粘液性癌、粘液性腺癌と扁平上皮癌は陽性率について有意差を認めなかった。

また、IGFBP-2、VRK-1 については子宮頸部小細胞癌の細胞株を用いて siRNA を用いて検討した。それぞれの発現を抑制することにより、WST-1 assay にて細胞の増殖が抑制されることが示された。

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 5 件)

1. Egawa-Takata, T., Ueda, Y. Tanaka, Y. Morimoto, A. Kubota, S. Yagi, A. Terai, Y. Ohmichi, M. Ichimura, T. Sumi, T. Murata, H. Okada, H. Nakai, H. Mandai, M. Yoshino, K. Kimura, T. Saito, J. Kudo, R. Sekine, M. Enomoto, T. Horikoshi, Y. Takagi, T. Shimura, K. Mothers' attitudes in Japan regarding cervical cancer screening correlates with intention to recommend cervical cancer screening for daughters. *Int J Clin Oncol.*, 2016
URL:
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10147-016-0970-4>
2. 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.*, 114(5): 554-61, 2016
doi: 10.1038/bjc.2016.27.
3. Tanaka, Y. Ueda, Y. Kakuda, M. Kubota, S. Matsuzaki, S. Nakagawa, S. Egawa-Takata, T. Matsuzaki, S. Kobayashi, E. Yoshino, K. Kimura, T., Clinical outcomes of abnormal cervical cytology and human papillomavirus-related lesions in patients with organ transplantation: 11-year experience at a single institution., *Int J Clin Oncol.*, 2015
URL:
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10147-015-0940-2>

4. Egawa-Takata, T. Ueda, Y. Morimoto, A. Yoshino, K. Kimura, T. Nishikawa, N. Sekine, M. Horikoshi, Y. Takagi, T. Enomoto, T., Survey of Japanese mothers of daughters eligible for human papillomavirus vaccination on attitudes about media reports of adverse events and the suspension of governmental recommendation for vaccination., J Obstet Gynaecol Res., 41(12): 1925-71, 2015
doi: 10.1111/jog.12822.
5. Egawa-Takata, T. Ueda, Y. Morimoto, A. Tanaka, Y. Matsuzaki, S. Kobayashi, E. Yoshino, K. Sekine, M. Enomoto, T. Kimura, T., Human papillomavirus vaccination of the daughters of obstetricians and gynecologists in Japan., Int J Clin Oncol., 21(1): 53-8, 2015
doi: 10.1007/s10147-015-0869-5.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 上田豊 森本晶子 高田友美 松崎慎哉 小林栄仁 木村敏啓 吉野潔 藤田征巳 木村正, 子宮がん検診無料クーポンは検診受診率にどのような影響を及ぼしたのか, 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会, 4.18-20/'14, 東京
2. 平松宏祐, 吉野潔 高田友美 松崎慎哉 木村敏啓 小林栄仁 上田豊 藤田征巳 仲哲治 木村正, 網羅的タンパク解析およびバイオインフォマティクスを用いた類内膜癌発生臓器の鑑別マーカーの探索, 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会, 4.18-20/'14, 東京
3. Kiyohara, Y. Yoshino, K. Hiramatsu, K. Takata, T. Matsuzaki, S. Kimura, K. Kobayashi, E. Ueda, Y. Inoue, M. Kimura, T., Preparation of primary culture cells from a LCNEC of uterine corpus using CTOS (Cancer Tissue-Originated Spheroid) method, The 15th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, 11.6-11/'14, Melbourne, Australia
4. Takata, T. Kiyohara, Y. Endo, H. Okuyama, H. Yoshino, K. Kimura, T. Inoue, M., Screening of molecular targeting drugs and exploring biomarkers for uterine corpus carcinoma using CTOS method, The 19th Japan-Korea Cancer Research Workshop, 11.28-29/'14, Jeju, Korea

5. 松崎慎哉 角田守 松崎聖子 久保田哲 中川慧 清原裕美子 平松宏祐 森本晶子 高田友美 小林栄仁 上田豊 吉野潔 木村正, プラチナ耐性因子である Annexin A4 はプラチナ耐性癌の治療ターゲットとなりうる, 第3回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会, 2.21/'15, 福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

高田 友美 (Takata, Tomomi)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 30437420

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし