

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08698

研究課題名(和文) 子宮頸部腺癌における膜型エストロゲン受容体GPR30の機能解析と治療標的の可能性

研究課題名(英文) Functional analysis of GPR30 in cervical adenocarcinoma

研究代表者

高澤 啓 (Takasawa, Akira)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：00593021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸部腺癌手術材料でGPR30などの発現解析を行った。GPR30は正常腺上皮と比較して、腺癌で高発現していた。また、claudin-1とGPR30の両者が高発現している症例は予後不良であった。GPR30とERの発現は負の相関を示し、正常腺上皮ではERが、腺癌組織ではGPR30がエストロゲン受容体として機能している可能性が示唆された。GPR30アゴニスト投与で、複数の細胞株に共通して増加するタンパク質を明らかにした。それらのタンパク質をCRISPR-Cas9システムで欠損させたところ、増殖能などが抑制された。GPR30は複数のタンパク質を介し、頸部腺癌の悪性化に関与している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸部腺がんは、予後が悪く、患者数が増加しているものの、その自然史は十分に理解されていない。本研究では、頸部腺がんの悪性化に関与する機序の一部が明らかになった。特に、古典的エストロゲン受容体が発現していないことから、エストロゲン非依存性癌と理解されてきた頸部腺がんは、膜型エストロゲン受容体GPR30が発現し、claudin-1を介して悪性化に関与していることを明らかにした。この結果は、頸部腺がんがエストロゲン依存性癌である可能性を示すものであり、頸部腺がん患者の治療戦略を変える可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The expression of GPR30 was analyzed in the surgical specimen of uterine cervical adenocarcinoma. GPR30 was significantly high expressed in adenocarcinoma than in non-tumor glandular epithelium. Patients with each higher GPR30 and claudin-1 expression had a worse prognosis. GPR30 and ER expression were negatively correlated, suggesting that ER may function as an estrogen receptor in normal glandular epithelium and GPR30 in adenocarcinoma tissue. We identified several proteins that increase with GPR30 agonist exposure to several cell lines. When protein X was deleted by the CRISPR-Cas9 system, proliferation ability and the like were remarkably suppressed. It was suggested that GPR30 may be involved in malignant transformation of cervical adenocarcinoma via multiple proteins.

研究分野：人体病理学

キーワード：子宮頸部腺がん エストロゲン受容体 GPR30

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮頸部腺癌(以下、頸部腺癌)の患者数は増加しており、最近では、子宮頸癌全体の 25%を占めている。頸部扁平上皮癌と比較して、頸部腺癌では早期から浸潤・転移し、治療抵抗性が高いため、その予後は悪い。予後改善のためには、治療標的として設定可能な分子の同定や新たな治療戦略の確立が求められる。

ホルモン依存性悪性腫瘍では、乳癌、子宮体癌などでエストロゲン受容体(以下、ER)、特に ER の発現とその悪性化への関与が知られており、乳癌においては、その機序に基づいたホルモン療法がおこなわれている。一方、子宮頸部腺癌は、一般的に ER 陰性の婦人科癌として知られている。実際に、子宮体癌(類内膜腺癌)と頸部腺癌との鑑別困難な症例の病理診断において、免疫組織化学で ER 陰性、プロゲステロン受容体(以下、PgR)陰性であることが頸部腺癌と診断するうえで一助となる。このように、頸部腺癌のほとんどはエストロゲン非依存性の癌と考えられてきた。

申請者はこれまでに頸部腺癌におけるタイト結合関連タンパク質の発現とその意義を、手術材料、細胞株などを用い解析してきた(平成 26 年度 科研費基盤 C)。その結果、claudin-1 が頸部腺癌において過剰発現し、癌の悪性化に関与することを明らかにした(業績 7)。その発現解析の過程で、ER 陰性である複数の頸部腺癌細胞株において claudin-1 の発現がエストロゲン曝露に反応して増加することを見出した。詳細な検討の結果、頸部腺癌細胞株では膜型エストロゲン受容体 GPR30 が発現しており、GPR30 がエストロゲンによる claudin-1 の発現を調節していることを明らかにした(図 1、業績 9)。

GPR30 は 7 回膜貫通型 G 蛋白共役型受容体であり、リガンド不明の受容体として発見された。その後、乳癌研究において、GPR30 は選択的エストロゲン受容体調節薬(SERM)タモキシフェンへの耐性の原因分子であること、新たなエストロゲン受容体であることが判明した。現在までに乳癌を含む複数の癌腫において GPR30 は増殖、浸潤などへの関与が示されており、新たな治療標的候補として注目されている。

通常、頸部腺癌は ER 陰性であることから、これまでエストロゲンが頸部腺癌に及ぼす影響について詳細な解析は為されていない。GPR30 が介するエストロゲンによる頸部腺癌の発癌・癌進展機序の解析、頸部腺癌発症原因である HPV 感染と GPR30 発現の解析にいたっては皆無である。また、癌研究では、発癌機序の解明、癌腫の形質解析や新規分子療法等の有効性・妥当性検討のため、正常な生体の状態を反映した正常上皮細胞と癌細胞株とを比較することは非常に重要である。しかし、ヒト正常頸部腺上皮を用いた癌細胞との比較検討は行われていない。

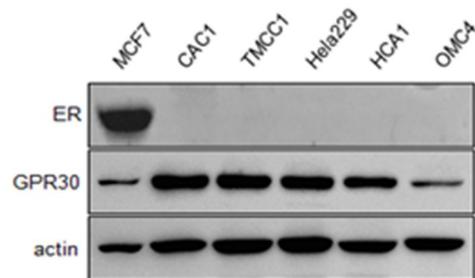


図 1. 頸部腺癌細胞株(CAC1, TMCC1, HeLa229, HCA, OMC4)で確認された GPR30 の発現。ER は陰性(Western blot)。MCF-7:乳癌細胞株

2. 研究の目的

以上の研究背景より、本研究では、頸部腺癌における膜型エストロゲン受容体 GPR30 の発現を解析し、癌悪性化への関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 頸部腺癌手術材料を用いた免疫組織化学的検討

頸部腺癌の各組織型の手術症例に対し、GPR30 の免疫染色を行い、陽性強度・面積をスコア

化、局在領域を評価する。また、ER、ER、ER、PgR、p16の免疫染色も行い、染色評価を行う。

GPR30 高発現群と低発現群で病理組織学的因子や予後に違いがあるかを統計学的に解析する。同時に免疫染色した claudin-1 を含む他分子の発現との関連について解析する。

(2) GPR30 標的遺伝子とシグナル伝達経路の解析

GPR30 選択的アゴニストの曝露によるタンパク質の変化を、プロテオーム解析を用いて網羅的に解析する。複数の細胞株で同様の検討を行い、共通して増加するタンパク質を明らかにする。

標的タンパク質候補について、K0 株を作成し、機能解析を行う。

GPR30 選択的アンタゴニストの曝露が、細胞株の増殖能などに及ぼす影響を解析する。

4. 研究成果

(1) 手術材料を用いた免疫組織化学的検討

53 症例の手術材料を用いて、claudin-1、GPR30、ER、ER、ER、p16 の抗体による免疫組織化学を行い、その染色強度や染色態度の評価を行った。

GPR30 は非腫瘍腺上皮では発現がほとんど見られなかったが、腺癌組織では高発現している症例が多く確認された。Claudin-1 と GPR30 の発現を解析したところ、両者が高発現している群で予後不良であった。この結果をまとめ論文として報告した(図 2、業績 9)

GPR30 の発現態度を見ると、浸潤先進部で陽性となる症例が多くみられた。ER と GPR30 の発現を比較したところ、ER は正常腺上皮で高発現し、癌組織ではその発現が減っていた。一方、GPR30 は前述のごとく、ER とは反対の挙動を示した。相関係数は有意に負の相関を示した。正常上皮では ER が、癌組織では GPR30 がエストロゲン受容体として働いていることが示唆され、「エストロゲン受容体スイッチ」といえるような現象である可能性が示唆された。以上の結果をまとめ、論文として報告した(図 3、業績 14)。

(2) GPR30 標的遺伝子とシグナル伝達経路の解析

複数の細胞株に対して、GPR30 のアゴニストを暴露し、ショットガンプロテオーム解析を行った。その結果、すべての細胞株で共通に発現増加しているタンパク質が数個確認された。ウエスタンブロッティングにて、その増加を確認したのち、細胞間接着に関係する protein X を標的として、CRSPR-Cas9 システムを用いて protein X K0 株の作製を行った。この K0 株は、増殖能などが顕著に抑制された。現在、さらに機能の解析を行っており、それらをまとめて論文として投稿予定である。

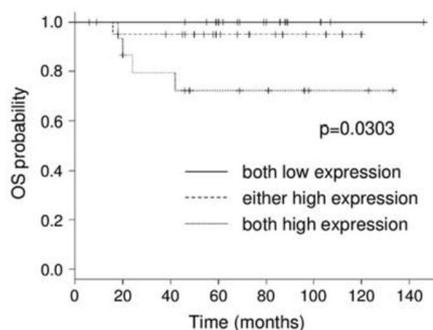


図2. 子宮頸部腺癌の生存曲線解析. Claudin-1 と GPR30 の両者が高発現している群は有意に予後不良.

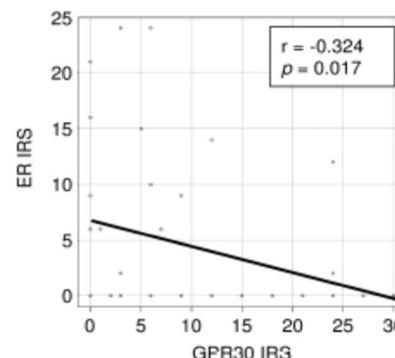


図3. 子宮頸部腺癌の GPR30 と ER 発現の相関. GPR30 と ER の発現は負の相関を示した.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Murata M, Osanai M, Takasawa A, Takasawa K, Aoyama T, Kawada Y, Yamamoto A, Ono Y, Hiratsuka Y, Kojima T, Sawada N.	4. 巻 366
2. 論文標題 Occludin induces microvillus formation via phosphorylation of ezrin in a mouse hepatic cell line.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Cell Res.	6. 最初と最後の頁 172-180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2018.03.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akimoto T, Takasawa A, Takasawa K, Aoyama T, Murata M, Osanai M, Saito T, Sawada N.	4. 巻 20
2. 論文標題 Estrogen/GPR30 Signaling Contributes to the Malignant Potentials of ER-Negative Cervical Adenocarcinoma via Regulation of Claudin-1 Expression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neoplasia	6. 最初と最後の頁 1083-1093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neo.2018.08.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka S, Aoyama T, Ogawa M, Takasawa A, Murata M, Osanai M, Saito T, Sawada N.	4. 巻 371
2. 論文標題 Cytotoxicity of Clostridium perfringens enterotoxin depends on the conditions of claudin-4 in ovarian carcinoma cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Cell Res.	6. 最初と最後の頁 278-286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2018.08.024.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aoyama T, Takasawa A, Murata M, Osanai M, Takano K, Hasagawa T, Sawada N.	4. 巻 52
2. 論文標題 Immunoreactivity patterns of tight junction proteins are useful for differential diagnosis of human salivary gland tumors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Med Mol Morphol.	6. 最初と最後の頁 23-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-018-0199-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Osanai M, Takasawa A, Takasawa K, Murata M, Sawada N.	4. 巻 15
2. 論文標題 Retinoic acid-metabolizing enzyme cytochrome P450 26A1 promotes skin carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 9987-9993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.8599.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aoyama T, Takasawa A, Takasawa K, Ono Y, Emori M, Murata M, Hayasaka T, Fujitani N, Osanai M, Yamashita T, Hasegawa T, Sawada N.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Identification of Coiled-Coil Domain-Containing Protein 180 and Leucine-Rich Repeat-Containing Protein 4 as Potential Immunohistochemical Markers for Liposarcoma Based on Proteomic Analysis Using Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2019.01.013.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Osanai M, Takasawa A, Murata M, Sawada N.	4. 巻 469
2. 論文標題 Claudins in cancer: bench to bedside.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pflugers Arch Eur J Physiol.	6. 最初と最後の頁 55-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-016-1877-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tabata S, Murata M, Takasawa A, Fukuda A, Ogasawara J, Koseki T, Nakano K, Segawa K, Morita R, Hasegawa T, Sawada N.	4. 巻 45
2. 論文標題 Cytological findings of langerhans cell sarcoma in a case of quintuple cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Diagn Cytopathol.	6. 最初と最後の頁 441-445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dc.23628	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takasawa K, Takasawa A, Osanai M, Aoyama T, Ono Y, Kono T, Hirohashi Y, Murata M, Sawada N.	4. 巻 403
2. 論文標題 Claudin-18 coupled with EGFR/ERK signaling contributes to the malignant potentials of bile duct cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Lett.	6. 最初と最後の頁 66-73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2017.05.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda A, Takasawa A, Akimoto T, Takasawa K, Aoyama T, Ino Y, Nojima M, Ono Y, Murata M, Osanai M, Hasegawa T, Saito T, Sawada N.	4. 巻 12
2. 論文標題 Prognostic significance of the co-expression of EGFR and HER2 in adenocarcinoma of the uterine cervix.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0184123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0184123.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Magara K, Takasawa A, Osanai M, Ota M, Tagami Y, Ono Y, Takasawa K, Murata M, Hirohashi Y, Miyajima M, Yamada G, Hasegawa T, Sawada N.	4. 巻 108
2. 論文標題 Elevated expression of JAM-A promotes neoplastic properties of lung adenocarcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2306-2314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13385.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aoyama T, Takasawa A, Murata M, Osanai M, Takano K, Hasegawa T, Sawada N.	4. 巻 52
2. 論文標題 Immunoreactivity patterns of tight junction proteins are useful for differential diagnosis of human salivary gland tumors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Med Mol Morphol	6. 最初と最後の頁 23-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-018-0199-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ino Y, Akimoto T, Takasawa A, Takasawa K, Aoyama T, Ueda A, Ota M, Magara K, Tagami Y, Murata M, Hasegawa T, Saito T, Sawada N, Osanai M.	4. 巻 35
2. 論文標題 Elevated expression of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) is associated with poor prognosis in patients with uterine cervical adenocarcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histol Histopathol	6. 最初と最後の頁 351-359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14670/HH-18-157.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato D, Kondo E, Yabuuchi K, Onodera J, Onodera T, Yagi T, Sakamoto K, Takasawa A, Iwasaki N, Yasuda K.	4. 巻 20
2. 論文標題 Assessment of valgus laxity after release of the medial structure in medial open-wedge high tibial osteotomy: an in vivo biomechanical study using quantitative valgus stress radiography.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Musculoskelet Disord	6. 最初と最後の頁 481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-019-2859-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayasaka N, Takada K, Nakamura H, Arihara Y, Kawano Y, Osuga T, Murase K, Kikuchi S, Iyama S, Emori M, Sugita S, Hasegawa T, Takasawa A, Miyanishi K, Kobune M, Kato J.	4. 巻 9
2. 論文標題 Combination of eribulin plus AKT inhibitor evokes synergistic cytotoxicity in soft tissue sarcoma cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 5759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42300-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 5. 佐藤大, 藪内康史, 小野寺智洋, 亀田敏明, 岩崎倫政, 近藤英司, 小野寺純, 北村信人, 八木知徳, 坂本圭太, 高澤啓, 安田和則.	4. 巻 36
2. 論文標題 内側楔状開大式高位脛骨骨切り術における内側側副靭帯浅層剥離の影響 定量的膝外反ストレス撮影による検討.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本関節病学会誌	6. 最初と最後の頁 131-139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 高澤啓
2. 発表標題 がんにおいて異常発現するタイト結合関連タンパク質の機能解析
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高澤啓
2. 発表標題 腫瘍におけるタイト結合－細胞生物学から臨床まで－
3. 学会等名 第64回日本病理学会秋期特別総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高澤啓、長谷川匡、小山内誠
2. 発表標題 FFPE組織を用いた比較プロテオミクスによる高分化型脂肪肉腫のバイオマーカー探索
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akira Takasawa, Kumi Takasawa, Makoto Osanai
2. 発表標題 Unexpected estrogen response mediated by a membrane-bound type estrogen receptor GPR30 promotes malignant potentials of uterine cervical adenocarcinoma via regulation of claudin-1 expression
3. 学会等名 The 11th JCA-AACR Special Joint Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kumi Takasawa, Akira Takasawa, Makoto Osanai
2. 発表標題 Role of claudin-18 on malignant potentials of bile duct cancer
3. 学会等名 The 11th JCA-AACR Special Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤裕己、高澤啓、青山智志、高澤久美、小野祐輔、村田雅樹、小山内誠、澤田典均
2. 発表標題 子宮頸部腺癌におけるALDOAの発現とその臨床病理学的意義
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青山智志、高澤啓、上田朝子、小野祐輔、村田雅樹、小山内誠
2. 発表標題 FFPE組織を用いたLC-MS/MSにより原因蛋白質同定に至った心アミロイドーシスの1剖検例
3. 学会等名 第6回日本アミロイドーシス研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上太郎、高澤啓、齋藤裕己、青山智志、小野祐輔、村田雅樹、小山内誠、澤田典均
2. 発表標題 子宮頸部腺癌におけるJAM-A発現とその意義
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高澤久美、高澤啓、小山内誠、青山智志、小野祐輔、村田雅樹、澤田典均
2. 発表標題 Overexpression of claudin-18 contributes to malignant potentials of bile duct cancer
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高澤 啓、伊野 善彦、青山智志、秋元 太志、中西 敬太郎、村田 雅樹、小山内 誠、長谷川 匡、澤田 典均
2. 発表標題 平滑筋肉腫のFFPE組織標本を用いた新規バイオマーカー探索の試み
3. 学会等名 第106回日本病理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akira Takasawa, Kumi Takasawa, Makoto Osanai, Tomoyuki Aoyama, Yusuke Ono, Tsuyoshi Kono, Yoshihiko Hirohashi, Masaki Murata, Norimasa Sawada
2. 発表標題 Claudin-18 coupled with EGFR/ERK signaling contributes to the malignant potentials of bile duct cancer
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高澤 啓
2. 発表標題 がんにおいて異常発現するタイト結合タンパク質の機能解析と治療標的としての可能性.
3. 学会等名 第60回組織細胞化学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	村田 雅樹 (Murata Masaki) (10404592)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	