

平成 23 年 2 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19591938

研究課題名(和文) 人絨毛ゴナドトロピンベータサブユニット産生能に着目した卵巣癌治療戦略に向けた検討

研究課題名(英文) Investigation for ovarian cancer therapy focusing on production of human chorionic gonadotropin beta subunit

研究代表者

田代 浩徳 (Tashiro Hironori)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70304996

研究成果の概要(和文)：

進行癌として診断されることが多い上皮性卵巣癌(卵巣癌)は、手術療法と抗癌化学療法が行われるが、再発の頻度が高く、再発治療に際しては抗癌剤に対する薬剤耐性の出現により未だに治療成績が不良であるのが現状である。われわれは、卵巣癌の発生母地となる不死化卵巣表層上皮細胞を用いた卵巣癌実験モデルシステムならびにヒト卵巣癌組織の解析により、妊娠時の胎盤が産生する human chorionic gonadotropin (hCG) のサブユニットを卵巣癌細胞が自ら産生し、オートクライン機構により増殖を促進している可能性を見出した。これを阻止することにより、既存の抗癌剤に替わる治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：

Most patients with ovarian cancer are diagnosed at an advanced stage. Although treatment for ovarian cancer consists of surgical treatment and combination chemotherapy, there is still poor prognosis associated with drug resistance. As an experimental model system for epithelial ovarian carcinogenesis, we established immortalized human ovarian surface epithelial (OSE) cell lines. Using this system, we clarified the production of hCG α subunit and β subunit in the OSE cells, and the effect of hCG β subunit in anchorage-independent growth of the OSE cells. Moreover, many ovarian cancer tissues also expressed hCG β subunit. This discovery will provide a development of new therapeutic strategies for ovarian cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科

キーワード：婦人科腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

悪性卵巣腫瘍の約8割は卵巣表層上皮由来と考えられており、特に、卵巣表層上皮性間質性の悪性腫瘍（以下、卵巣癌）は本邦において、漸増傾向にある。近年の分子生物学的解析法の発展で、種々の癌抑制遺伝子 (*p53*, *PTEN*) の不活化や癌原遺伝子 (*k-ras*, *AKT2*, *PIK3CA*) の活性が報告されてきている。しかし、これらの遺伝子は生体内で重要な機能を有することより、これらの遺伝子をターゲットとした遺伝子治療には限界がある。

われわれは、患者の同意の下、医学的適応で摘出された正常卵巣より卵巣表層上皮（以下、ovarian surface epithelium: OSE）を採取し、SV40 large T 抗原を導入することで、不死化した7系統の OSE 細胞株を得た。その中の1系統において、同一患者の OSE から、ヌードマウス腹腔内への投与で血性腹水を伴う播種性の腫瘍を造る細胞株 (OSE2b2) と腫瘍を造らない細胞株 (OSE2a) が得られた。造腫瘍能を有しない OSE2a は正常 OSE でみられる luteinizing hormone (LH)/human chorionic gonadotropin (hCG) 受容体の発現を認め、軟寒天培地上でのコロニー形成能はほとんどみられなかった。一方、造腫瘍能を有する OSE2b2 はこの LH/hCG 受容体の発現がみられず、高いコロニー形成能を有していた。われわれは LH/hCG 受容体を発現する OSE2a において、intact hCG 刺激による足場非依存性増殖を確認し、LH/hCG 受容体を介する増殖シグナルの活性化を報告した (Cancer sci. 94: 953-959 2003)。また、Vartiainen J. らは、卵巣癌患者の血清において、hCG を構成する subunit が高値となり、高値を示す症例では予後不良である症例が多く、両者の間に相関があることが報告されている (Int. J. Cancer 95: 313-316 2001)。以上より、hCG は卵巣癌の発癌ならびに進展になんらかの重要な働きを担っている可能性が考慮されるが、その詳細な機構は不明であった。

2. 研究の目的

近年においても、卵巣癌の早期診断は困難であり、進行癌として診断されることが多い。白金製剤やタキサン系薬剤の登場以来、5年生存率の向上をみてきたが、薬剤耐性により長期生存率は依然として不良である。また、他の領域の癌腫においては、分子標的薬の開発が進められている中、卵巣癌には未だ有効な分子標的薬が開発されていない現状にある。今回、hCG の研究の展開によりこれまでにない新たな治療薬としての候補になるか検討を行なった。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 解析

SV40 Large T 抗原を導入することで不死化した OSE2a と OSE2b2 細胞株を Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12 containing 10% fetal calf serum (FCS) にて培養を行い、これらの培養上清を用いて、enzyme immunoassay を行い、hCG subunit ならびに subunit の産生能を調べた。また、これらの細胞を用いて、ポリクローナル抗体による免疫組織学的解析により、hCG subunit ならびに hCG 受容体の発現を調べた。患者の同意の下、OSE2a と OSE2b2 と同様の手技にて採取した OSE 細胞に human papillomavirus E7 遺伝子と human telomerase reverse transcriptase 遺伝子を導入することで不死化させた HOSE-E7/hTERT 細胞 (Bri. J. Cancer 93: 116-123, 2005) も用いて同様の検討を行なった。

hCG 産生能を有する OSE2a と OSE2b2 において、hCG subunit ならびに subunit の mRNA レベルでの遺伝子発現をみるためにそれぞれの細胞より RNA を抽出して、reverse transcription (RT) - nested polymerase chain reaction (PCR) (Life Technologies) を施行した。使用したプライマーは下記の記載通りである。*hCG* (first round PCR); 5'-GCC ATG GAT TAC TAC AGA AAA TAT-3 (sense) / 5'-CAG TAA AGC TGC AGT ATA TCC TTG-3 (antisense), *hCG* (nested PCR); 5'-CTG CAT GTT CTC CAT TCC G-3 (sense) / 5'-ACA AGT ACT GCA GTG GCA CG-3 (antisense), *hCG* (first round PCR); 5'-TCG GGT CAC GGC CTC CTC CTG G-3 (sense) / 5'-TCG GGG TGT CCG AGG GC-3 (antisense), *hCG* (nested PCR); 5'-ATG GAG ATG TTC CAG GGG CT-3 (sense) / 5'-CCG GCA GGA CCC CCT GCA GCA-3 (antisense), *GAPDH* (internal control); 5'-GGT CAT CCC TGA GCT GAA CG-3 (sense) / 5'-TTC GTT GTC ATA CCA GGA AAT-3 (antisense)。また、TGF receptor I と II に対する RT-PCR のプライマーは、次の通りである。*TGF RI*; 5'-GCT CTA CGT GCG CCA ACA ACA TCA-3 (sense) / 5'-ACT GCT TGC CCA TCT CCG TCT TCC-3 (antisense), *TGF RII*; 5'-CGT TAC AGT GTT TCT GCC ACC T-3 (sense) / 5'-AGA CGA AGC ACA CTG GTC CAG C-3 (antisense)。

増殖能の評価には、OSE2a ならびに OSE2b2 細胞を用いて、Biotrak Cell Proliferation ELISA System Version 2 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) による足場依存性増殖能ならびに軟寒天培地でのコロニー形成能による足場非依存性増殖能の検討を行なった。

(2) *in vivo* 解析

ヒト組織における検討を行なうために、同意の得られた 37 例の卵巣癌患者より、新鮮

凍結卵巣癌組織より前述した RT-PCR 法により、hCG と subunit、ならびに hCG 受容体の mRNA の発現ならびに免疫組織化学による発現細胞の局在を確認した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* 解析

初期培養の OSE 細胞 (primary OSE) ならびに SV40 Large T 抗原による不死化 OSE 細胞株の OSE2a と OSE2b2 における hCG サブユニットならびに サブユニットの産生をみると初期培養細胞でみられた hCG サブユニットの産生濃度が不死化細胞株では減少し、それに変わって サブユニットの産生濃度の増加が確認された。さらに、不死化細胞株の中でも、造腫瘍能を獲得した OSE2b2 の細胞では、hCG サブユニットに高い産生濃度が確認された (表 1)。しかし、human papillomavirus E7 と hTERT の導入によって不死化した新規 HOSE-E7/hTERT 細胞株では、これらの hCG 産生が確認できなかったために、OSE2a ならびに OSE2b2 を用いて、本研究を進めた。

表 1

培養上清中の hCG- α と hCG- β の濃度

	hCG- α	hCG- β
Primary OSE	7.91 \pm 3.84	0.52 \pm 0.27
OSE2a	0.78 \pm 0.35	2.87 \pm 1.61
OSE2b2	0.34 \pm 0.34	12.02 \pm 1.09

(ng/ml)

OSE2a ならびに OSE2b2 における hCG とサブユニットの mRNA レベルの発現の検討では、サブユニットが OSE2a でみられ、OSE2b2 では認められないのに対して、サブユニットは逆に OSE2a でみられず OSE2b2 で観察された。これは、培養液の中の牛胎仔血清 (FCS) の添加に関与しないことがわかった (図 1)。

図 1



OSE2a と OSE2b2 の LH/hCG 受容体に関する解析は既にわれわれが報告 (Cancer sci. 94: 953-959 2003) したように、OSE2a ではその受容体の発現がみられるのに対して、OSE2b2 ではみられなかった。近年、hCG サブユニット

は LH/hCG 受容体を介することなく、TGF- β 受容体を介した apoptosis の抑制機構が報告されている (Mol Cell Endocrinol. 260-262: 264-270 2007)。OSE2a と OSE2b2 において、TGF- β 受容体 (I, II) の発現を解析したところ、これらの発現が確認された (図 2)。

次に、OSE2a と OSE2b2 の増殖機構の解析したところ、いずれの細胞も足場依存性増殖能と hCG サブユニットの濃度との関連はみられなかった (図 3)。

OSE2a ならびに OSE2b2 における TGF- β I とその受容体の発現

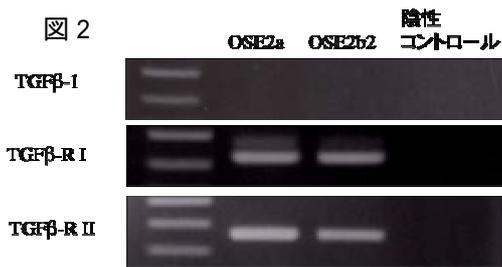
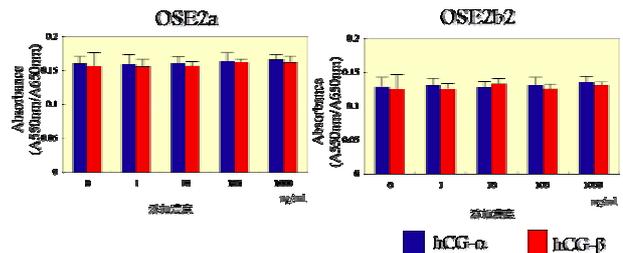


図 3

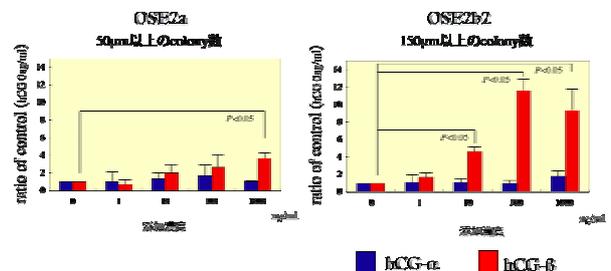
hCG- α ならびに hCG- β 添加による 足場依存性増殖能



しかし、hCG ならびに サブユニット添加による足場非依存性増殖能の検討を施行したところ、hCG サブユニット添加で OSE2a と OSE2b2 の有意な足場非依存性増殖能の亢進が確認され、OSE2b2 で顕著であった (図 4)。

図 4

hCG- α ならびに hCG- β 添加による 足場非依存性増殖



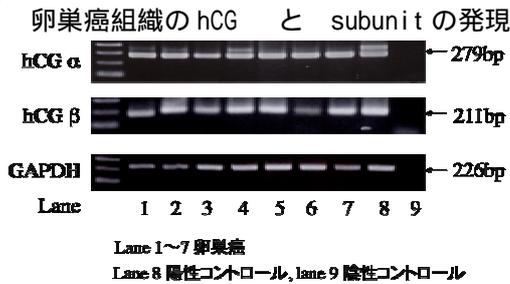
以上より、LH/hCG 受容体を有さず、TGF 受容体を有する OSE2b2 は hCG サブユニットを自ら産生し、かつ、この サブユニットによって足場非依存性増殖能の亢進がみられ、TGF 受容体を介するオートクライン

機構が存在する可能性が示唆された。

(2) *in vivo*解析

ヒト卵巣癌において、37例のヒト卵巣癌組織におけるRNAレベル(RT-PCR)で、hCGならびに subunit の発現を検討したところ、subunit の発現が32例(86.5%)、subunit の発現が35例(94.6%)に認められた(図5)。

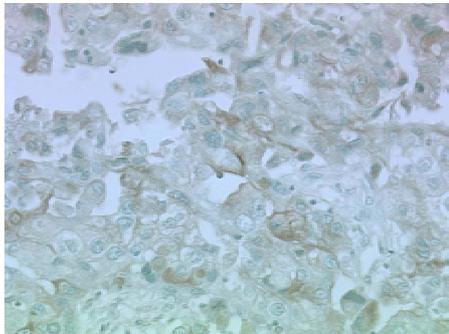
図5



また、免疫組織学的検討においても、卵巣癌組織の癌細胞に hCG subunit の発現が確認された(図6)。一方、LH/hCG 受容体の発現は卵巣癌細胞ならびに間質細胞の両者に観察された。

図6

卵巣癌組織におけるhCG β サブユニットの発現



(核染:メチルグリーン)

(3) 総括

*in vitro*の解析により、卵巣表層上皮より発生する上皮性卵巣癌においては、自らのhCG サブユニット産生能によるオートクライン増殖機構の存在が示された。これは、LH/hCG 受容体を介さずに、TGF など他の関連する受容体を介するシグナル伝達系の存在が推察された。また、卵巣癌組織においても、腫瘍細胞に特異的な hCG サブユニットの発現が確認された。このことより、hCG サブユニットに対する抗体あるいはその受容体の制御により、これまでになく新たな卵巣癌の治療法構築の可能性が示された。

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. Motohara T., Tashiro H., Miyahara Y., Sakaguchi I., Ohtake H., Katabuchi H. Long-term oncological outcomes of ovarian serous carcinomas with psammoma bodies: a novel insight to the molecular pathogenesis of ovarian epithelial carcinoma. *Cancer Science* 101:1550-1556, 査読有り, 2010.
2. Motohara K., Tashiro H., Taura Y., Ohba T. and Katabuchi H. The immunohistochemical analysis of 17 α -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes in human ovarian surface epithelium and epithelial ovarian carcinoma. *Medical Molecular Morphology* 43:197-203, 査読有り, 2010.
3. Katabuchi H. Keywords of the Epithelial ovarian cancer research toward the advancement of novel therapeutic strategy: putative precursor cells, risk factors and molecular mechanisms of carcinogenesis and dissemination of epithelial ovarian cancer. *Acta Obstetrica et Gynaecologica Japonica* 61:1727-1736, 査読有り, 2009
4. Sasaki R, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Tashiro H, Katabuchi H, Kiyono T. Oncogenic transformation of human ovarian surface epithelial cells with defined cellular oncogenes. *Carcinogenesis* 30:423-431, 査読有り, 2009.

5. Sangha N, Wu R, Kuick R, Powers S, Mu D, Fiander D, Yuen K, Katabuchi H, Tashiro H, Fearon ER, Cho KR. Neurofibromin 1 (NF1) defects are common in human ovarian serous carcinomas and co-occur with TP53 mutations. Neoplasia 10:1362-1372, 査読有り, 2008.

[学会発表](計2件)

1. 片瀧秀隆. 卵巣癌研究の符丁と新たな治療開発への展望 : 母細胞 癌原因子そして発癌・播種メカニズム 第61回日本産科婦人科学会学術講演会 教育講演 2009年4月4日(京都市)
2. 田代浩徳, 佐々木瑠美, 清野透, 片瀧秀隆. De novo 発生の上皮性卵巣癌における分子レベルでの多段階発癌機構:分子標的薬開発に向けた卵巣癌実験モデルの構築 第46回日本婦人科腫瘍学会学術集会 ワークショップ3 2009年7月11日(新潟市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田代 浩徳 (Tashiro Hironori)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 70304996

(2)研究分担者

片瀧 秀隆 (Katabuchi Hidetaka)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 90224451

大竹 秀幸 (Ohtake Hideyuki)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 60336237

(3)連携研究者

なし