

平成 21 年 4 月 28 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890124
 研究課題名（和文） 卵巣癌腹膜播種に重要なインテグリンの特定とその発現機序の解析
 研究課題名（英文） Analysis of the adhesion molecule which is important for ovarian cancer dissemination
 研究代表者
 澤田 健二郎（SAWADA KENJIRO）
 大阪大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：00452392

研究成果の概要：

卵巣癌腹膜播種には、上皮細胞間の接着因子である E-cadherin の発現抑制によって誘導される Integrin $\alpha 5$ が重要な役割を果たしており、Integrin $\alpha 5$ の分子標的治療は卵巣癌腹膜播種の抑制に有用である可能性を証明した。

また、妊娠初期において絨毛細胞が母体子宮筋層内に浸潤する際に、低酸素刺激による E-Cadherin の発現消失から誘導される Integrin $\alpha 5$ の発現が重要な役割を果たしていることを臨床胎盤検体のデータを併せて証明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,330,000	0	1,330,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：卵巣癌、腹膜播種、インテグリン、カドヘリン、分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は婦人科癌の中でも最も予後不良な癌で、抗腫瘍効果の強い抗癌剤が多く臨床応用されているにも関わらず、いまだ劇的な予後の改善は認められていない。卵巣癌患者の最大の死因は癌細胞の腹腔内臓器への浸潤、すなわち、腹膜播種であり、そのメカニズムの解析とそれに基づく新しい治療薬の開発は新しい卵巣癌に対する分子標的治療となりえる。卵巣癌は卵巣表面の一層からなる卵巣上皮から発生し、癌化に伴い上皮から離脱するため、その発生過程において、

E-Cadherin の発現消失が重要と考えられる。また、上皮から遊離した卵巣癌細胞はその生存のために早期に腹腔内臓器に付着する必要があるため、接着因子の発現が増加している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

(1) 上記背景に基づき、卵巣癌において、E-Cadherin の発現消失が細胞外マトリックスへの接着を司る Integrin の発現を制御しているのではないかという仮説を立てるに至った。そして、もし、E-Cadherin の発現

抑制に伴う接着因子を同定できれば、発癌、転移の新たなメカニズムが解明されるとともにその接着因子に対する分子標的治療は新規の卵巣癌治療となりうるものと考え、以下の実験(1-3)を立案、実行した。

(2) さらに E-Cadherin の発現抑制は癌浸潤のみならず、初期胎盤形成にも重要な役割を果たしていると考えられている。胎盤形成時は絨毛細胞の一部が分化して、母体子宮筋層のらせん動脈内に侵入することにより、胎盤循環が形成される。我々はこの絨毛細胞の浸潤にも Integrin の発現が重要な役割を果たしているのではと考え、以下の実験(4, 5)を立案実行した。

3. 研究の方法

(1) E-Cadherin の発現抑制によって変動する接着因子のスクリーニング

E-Cadherin が強発現している卵巣癌細胞株 RMUG-S に E-Cadherin siRNA (Ambion) を一過性に Transfection し、数種の接着因子 (Integrin, CD44) の発現をフローサイトメトリー法で検討した。

(2) 卵巣癌細胞株における E-Cadherin と Integrin $\alpha 5$ の相関関係を Western Blot 法で検討した。

(3) 免疫不全マウス Balb-c nu/nu に 1×10^6 個の SKOV3ip1 細胞を腹腔内投与を行うことにより、卵巣癌腹膜モデルを作成した。癌細胞接種後、1週間目より、ヒトキメラ化抗 Integrin $\alpha 5$ 抗体を週二回腹腔内投与し、その治療効果を5週目の時点で評価した。コントロールとして、免疫源性をもたないヒト IgG を使用した。

(4) 本人意思で人工妊娠中絶した患者検体より、同意を得た上で絨毛組織を採取し、これを初代培養した。その上で、低酸素刺激 (1% O₂, 48時間) をかけ、E-Cadherin および Integrin $\alpha 5$ の発現量の変化を検討した。

(5) 大阪府立母子医療センターが所有する帝王切開時に採取したヒト胎盤検体を用いて、子宮筋層に深く浸潤している絨毛細胞における E-cadherin と Integrin $\alpha 5$ の発現の相関関係を検討し、絨毛細胞が子宮に侵入するメカニズムを検討した。

4. 研究成果

(1) 我々はまず、卵巣癌をはじめとする上皮由来の発癌が、上皮細胞間の接着因子である E-Cadherin の発現消失によって始まることに着目した。E-Cadherin が強発現している卵巣癌細胞株 RMUG-S に E-Cadherin siRNA を一過性に Transfection し、数種の接着因子 (Integrin, CD44) の発現を検討したところ、図1に示すように、細胞外マトリックスの一つである Fibronectin の受容体である Integrin $\alpha 5$ の発現が特異的に増加し

ていることが判明した。

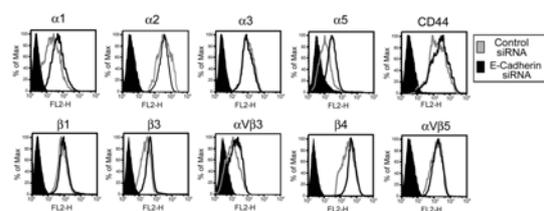


図1 フローサイトメトリー

(2) 次に、8種類の卵巣癌細胞株を用いて、E-Cadherin と Integrin $\alpha 5$ の発現を検討したところ、図2に示した通り、E-Cadherin が強発現している細胞株 (RMUG-S, OVCAR5, CaOV3) では Integrin $\alpha 5$ の発現が減弱しており、逆に Integrin $\alpha 5$ が強発現している細胞株 (SKOV3ip1, Hey, A2780, OVMZ6) では、E-Cadherin の発現がほぼ消失していることが判明した。さらに E-Cadherin が中等度発現している RMUG-L では、Integrin $\alpha 5$ も中等度の発現があり、以上より、E-Cadherin の発現消失に伴い Integrin $\alpha 5$ が発現していることを証明した。

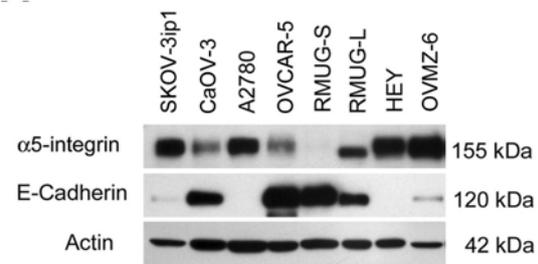


図2 卵巣癌細胞株における発現

卵巣癌は卵巣表面の一層からなる卵巣上皮から発生し、大網を始めとする腹腔内臓器へ播種していく。腹腔内臓器は Fibronectin を始めとする細胞外マトリックスで覆われていることより、癌化に伴い E-Cadherin を消失し離脱した卵巣癌細胞が播種病変を形成するべく、Fibronectin 受容体である Integrin $\alpha 5$ の発現を増強することは癌の進展に極めて合目的であるといえる。

(3) 続いて、ヌードマウスを用いて作成した卵巣癌腹膜播種モデルマウスに Integrin $\alpha 5$ の中和抗体を腹腔内投与したところ、卵巣癌播種病変および腹水の減少を認め、担癌マウスの生存が有意に延長した (図3)。



図3 腹膜播種モデルマウスの生存曲線

以上、我々は、卵巣癌腹膜播種には、E-cadherin の発現抑制によって誘導される Integrin $\alpha 5$ が重要な役割を果たしており、Integrin $\alpha 5$ の分子標的治療は卵巣癌腹膜播種の抑制に有用である可能性を証明した。従来の癌治療研究は薬剤の抗腫瘍効果に焦点が当たったものが殆どである。しかしながら、多くの抗腫瘍薬が正常組織に対しても毒性を有するため、使用量に限界があり、それが卵巣癌の予後改善への大きな障害になっている。一方で進行卵巣癌の臨床上的特色を考えた際に、本研究で示したような癌細胞の接着、進展を抑制する薬剤が開発されれば、その予後の改善に大きく寄与することが期待される。と同時に、その薬剤は従来の薬剤とは作用点が違うため、従来の抗腫瘍薬との併用及びそれに伴う相乗効果が期待できる。その意味で、我々の今回の研究成果は従来の先行研究とは一線を画するものであり、しかも将来への臨床応用を考えた際に極めて有望な分子標的治療となりうるものと考えている。

(4) 初代培養ヒト絨毛細胞に低酸素刺激を加えたところ、E-Cadherin の発現消失に伴い、Integrin $\alpha 5$ の発現が増強することが判明した。また、それに伴い、絨毛細胞の浸潤能が亢進することを絨毛細胞由来の Bewo 細胞を用いて証明した。さらにその浸潤能亢進は Integrin $\alpha 5$ の中和抗体で抑制された (図 4)。

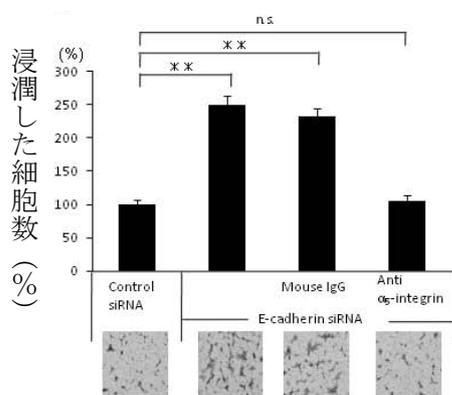


図 4 In vitro Invasion Assay

即ち、妊娠初期において、絨毛細胞が低酸素状態におかれた結果、E-Cadherin の発現消失に伴う Integrin $\alpha 5$ の発現増強がおり、子宮筋層に浸潤し、着床を形成することを証明した。

(5) 実際の胎盤臨床検体を用いて、子宮筋層に深く浸潤する絨毛細胞を Cytokeratin-7 で同定した。子宮筋層に深く浸潤する絨毛細胞では、E-cadherin の発現が低下しているのに対し、Integrin $\alpha 5$ の発現が増強し、さらにその下流シグナルである FAK がチロシン

リン酸化していることを解明した (図 5)。

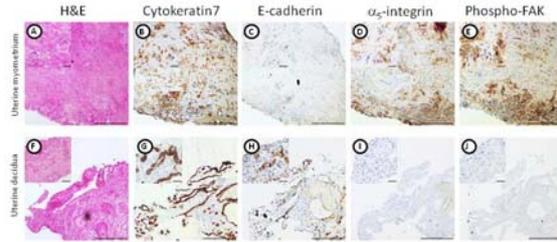


図 5 ヒト正常胎盤における発現

妊娠初期の胎盤形成は分化した絨毛細胞 (Extravillous Trophoblast) が子宮筋層に浸潤し胎盤循環を形成することより、開始する。今回、我々は絨毛細胞が着床初期に低酸素下におかれることに着目し、絨毛細胞が低酸素下で E-cadherin の発現減少に伴い Integrin $\alpha 5$ の発現を増強させ浸潤していくというメカニズムを証明した。妊娠高血圧腎症の胎盤では絨毛細胞の子宮筋層への浸潤が殆ど認められないことより、妊娠高血圧腎症の発症のメカニズムとして、この妊娠初期における絨毛細胞の浸潤能の獲得失敗が関与している可能性が示唆された。古来より、妊娠中毒症 (現在は妊娠高血圧腎症) は発症頻度は多く周産期予後に重大な影響を与えるもののその成因は未だ不明である。今回の我々の知見は妊娠高血圧腎症の発症原因に対する一つの可能性を示しており、このメカニズムを追求することにより、妊娠高血圧腎症の病因解明、強いては治療につながるものと考えている。

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)

すべて査読有

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Sawada, K. et al. In vitro and in vivo assays to analyze the contribution of Rho kinase in angiogenesis. *Method Enzymol* 439: 395-412, 2008.
- ② Sawada, K. et al. Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via $\alpha 5$ -integrin which is a therapeutic target. *Cancer Res* 68: 2329-2339, 2008.
- ③ Radjab, A.R. Sawada, K. et al. Thrombin induces tumor invasion through the induction and association of matrix metalloproteinase-9 and $\beta 1$ -integrin on the cell surface. *J Biol Chem* 283:2822-2834, 2008.

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① Sakata, M. Nishimoto, F. Minekawa, R. Okamoto, M. Sawada, K. et al. Metal transcriptional factor(MTF-1) is involved in hypoxic regulation of Placenta Growth Factor(PIGF) in Trophoblast cells. Endocrine Society 2008. San Francisco USA. June 16, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田健二郎 (SAWADA KENJIRO)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00452392

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし