

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 6 年 4 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20784

研究課題名（和文）TWSG1を標的とした卵巢癌新規治療の探索

研究課題名（英文）TWSG1, a BMP antagonist, could be a new therapeutic target in ovarian cancer.

研究代表者

福田 友彦（Fukuda, Tomohiko）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50805786

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：卵巢癌細胞株を用いて、TWSG1がBMP7による下流因子のSMAD1/5/8のリン酸化、ID1、SNAILのmRNA発現を共に抑制する事が示された。更に、スフェア形成アッセイ、細胞遊走アッセイに於いても、TWSG1はBMP7によるスフェア形成の亢進、細胞遊走の亢進に拮抗した。従って、TWSG1はBMP7アンタゴニストであり、腫瘍抑制遺伝子として機能する事が示唆された。子宮体癌臨床検体を用いた評価では、脈管侵襲を認める症例や、high gradeの症例でTWSG1のmRNAが有意に低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巢癌は早期に腹腔内播種を引き起こす事が知られており、様々な分子標的治療が登場した現在でも難治性の悪性腫瘍である。我々の過去の報告から、BMP経路は卵巢癌の腹腔内播種を亢進させる可能性が示唆される。本研究ではTWSG1がBMP7に拮抗する事で、卵巢癌の腹腔内播種を抑制する可能性が示された。詳細なTWSG1の発現制御メカニズムを同定出来れば、卵巢癌患者に於いて、TWSG1の発現亢進を引き起こす事で卵巢癌の腹腔内播種をコントロールし、予後の改善に繋がる可能性があり、有望な新規分子標的治療になる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：Using ovarian cancer cell lines, we showed that TWSG1 inhibited both SMAD1/5/8 phosphorylation and mRNA expression of ID1 and SNAIL by BMP7. Furthermore, TWSG1 antagonized BMP7-induced enhancement of sphere formation and cell migration in sphere formation and cell migration assays. Thus, TWSG1 is a BMP7 antagonist and functions as a tumor suppressor gene. In the evaluation of clinical uterine cancer specimens, TWSG1 mRNA levels were significantly decreased in patients with vascular invasion and high grade cases.

研究分野：婦人科癌

キーワード：TWSG1 BMP がん幹細胞 細胞遊走 EMT がん抑制遺伝子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

BMP (bone morphogenetic protein)は TGF- β ファミリーリガンドに属し、type1,2 受容体と複合体形成後、SMAD1/5/8 のリン酸化を誘導し、SMAD4 と共に核内移行し、ID family を始めとした様々な遺伝子の発現を制御する (背景)。我々は **BMP が卵巣癌と子宮体癌に於いて、c-KIT を誘導し腫瘍増殖を促進し、SNAIL/SLUG 等の EMT(epithelial-mesenchymal transition)転写因子を誘導し浸潤・転移能を亢進させる**事を報告した (背景, 論文 1-3)。また、**BMP は近年着床にも重要な働きをする事**が示唆されている (Nat Commun.2021)。

BMP シグナルは胚発生ではリガンドとアンタゴニストの拮抗により精緻に制御されているが、**卵巣癌進展に於けるリガンドとアンタゴニストの制御は不明である**。BMP アンタゴニストの内、GREM1 は乳癌や大腸癌進展への関与が (Breast Cancer Res.2019, Gastroenterology.2021)、SOSTDC1 は子宮内膜での発現が報告されている (Biol Reprod.2002)。

Human Protein Atlas によると、**BMP アンタゴニストの TWSG1 が卵巣,子宮内膜等の女性生殖器で豊富に発現している**。TWSG1 は胚軸形成に不可欠であるが、成体での機能は不明な点が多い。TWSG1 とがんの関係について、膠芽腫や甲状腺乳頭癌では TWSG1 が腫瘍促進的に働く事が報告されているが (Neuroreport.2021, J Cancer.2017)、我々は**子宮体癌細胞株に於いて、TWSG1 が BMP7 に拮抗し腫瘍抑制的に働く事**を報告し (論文 2)、がん種により異なる働きを持つ可能性が示唆される。この機序として、がん種により発現する BMP の種類や BMP の作用の相違が想定される。**卵巣癌は卵管または卵巣表層上皮から発生し、早期から腹腔内播種を起こすが、この過程で TGF- β ファミリーが誘導する EMT が重要な働きをする事が知られており、BMP が中心的役割を果たすと同時に BMP アンタゴニストの TWSG1 は卵巣癌腹膜播種を抑制する可能性がある**。

本研究の端緒は、BMP の卵巣癌に対する腫瘍促進効果は、我々を始めとする複数のグループが報告しているが (論文 1, Carcinogenesis.2007, J Ovarian Res.2009)、**BMP は TGF- β と比較して多くのアンタゴニストを持つにも関わらず、アンタゴニストの作用については未解明であり、Human Protein Atlas でアンタゴニストの TWSG1 が卵巣に比較的豊富な発現を認めた事である**。BMP 経路を標的とした治療戦略として、BMP 阻害剤の効果が卵巣癌に於いても我々を始めとした複数のグループから報告されている (論文 1, Cancer Lett.2015)。**BMP 阻害剤は BMP 受容体チロシンキナーゼ阻害剤であるが、受容体特異性が比較的低く、off-target 効果が否定出来ないために (PLoS One.2015)、効果の評価や生体投与時の副反応の問題があるため、直接拮抗作用を持つアンタゴニストの効果が期待される**。

また、TWSG1 が卵巣や子宮内膜等の女性生殖器で豊富に発現する事から、女性ホルモンによる制御の可能性が示唆されるが、既に子宮内膜に発現するアンタゴニストの SOSTDC1 がエストロゲンで正に制御される事が報告されており (Biol Reprod.2002)、TWSG1 も SOSTDC1 と同様の制御を受ける可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は**卵巣癌の腹腔内播種に於ける TWSG1 の働きを明らかにし、その制御機構を解明する事で、予後不良な卵巣癌患者の治療への応用を目指す**トランスレーショナルリサーチを行う。TWSG1 の生体での機能は不明点が多く、**卵巣癌に於ける報告は皆無であり、卵巣癌の新たな分子標的となりうる可能性を秘めている。**

3. 研究の方法

本研究では、**TWSG1 が卵巣癌に於いて腫瘍抑制効果を持つか、卵巣癌腹水中に BMP リガンドと TWSG1 が分泌されるかを明らかにするため、研究を遂行予定である。**
具体的に、

卵巣癌細胞株を用いて TWSG1 の機能解析を施行する。具体的には、増殖・浸潤・遊走能に与える影響を *in vitro* で各々、Sphere formation assay, Scratch assay, Invasion assay を用いて評価する。また、ヌードマウスに TWSG1 を強制発現またはノックアウトした卵巣癌細胞株と対照株を卵巣に同所移植し、腹腔内播種に与える影響を評価する。卵巣癌細胞株を用いて TWSG1 の機能解析を施行する。具体的には、増殖・浸潤・遊走能に与える影響を *in vitro* で各々、Sphere formation assay, Scratch assay, Invasion assay を用いて評価する。また、ヌードマウスに TWSG1 を強制発現またはノックアウトした卵巣癌細胞株と対照株を卵巣に同所移植し、腹腔内播種に与える影響を評価する。

卵巣癌臨床検体を使用し、腹水中の TWSG1, BMP リガンド分泌を、ELISA を用いて検出する。更に、腫瘍検体中の BMP シグナルの活性化を、リン酸化 SMAD1/5/8 の免疫染色と ID family や c-KIT, SNAIL/SLUG のリアルタイム PCR で評価し、TWSG1, BMP リガンド分泌との相関を計測し、予後との関連も明らかにする事で、TWSG1, BMP リガンドのバイオマーカーとしての有用性を検討する。

4. 研究成果

SKOV3, OVSAHO の2種類の卵巣癌細胞株を用いて TWSG1 の機能解析を施行した。まず、BMP7 による SMAD1/5/8 のリン酸化, ID1, SNAIL の mRNA 誘導を各々 WB 法, qRT-PCR を用いて確認し、TWSG1 が BMP7 に拮抗する事を確認した。次に、増殖・遊走能に与える影響を *in vitro* で各々、Sphere formation assay, Scratch assay, を用いて評価した。TWSG1 は BMP7 によるスフェア形成の亢進, 細胞遊走の亢進を各々阻害し、機能的にも BMP7 に拮抗する事が示された。ヌードマウスを用いた動物実験は期間内に施行出来なかった。

卵巣癌臨床検体と腹水については解析に十分な検体数を入手出来なかったため、子宮体癌臨床検体を用いた解析を施行した。TWSG1 の mRNA 発現を評価した所、子宮体癌では正常子宮内膜と比較し有意な発現低下を認めた。更に、脈管侵襲を認める症例と high grade な症例でも有意に TWSG1 の mRNA 発現が低下している事が判明し、子宮体癌に於いて TWSG1 が腫瘍抑制的に働く可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Eri、Fukuda Tomohiko	4. 巻 23
2. 論文標題 Multifaceted Functions of TWSG1: From Embryogenesis to Cancer Development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12755 ~ 12755
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms232112755	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 Fukuda Tomohiko、Suzuki Eri、Fukuda Risa	4. 巻 114
2. 論文標題 Bone morphogenetic protein signaling is a possible therapeutic target in gynecologic cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 722 ~ 729
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15682	査読の有無 無
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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------