

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11298

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌に発現する変異TrkBアイソフォームのシグナル解析

研究課題名(英文) Analysis of the signals induced by the variant isoforms of TrkB expressed on ovarian clear cell adenocarcinoma

研究代表者

後藤 優美子 (GOTO, Yumiko)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：50624574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌は、主に漿液性・類内膜・粘液性・明細胞線癌の4つの組織型があり、その中で明細胞腺癌(CCOC)は抗がん剤感受性が低く予後が悪い。また、CCOCは日本人に多いことも特徴である。我々は、卵巣に豊富に存在し、各種の癌で発現亢進が認められる神経栄養因子受容体TrkBに着目し、CCOCでTrkBが発現していること、特に進行例でチロシンキナーゼ(TK)を持つ完全長型TrkBアイソフォームが高頻度にみられることを明らかにした。TKドメインを持つ明細胞腺癌細胞株はTK阻害剤のK252a存在下でシスプラチンに対する感受性が亢進し、TKドメインの存在がCCOCの生存と関連する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣明細胞腺癌は、予後が悪く、日本人に多い卵巣癌であるが、その発症機構は明らかではない。本研究では、TrkBという神経の生存維持に関わる分子が卵巣明細胞腺癌に発現していること、また、その中でもチロシンキナーゼ部位を持つ完全長型TrkBアイソフォームの発現が悪性度の高いケースで高率にみられることを明らかにした。チロシンキナーゼ分子を阻害する薬剤の存在下で培養すると、この分子を持つ卵巣明細胞腺癌の細胞株は抗がん剤耐性が低下したことから、今後、完全長型TrkBアイソフォームをターゲットとするような治療法の開発の可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Ovarian epithelial adenocarcinoma is comprised of four major pathological types; serous, endometrioid, mucinous and clear cell ovarian cancer (CCOC). Of those types, CCOC is the most resistant to chemotherapy, and its prognosis is poor. In Japan, the incidence rate of CCOC is more than 20% of ovarian cancer. We focused on Tropomyosin-related kinase B receptor (TrkB) which is expressed abundantly in ovary and the overexpression has been reported in various cancer types. We confirmed that TrkB is expressed in CCOC and that the full length TrkB isoform, which has tyrosine kinase (TK) domain at intracellular region, highly expressed in progressive cases of CCOC. CCOC cell lines with TK domain upregulated the sensitivity to cisplatin if TK activity was inhibited by TK inhibitor K252a, suggesting the TK domain affects the survival of CCOC.

研究分野：産婦人科

キーワード：卵巣癌 卵巣明細胞腺癌 神経栄養因子受容体TrkB アイソフォーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 上皮性卵巣癌(以下、卵巣癌)は、漿液性腺癌、類内膜腺癌、粘液性腺癌、明細胞腺癌の4つの主な組織型に分類される。本邦では、明細胞腺癌が全卵巣癌の24%を占め、欧米諸国の約3倍に相当する。したがって、わが国において明細胞腺癌の早期診断と有効な治療が望まれる。

卵巣癌は自覚症状がないままに進行するため、進行期分布では約40-50%がⅢ期の進行癌である。明細胞腺癌は進行が緩徐であり約半数がⅠ期で診断されるが、抗癌剤耐性がある。現在、卵巣癌に対しては、術前または術後に標準化学療法であるパクリタキセル+カルボプラチンの2剤によるTC療法を施行する。2013年より、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)に対するモノクローナル抗体である分子標的薬ベバシズマブの使用も承認されるようになった。しかし、明細胞腺癌は抗癌剤耐性があり、予後が悪いことで知られる。

(2) 卵巣明細胞腺癌の発生母地はまだ明らかではないが、子宮内膜症とともに発生していることが多く、子宮内膜症に関連する卵巣癌では *ARID1A* や *PIK3CA* の変異が認められることがある。しかし、その分子機構は大部分が不明であり、治療戦略を立てる以前に、どのような分子機構が明細胞腺癌では重要なのかを明らかにする必要がある。

明細胞腺癌は増殖能は高くないが、生存能は高いことが予想される。そのため、明細胞腺癌において重要な癌遺伝子としては、cell cycle 関連分子ではなく不死化遺伝子が予想される。我々は、明細胞腺癌の発生メカニズムにおいてチロシンキナーゼ受容体である TrkB (Tropomyosin-related kinase B receptor) に着目した。

(3) TrkB は、神経組織において研究が始まり、神経細胞の生存・維持に特に重要な役割を果たすことが明らかとなった。その後、卵胞や子宮を含む生殖系正常組織においても、そのリガンドである BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) とともに発現していることが明らかになり、卵巣組織での重要性が指摘された。TrkB はまた、その生存維持関連シグナルに加え、近年、上皮間葉転換(EMT)との関連も報告された。これらの知見から、TrkB は明細胞腺癌を特徴づける分子の候補と成りうると考えられる。一方、*TrkB* 遺伝子は24エクソンから成る350kbp以上の大きな構造を持つ。主として3つのアイソフォームが知られており、“TrkB-TK”は細胞内にチロシンキナーゼ(TK)を持つ完全長型のアイソフォーム、“TrkB-T1”と“TrkB-Shc”は細胞内にTKを持たない dominant-negative アイソフォームである(図1)。そのため、TrkB シグナルは、単に細胞外ドメインの検出のみでは計測することが不可能であり、これらのアイソフォームを総合的に解析しなければ、TrkB シグナルの全体像は明らかにならない。

(4) 先行研究において、我々は卵巣癌のすべての組織型において TrkB タンパクの発現率が高いこと、卵巣癌に発現している TrkB の mRNA はすべて TK を持つこと、明細胞腺癌においては dominant-negative アイソフォームの構造が変化していること等を明らかにした。

2. 研究の目的

卵巣明細胞腺癌は日本人に多く、抗癌剤耐性のある悪性度の高い癌である。我々は、この癌に TrkB という不死化および上皮間葉転換に関連したチロシンキナーゼ受容体が高発現し、高頻度でバリエーションの変異が発現することを報告している。本研究では卵巣明細胞腺癌の抗癌剤耐性・浸潤等の悪性度と関連した性質と、TrkB 分子の構造変化との関連性について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学 (Immunohistochemistry, IHC): 卵巣明細胞腺癌 27 例について、手術検体組織を用いて TrkB タンパクの発現を分析した。抗体は、TrkB の細胞外を認識するモノクローナル抗体 (sc377218, Santa Cruz Biotechnology) と TrkB の細胞内にあるチロシンキナーゼ部位を認識するポリクローナル抗体 (ab18987, Abcam) を用いた。

(2) リアルタイム RT-PCR (Quantitative realtime PCR, qPCR): 卵巣明細胞腺癌 34 例の手術検体組織を用いて、発現している TrkB 分子の mRNA の構造を分析した。プライマーは、TrkB 分子の細胞外の BDNF 結合領域、細胞膜近傍の領域、細胞内の Shc 結合領域や TK 領域等の TrkB 分子の主要な領域を認識するように設計したプライマー (先行研究において確立済み) を用いた。さらに、臨床進行期との関連を分析した。

(3) 腫瘍細胞株を用いた in vitro 培養実験:

上記(2)と同様の方法で、明細胞腺癌細胞株 (KOC7C、OVSAYO、OVISE、ES2、OVTOKO、TOV21G、OVMANA、RMG、SMOV、HUOCAII、KK、HCH) に発現している TrkB の mRNA を解析した。

TrkB mRNA を発現している OVISE、ES2、TOV21G、RMG、HCH について抗がん剤シスプラチン及び Trk 阻害剤 k252a を添加し、細胞増殖の変化を分析した。

4. 研究成果

(1) 卵巣明細胞腺癌における TrkB タンパクの発現

TrkB 陽性細胞症例は全体の約 95% であり、細胞内チロシンキナーゼを持つ完全長型 TrkB 陽性細胞は約 70% であった (表 1)。

(2) 卵巣明細胞腺癌における TrkB mRNA の発現

全ての症例で TrkB mRNA の発現を認めた。アイソフォーム別の mRNA 発現率については、全ての症例が TrkB-Shc と TrkB-T1 を持ち、約 50% の症例が TrkB-TK を発現していた。死亡例、Grade3、臨床進行期 3/4 期の症例では、それぞれ 70-80% が TrkB-TK を発現していた。

(3) 卵巣明細胞腺癌細胞株における TrkB mRNA の発現と抗がん剤体制

全ての細胞株で TrkB mRNA の発現を認めた。特に ES2、RMG、SMOV で完全長型 TrkB-TK アイソフォームの発現量が多かった。

5 細胞株 (ES2、TOV21G、OVISE、RMG、HCH) の全ての細胞株はシスプラチン感受性を持つことが観察された。そのうち、TrkB-TK の発現量が多い ES2、RMG において K252a を添加することでシスプラチン感受性が増大した。

(4) まとめ

卵巣明細胞腺癌の進行例で完全長型 TrkB アイソフォームの発現が高率にみられることを明らかにした。今後、完全長型 TrkB アイソフォームをターゲットとするような治療の可能性が期待される。

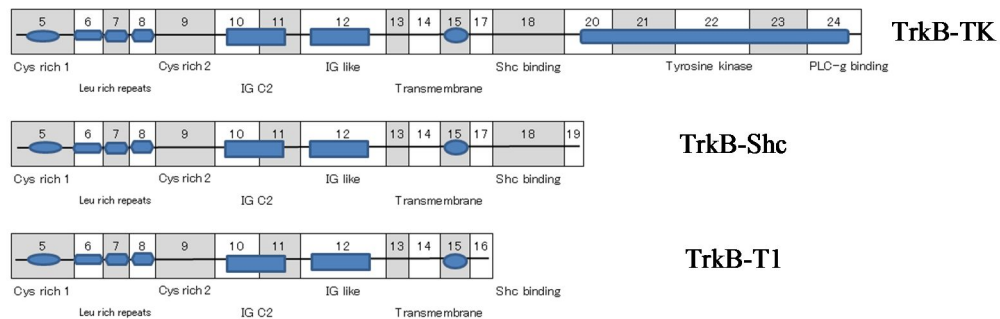


図1 TrkB アイソフォーム

表1 卵巣明細胞腺癌での TrkB タンパク陽性割合

陽性細胞割合 (%)	TrkB細胞外部位 陽性例 (%)	TrkBのTK部位 陽性例 (%)
0 ~ 9	4	33
10 ~ 19	4	4
20 ~ 29	8	13
30 ~ 39	4	13
40 ~ 49	8	0
50 ~ 59	8	4
60 ~ 69	32	17
70 ~ 79	12	17
80 ~ 89	16	0
90 ~ 100	4	0

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 大野裕介、亀谷美恵	4. 巻 3
2. 論文標題 妊娠免疫とステロイドホルモン	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 先進生命科学研究所紀要	6. 最初と最後の頁 8-12
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 -

1. 著者名 柏木寛史、亀谷美恵	4. 巻 2
2. 論文標題 妊娠時の免疫寛容機構を解析するモデル動物としてのコモンマーモセットの有用性について	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 先進生命科学研究所紀要	6. 最初と最後の頁 14-17
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 -

1. 著者名 Kametani Y, Yamada Y, Takabayashi S, Kato H, Ishiwata K, Watanabe N, Sasaki E, Habu S	4. 巻 12
2. 論文標題 The response of common marmoset immunity against cedar pollen extract	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience trends	6. 最初と最後の頁 94-101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5582/bst.2017.01219	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Atsuko Togo, Sachiko Hanawa, Kanako Mitsuzuka, Yumiko Goto, Yoshihiro Nishijima, Masaru Hayashi, Kannno Yasuhira, Masaki Miyazawa, Mariko Miyazawa, Hitoshi Ishimoto
2. 発表標題 Silencing of the Human Mitochondria-Localized Glutamic Acid-Rich Protein (MGARP) Gene Induces Apoptosis in a Cell Line Model for Human Fetal Adrenal
3. 学会等名 Society for reproductive investigation 66th annual scientific meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 亀谷美恵、石本人士、徳田裕、伊藤亮治、真鍋良幸
2. 発表標題 PD-1抗体副作用の抑制を目的とした妊娠関連プロテアーゼインヒビターを模倣する修飾ペプチド化合物の開発
3. 学会等名 第4回橋渡し研究戦略的推進プログラムシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kondo Akane, Nakaoku Daichi, Yamasaki Mikio, Goto Yumiko, Takahashi Kazumi, Morine Mikio, Hinokio Kenji, Maeda Kazuhisa
2. 発表標題 Expression of TrkB isoforms in FGR and non-FGR
3. 学会等名 日本産科婦人科学会第70回学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Ohno, Mika Kojima, Rihito Kinami, Shun-ichiro Izumi, Ryoji Ito, Mamoru Ito, Yoshie Kametani
2. 発表標題 Pregnant humanized mouse as a model of human pregnant immunity
3. 学会等名 第46回日本免疫学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大野裕介、小島美香、木南理仁、和泉俊一郎、伊藤亮治、伊藤守、亀谷美恵
2. 発表標題 ヒト妊娠モデルとしての妊娠ヒト化マウス作製
3. 学会等名 第32回日本下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 灰田祐子、近藤朱音、中奥大地、山崎幹雄、森根幹生、檜尾健二、前田和都寿、高橋千果、和泉俊一郎、亀谷美恵
2. 発表標題 胎児発育不全(FGR)および胎児異常(non FGR)の胎盤組織におけるTrkBアイソフォーム発現の比較解析
3. 学会等名 第32回日本下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2017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	亀谷 美恵 (KAMETANI Yoshie) (50338787)	東海大学・医学部・准教授 (32644)	
研究分担者	石本 人士 (ISHIMOTO Hitoshi) (10212937)	東海大学・医学部・教授 (32644)	