

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591848

研究課題名（和文）非造腫瘍性ヒト正常卵巣表層上皮不死化細胞株を用いた上皮性卵巣がん関連遺伝子の同定

研究課題名（英文） Identification of genes associated with genesis of epithelial ovarian cancer using non-tumorigenic immortalized ovarian epithelial cell lines.

研究代表者

高野 浩邦（TAKANO HIROKUNI）

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：18591848

研究成果の概要：

卵巣癌発生に関与する遺伝子の検索のため、正常卵巣上皮不死化細胞株(IOSEC)を6株樹立した。正常卵巣上皮(OSE)、封入嚢腫(IC)、樹立した IOSEC を用いて、種々の抗原マーカーの発現を免疫組織学的に検討し、ICはMenchymal to Epithelial Transition(MET)過程にあることが示唆された。さらに IOSEC とその primary culture(PC)細胞間で発現が異なる遺伝子を包括的ヒトゲノム発現解析によりスクリーニングし、卵巣癌発生に関する遺伝子を104種類に絞り込んだ。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

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、封入嚢腫、MET、ゲノム発現解析、不死化細胞

1. 研究開始当初の背景

上皮性卵巣癌の発生・進展に関与すると考えられている(候補)癌遺伝子として *C-MYC*、*EGFR*、*FGF-3*、*HGFR*、*HER-2/neu*、*ILGFRI*、*K-RAS*、*PIK3CA*、*AKT2*、*EEF1A2*などが報告されている。最近、我々も子宮内胎児発育と癌化のメカニズムが類似している点に注目し、反復流産既往卵巣が癌患者で第9染色体に逆位のある末梢リンパ球を用いポジショナルクローニングにより切断点にケラチノサイト増殖因子(*KGF*)遺伝子が存在していることを見出した。さらに卵巣癌手術検体で *KGF* 遺伝子と

KGFR 遺伝子の高頻度の過剰発現を見いだした(Yasuhara T et al. FGF7-like gene associated with a pericentric inversion of chromosome 9, and FGF-7 plays a significant role in the development of ovarian cancer. Int J Oncology, 2004.)。現在、癌の分子標的治療薬の共通したターゲットは主に *KGFR* などの増殖因子であるが、今後はさらに多くの候補癌遺伝子が、cDNA マイクロアレイ解析などにより効率よく見いだされていかれることが予想される。卵巣癌の分子標的治療薬開発のためにも、これらの候

補遺伝子が真に上皮性卵巣癌の発生・進展に関与する癌遺伝子であるか、絞り込む必要性がある。

2. 研究の目的

(1) ヒト正常卵巣表層上皮細胞株由来のヒト卵巣表層上皮不死化細胞株の樹立を試みる。

(2) 正常卵巣上皮(OSE)、封入嚢腫(IC)、樹立した IOSEC を用いて、上皮性卵巣癌の前癌病変と推定される IC が MET 過程にあるか免疫組織学的に検討する。

(3) IOSEC とその primary culture(PC)細胞間で発現が異なる遺伝子を包括的ヒトゲノム発現解析によりスクリーニングする。

3. 研究の方法

(1) ヒト正常卵巣表層上皮細胞株由来のヒト卵巣表層上皮不死化細胞株の樹立

インフォームドコンセントを得て OSE をスクレイピング法で培養液に移し、SV40TA_g, E6/E7/hTERT 遺伝子を導入して、不死化細胞株を樹立した。細胞株における免疫細胞学的検討、染色体核型解析、ヌードマウスを用いた腫瘍原性の検討を行った。

(2) 正常卵巣上皮(OSE)、封入嚢腫(IC)、樹立した IOSEC を用いた免疫組織学的検討

インフォームド・コンセントの下に採取した子宮体癌手術症例 9 例の OSE(n=10)、正常卵管上皮(n=4)、IC(n=92)、および SV40 TAg で不死化した IOSEC(n=3)の形質を検索するために抗原マーカー(calretinin, podoplanin, D2-40, thrombomodulin, HBME-1, vimentin, EMA, WT1, CA125, MOC31, TAG-72, Ber-EP4 and E-cadherin)の発現を免疫染色法で検討した。

(Table I, II, Figure 1, 2)

Table I.

Histological subtypes of the inclusion cysts

	No. of cysts
Columnar / ciliated type [Endosalpingeal type]	29
Mixed epithelial type	15
Cuboidal / flat type	48
Endometrioid type	0
Mucinous type	0
Transitional cell type	0

Table II.

Antibodies and conditions for Immunohistochemical analysis

antibodies	clone	source	mouse IgG	dilution for IHC ⁺	AR ⁺ procedure	specificity
Calretinin	E11-E3	Zymed	mouse IgG	Ready-to-Use	MWO ⁺	mesothel
Podoplanin	18H5	Abcam	mouse IgG	1 : 200	MWO ⁺	mesothel
D2-40	D2-40	Nichirei	mouse IgG	Ready-to-Use	MWO ⁺	mesothel
Thrombomodulin	1009	DAKO	mouse IgG	1 : 100	NR [±]	mesothel
HBME-1	HBME1	DAKO	mouse IgG	1 : 500	NR [±]	both
vimentin		Nevecastra	mouse IgG	1 : 50	MWO ⁺	both
EMA	E29	DAKO	mouse IgG	1 : 200	NR [±]	both
Wilm's tumor 1 (WT1) protein	6F-H2	DAKO	mouse IgG	1 : 500	Protase	both
CA125		Turner	mouse IgG	1 : 40	NR [±]	both
Epithelial related antigen	MOC31	DAKO	mouse IgG	1 : 50	MWO ⁺	epithelium
TAG-72	B72.3	Bio Genex	mouse IgG	1 : 50	MWO ⁺	epithelium
Epithelial antigen, Ber-EP4	Ber-EP4	DAKO	mouse IgG	1 : 100	Protase	epithelium
e-Cadherin		Nevecastra	mouse IgG	1 : 50	MWO ⁺	epithelium

⁺ IHC: immunohistochemistry, ^{AR}: antigen retrieval, ^{MWO}: microwave oven, ^{NR}: not required

Figure 1.

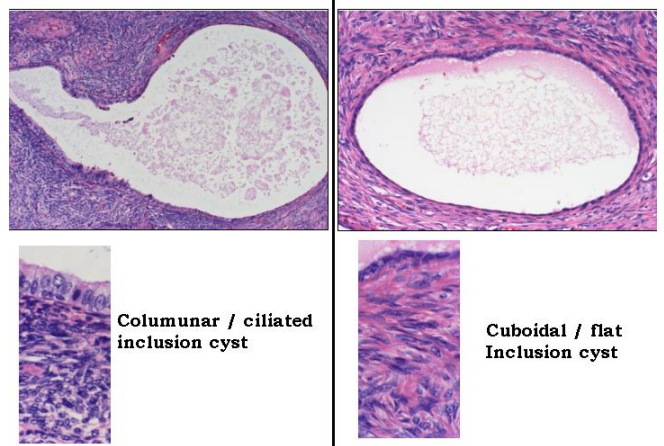
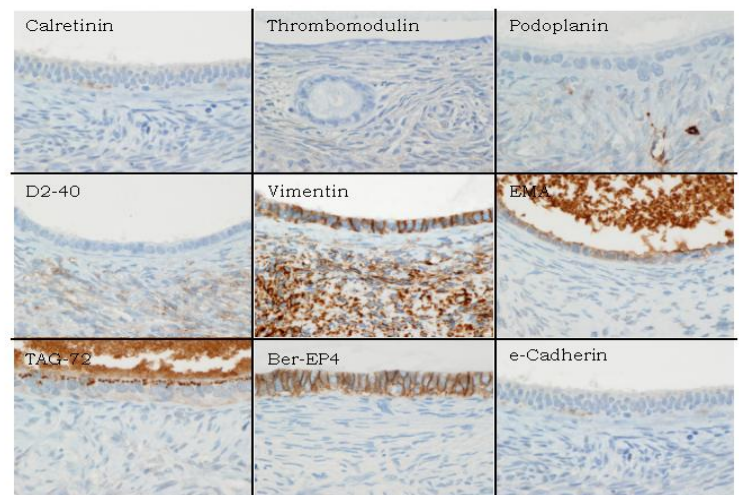


Figure 2.



(3) IOSEC とその primary culture(PC)細胞間で発現が異なる遺伝子を包括的ヒトゲノム発現解析

SV40 TAG で不死化する前の PC と IOSEC から total RNA を抽出し、約 33,000 遺伝子の発現プロファイリングを行った。

4. 研究成果

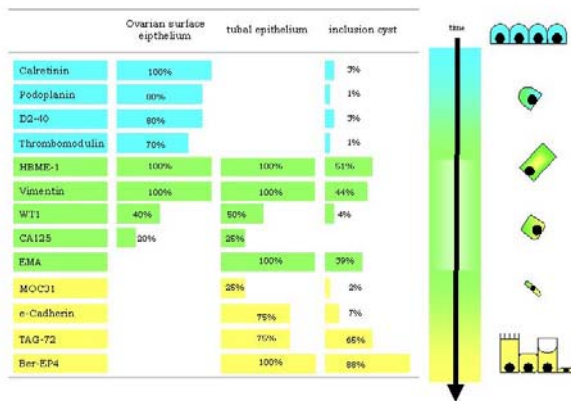
(1) ヒト正常卵巣表層上皮細胞株由来のヒト卵巣表層上皮不死化細胞株の樹立

SV40TAG で不死化した細胞株 3 株およびその 3 株にさらに E6/E7/hTERT 遺伝子を導入し不死化した細胞株 3 株を樹立した。6 株ともヌードマウスを用いた腫瘍原性の検討で、腫瘍原性は認められなかった。

(2) 正常卵巣上皮(OSE)、封入嚢腫(IC)、樹立した IOSEC を用いた免疫組織学的検討

1) 種々の抗原発現より OSE は中皮細胞の性格を示し、IC は中皮細胞の性格を失いつつ、単層円柱上皮細胞の性格を獲得しつつある染色結果となった。2) 同様に IOSEC においても IC に類似した染色結果が得られた。(Figure 3)

Figure 3.



(3) 包括的ヒトゲノム発現解析

PC と IOSEC 間で有意差をもって発現に差が認められた遺伝子は 104 種類であった

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 3 件)

- ① Okamoto S, Okamoto A, Nikaido T, Saito M, Takao M, Yanaihara N, Takakura S, Ochiai K, Tanaka T. Mesenchymal to epithelial transition in the human ovarian surface epithelium focusing on inclusion cysts.

Oncol Rep 21: 1209-1214, 2009 査読有り

- ② Omi H, Okamoto A, Nikaido A, Urashima M, Kawaguchi R, Umehara N, Sugiura K, Tanaka T. Establishment of an immortalized human extravillous trophoblast cell line by retroviral infection of E6/E7/hTERT and its transcriptional profile during hypoxia and reoxygenation. Int Mol Med. 23: 229-36, 2009. 査読有り

- ③ Takao M, Okamoto A, Nikaido T, Urashima M, Takakura S, Saito M, Saito M, Okamoto S, Takikawa O, Sasaki H, Yasuda M, Ochiai K, Tanaka T. Increased synthesis of indoleamine-2,3-dioxygenase protein is positively associated with impaired survival in patients with serous-type, but not with other types of, ovarian cancer. 査読有り

Oncol Rep. 17:1333-9, 2007.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 岡本愛光, 矢内原臨, 高倉聡, 高尾美穂, 尾見裕子, 柳田聡, 田部宏, 山田恭輔, 新美茂樹, 佐々木寛, 安田允, 落合和徳, 田中忠夫 Mapping 25K Array-GISTIC 解析法を用いた卵巣癌におけるコピー数異常領域の検討第 7 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会 名古屋 7 月 2008 年

- ② 岡本愛光, 浦島充佳, 二階堂孝, 高尾美穂, 齊藤美里, 高倉聡, 矢内原臨, 山田恭輔, 高野浩邦, 磯西成治, 安田允, 落合和徳, 田中忠夫第アレイ解析 臨床応用を目指して 漿液性卵巣癌における包括的ヒトゲノム発現解析による Paclitaxel (PTX) 耐性関連遺伝子のスクリーニングとその臨床応用 18 回日本サイトメトリー学会学術集会 東京 6 月 2008 年

- ③ Omi H, Okamoto A, Nikaido T, Saito M, Umehara N, Kawaguchi R, Ikeya M, Sugiura K, Kiyono T, Tanaka T. Establishment of an immortalized human extravillous trophoblast cell line by retroviral infection of HPV E6/E7 and hTERT. International College of Surgeons, XVIIth Joint Congress of Asia & Pacific Federations & 53rd Annual Congress of the Japan Section, Kyoto, June 2007.

- ④ Takao M, Okamoto A, Nikaido T, Urashima M, Takakura S, Misato S,

Okamoto S, Yanaihara N, , Ochiai K,
Tanaka T.Examination of IDO
Expression in ovarian cancer.
International College of Surgeons,
XVIIth Joint Congress of Asia & Pacific
Federations & 53rd Annual Congress of
the Japan Section, Kyoto, June 2007.

- ⑤ Okamoto A, Nikaido T, Urashima M,
Takao M, Omi H, Okamoto S,
Yanaihara N, Takakura S, Ochiai K,
Tanaka T. Molecular approach for
individualized therapy in ovarian
cancer. International College of
Surgeons, XVIIth Joint Congress of
Asia & Pacific Federations & 53rd
Annual Congress of the Japan
Section (Invited) Kyoto, June 2007.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 浩邦 (TAKANO HIROKUNI)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：50226809

(2) 研究分担者

山田 恭輔 (YAMADA KYOSUKE)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：30230452

高倉 聡 (TAKAKURA SATOSHI)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：60256401

岡本 愛光 (OKAMOTO AIKOU)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20204026

落合 和徳 (OCHIAI KAZUNORI)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：20152514

(3) 連携研究者