

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591918
 研究課題名（和文）BMP アンタゴニストを用いた癌間相互作用の制御による癌治療戦略の検討
 研究課題名（英文） Regulation of cancer-stromal interaction with BMP antagonists;
 Basic investigation on strategy for gynecological cancer therapy.
 研究代表者 首藤 聡子（SATOKO SUDO）
 北海道大学・北海道大学病院・助教
 研究者番号 10399892

研究成果の概要：

Bone morphogenetic protein (BMP)アンタゴニストである PRDC (Protein related to DAN and cerberus)の腫瘍増殖促進効果を検証することを目的として本研究を行った。

子宮体癌組織を用いた RT-PCR において PRDC の発現レベルがコントロールに比し高い傾向にあった。また *in situ* hybridization で PRDC は間質でより発現レベルが高い傾向が認められた。婦人科腫瘍細胞株（子宮体癌・卵巣癌）を用いた実験では、PRDC 転写産物の発現を RT-PCR を用いて確認した。

婦人科腫瘍細胞株の細胞増殖に対する BMP 関連タンパクの増殖抑制効果は認められなかった。また、各種婦人科細胞株に対する si-RNA を行ったが、細胞増殖に対する変化は認められなかった。リコンビナント PRDC 添加により細胞増殖が促進される傾向が認められたが、コントロールに比べ有意差がなく、追加検討を施行中である。

子宮体癌の初代培養細胞に対する PRDC をはじめとする BMP 関連タンパクの細胞増殖に及ぼす効果は認められなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
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・産婦人科学

キーワード：PRDC, BMP, 癌-間質相互作用, 子宮体癌, 子宮頸癌, 卵巣癌

1. 研究開始当初の背景

癌の浸潤・転移といった癌特有の悪性形質

の発現には、癌細胞とそれを取り囲む宿主間質細胞とその相互作用、すなわち癌-間質相

相互作用が重要な役割を果たしている。このような癌細胞を取り巻く微小環境 (microenvironment) の分子機構について、多様な観点から解析がすすめられている。

Bone morphogenetic protein (BMP) は生物の形態形成や卵胞形成に関与するタンパクである。一方これを制御する BMP アンタゴニストが存在し、両者の時間的あるいは量的な発現バランスが胎生期の発達や組織分化を制御している。このことから BMP や BMP アンタゴニストの発現が癌細胞の微小環境を癌増殖に有利なように変化させている可能性が想定され、ごく最近、*gremlin* と呼ばれる BMP アンタゴニストの発現が様々な癌腫で上昇していることが報告されている。基底細胞癌においては間質細胞に発現し、BMP ファミリーである BMP4 により惹起される癌細胞増殖抑制効果に拮抗して腫瘍増殖を促進することが報告されている。

2. 研究の目的

PRDC (Protein related to DAN and cerberus) は cystine knot 構造をもつ分泌タンパクであり、BMP アンタゴニスト、とりわけ *gremlin* と高いアミノ酸配列の相同性を示す。申請者らは、世界で初めてリコンビナント human PRDC を作成し、PRDC が BMP アンタゴニスト活性を示すこと、マウスにおいて卵巣、脳、脾臓など様々な組織で発現していることを明らかにしてきた。PRDC は *gremlin* に比べより広範な組織分布と高い発現レベル、およびより強力な BMP アンタゴニスト作用を示すことより、PRDC が *gremlin* と同様、あるいはより強力な腫瘍増殖促進効果を有する可能性がある。

Sneddon らは *gremlin* の発現レベルがさまざまな組織由来の癌において上昇し、基底細胞癌においては間質細胞に発現し、BMP4 により惹起される癌細胞増殖抑制効果に拮抗し腫瘍増殖を促進することを報告した。

本研究ではこれらの予備実験の結果に基づき、婦人科癌における PRDC 転写産物発現レベルを解析し、癌の組織型および進行度との関連を解明すること、さらに腫瘍組織における発現パターンを *in situ* hybridization で解明、リコンビナント PRDC を用い BMP により誘導される腫瘍細胞増殖抑制効果が PRDC により拮抗されるかを確認することを目的とした。

3. 研究の方法

下記のごとく研究計画をたて、順次研究を行った。

(1) 婦人科腫瘍検体における PRDC 転写産物の発現解析

(2) 腫瘍細胞株における PRDC 転写産物の発現解析

① 婦人科腫瘍細胞株 (卵巣癌: OVA-1, OCL-1-N、子宮体癌: JHUEM, HOUA-I) を用いた PRDC および BMP の転写産物発現レベルに関する解析

② 婦人科腫瘍細胞株の細胞増殖に対するリコンビナント PRDC およびリコンビナント BMP の影響に関する解析

③ 腫瘍細胞株における PRDC ノックダウンの癌細胞増殖抑制効果に関する検討

④ 腫瘍細胞株における PRDC ノックダウンの癌細胞遊走能、浸潤能抑制効果に関する検討

(3) 婦人科腫瘍検体における PRDC の腫瘍細胞増殖作用の検討

① 婦人科腫瘍の細胞増殖に対するリコンビナント PRDC およびリコンビナント BMP の影響に関する解析

4. 研究成果

(1) 婦人科腫瘍検体における PRDC 転写産物の発現解析

子宮体癌組織を用いた RT-PCR において PRDC の発現レベルがコントロールに比し高い傾向にあることが示された。さらに、臨床進行期別では、1期・2期に比べ3期・4期で発現レベルが高い傾向にあった。組織型別では、類内膜腺癌に比較して予後不良であることが知られている漿液性腺癌・未分化癌で発現が高かった。なお、PRDC により作用が拮抗されることが知られている BMP7 は microarray を用いた解析により、腫瘍組織の分化度により発現レベルに有意差があることが示された。

また、*in situ* hybridization を用い子宮体癌組織における PRDC 発現の局在解析を行ったところ、間質でのシグナルが腫瘍に比べ高い傾向にあった。現在、症例数を増やし、再現性を確認中である。

(2) 腫瘍細胞株における PRDC 転写産物の

発現解析

- ① 婦人科腫瘍細胞株を用いた PRDC および BMP の転写産物発現レベルに関する解析

PRDC 転写産物の発現を RT-PCR を用いて確認した。また、BMP4・BMP7 の発現レベルは低かった。

- ② 婦人科腫瘍細胞株の細胞増殖に対するリコンビナント PRDC およびリコンビナント BMP の影響に関する解析

婦人科腫瘍細胞株の細胞増殖に対する BMP 関連タンパク (PRDC・Gremlin・BMP4・BMP7) の増殖抑制効果を MTT アッセイ、XTT アッセイなどを用いて検討したが、コントロールと比べ有意差を認めなかった。

しかしながら、リコンビナント PRDC 添加において細胞増殖が促進される傾向を認めたため、追加検討を施行中である。

- ③ 腫瘍細胞株における PRDC ノックダウンの癌細胞増殖抑制効果に関する検討

各種婦人科細胞株に対する si-RNA を行ったが、細胞増殖に対する変化はコントロールに比べ認められなかった。

- ④ 腫瘍細胞株における PRDC ノックダウンの癌細胞遊走能、浸潤能抑制効果に関する検討

in vitro cell invasion assay を試みたが、マトリゲルを用いた実験系の確立に苦慮し、かつ実験(2)・③、細胞増殖に差を認めなかったため、本実験は凍結中である。

- (3) 婦人科腫瘍検体における PRDC の腫瘍細胞増殖作用の検討

- ① 婦人科腫瘍の細胞増殖に対するリコンビナント PRDC およびリコンビナント BMP の影響に関する解析

子宮体癌の初代培養細胞に対するリコンビナント BMP4 および PRDC の細胞増殖に及ぼす効果であるが、症例数が少ないためか、細胞数・MTT アッセイにおいて一定の傾向を示さなかった。得られた組織の *viability* や子宮体癌の組織型・分化度により、傾向に差が生じる可能性があり、現在、症例数を蓄積して解

析を継続中である。

- (4) 研究計画にあげた項目で期間内の実験開始が不可能であったもの

- ① 抗がん剤治療による腫瘍細胞の PRDC あるいは BMP 反応性の修飾に関する検討

- ② 婦人科腫瘍の細胞増殖に対する PRDC ノックダウンの影響に関する検討

- (5) 実験結果総括

従来の主たる制癌戦略は、それが外科的な治療であれ化学療法や放射線治療であれ、癌細胞の除去あるいは細胞死 (total cell kill) を目指したものである。しかしながら進行癌では一過的な腫瘍の縮小がみられたとしてもすべての癌細胞を除去することは困難であり、これらの治療が残存する癌細胞の悪性形質を抑制することはできず、やがて近傍の組織や遠隔組織に浸潤・転移した残存癌細胞の再発を招く。これに対し、癌-間質相互作用の制御を用いる癌治療は、癌を除去するのではなく抑制し、“dormant”な癌に至らしめる治療戦略であり、従来の制癌法の難点を克服する可能性がある。今回われわれは、子宮体癌細胞がみずから PRDC を産生すること、さらに癌-間質相互作用により癌細胞周囲の間質から PRDC が産生される可能性が高いことを本実験から証明しつつある。しかしながら、PRDC の癌細胞増殖に対する効果あるいは、PRDC ノックダウン細胞の細胞増殖・浸潤に対する効果に関しては残念ながら研究期間内には有意な結果を得るに至らなかった。

われわれは、主に子宮体癌の手術検体を中心に発現解析を行ったが、今後は他の婦人科癌(卵巣癌・子宮頸癌)における PRDC 発現レベルの解析を続けるとともに、PRDC の癌-間質相互作用における役割について継続して検討したいと考えている。

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)

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）
近日中に地方会にて発表予定。

〔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

首藤 聡子

北海道大学病院・婦人科・助教

10399892

(2) 研究分担者

櫻木 範明

北海道大学・大学院医学研究科・教授

70153963

(3) 連携研究者

なし