

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591941

研究課題名（和文） 卵巣癌における Paclitaxel 耐性獲得に関わる分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms for chemoresistance to Paclitaxel in ovarian cancer

研究代表者

杉山 徹 (SUGIYAMA TORU)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：40162903

研究成果の概要：卵巣癌における Paclitaxel 感受性に関する type III β -tubulin (TUBB3) の過剰発現の影響と、その転写制御機構を解析した。転写制御に関しては、転写因子 REST の関与とそれに纏わるエピジェネティックな制御機構、遺伝子の構造異常について解析した。また、卵巣癌原発巣における TUBB3 の発現と臨床病理学的事項との相関も検討した。さらに、卵巣癌以外の悪性腫瘍についても解析を行った。卵巣癌において TUBB3 の過剰発現は、進行度や転移などの予後不良マーカーと有意に相関した。TUBB3 の過剰発現は、REST 結合領域の RE-1 配列近傍のメチル化状態とヒストン蛋白のアセチル化状態に依存していた。TUBB3 過剰発現卵巣癌培養細胞株では Paclitaxel に対する感受性が低下していた。REST 遺伝子はいずれの細胞株でも安定的に発現しており、構造異常も認められず、TUBB3 の発現に関して直接的関与は認めなかった。REST inducible clone による dominant negative clone では、REST は MeCP2 ならびに Sim3 等の巨大な epigenetic regulator body を形成し、TUBB3 の発現を細胞周期依存性に制御している可能性が示唆された。卵巣癌における TUBB3 の異常発現は、その発現制御因子である転写因子 REST の結合領域に生じるエピジェネティックな機構の破綻による可能性が示唆された。悪性黒色腫では、TUBB3 過剰発現株では卵巣癌と同様に Paclitaxel に対して抵抗性を持つものの、予後は逆に良好であった。このことは TUBB3 の過剰発現は腫瘍によって異なる生物学的特性を付与すると考えられた。卵巣癌の Paclitaxel を用いた治療において、TUBB3 の免疫組織学的解析は重要な情報である。さらに、Paclitaxel を主体とした化学療法施行に際して、エピジェネティックな腫瘍環境を考慮する必要があると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2008年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 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・産婦人科学

キーワード：Paclitaxel, TUBB3, 卵巣癌, 悪性黒色腫, エピジェネティクス

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

Paclitaxel とシスプラチンの併用療法 (TJ療法) は、卵巣癌の標準療法として広く認知されてきた。しかし、類内膜癌・漿液性癌では 70%程度の初回奏功率を示すものの、粘液性癌・明細胞癌では 50%程度であり、組織型による、薬剤感受性の違いが存在することが想定されている。近年、卵巣癌を含めた各種ヒト悪性腫瘍で、type III β -tubulin (TUBB3) の過剰発現が生じており、Paclitaxel の薬剤耐性機構の獲得に重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。

一方、TUBB3 は別名 neuronal tubulin と呼ばれ、そのプロモーター領域には RE-1 領域と呼ばれる転写因子 REST (RE-1 silencing factor) の結合領域が存在する。REST は ES 細胞の神経系細胞への分化に伴って消失する因子としてクローニングされた分子である。この分子は、エピジェネティック関連蛋白質の足場として働き、非神経細胞において神経特異的遺伝子の発現を抑制している。また、*in vitro* において REST 遺伝子を knockdown した細胞のフォーカス形成能が見られること、また結腸がん細胞株 DLD1 においてフレームシフト変異が生じていることから癌抑制遺伝子である可能性が示唆されていた。

REST は神経系以外の細胞では普遍的に発現し、神経系遺伝子群の発現を抑制しており、この機構が破綻すると TUBB3 が過剰発現する可能性がある。

我々はエピジェネティックマスター遺伝子 REST の不活化は、TUBB3 の発現誘導を引き起こし、薬剤耐性機構の形成に関与している、との仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

本研究の当所目的は、卵巣癌においてがん抑制遺伝子 REST の異常を解析し、REST の不活化が TUBB3 の発現誘導を介して、Paclitaxel 耐性の獲得に重要な役割を果すことを明らかにする事であった。

3. 研究の方法

本研究は、3 段階の構成で展開された。STEP1 では卵巣癌培養細胞株を用いて REST 遺伝子の変異・発現を解析した。STEP2 では、Tet-ON システム (テトラサイクリン誘導系) を用いた薬剤耐性機構の解析を行った。STEP3 は、ヒト卵巣癌の原発巣を用いた免疫染色を行った。

STEP1 は、REST ならびに TUBB3 遺伝子を卵巣癌培養細胞株 12 株について、プロモーター領域およびアミノ酸翻訳領域配列の sequence ならびに発現解析をした。定量 PCR 法により、REST/TUBB3 mRNA の発現レベルについて検討した。発現レベルの低下が確認された場合、REST 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を bisulfite genome sequence 法、脱メチル化剤 (5-Aza-dC) 処理による発現解析 (mRNA/タンパク質) により検討した。Western blot 法によりタンパク質レベルで REST, TUBB3 発現を検討した。

STEP2 は、大腸結腸がん細胞株 DLD1 において見つかったフレームシフト変異を使い、REST の作用をドミナントネガティブとして抑制する inducible クローンを作製した。作製にあたってはインビトロジェン社製の Tet-ON system を使用した。さらにこの系を用いて、Paclitaxel 耐性の機構における TUBB3 の関与を検討した。

STEP3 は、卵巣癌を含めた他の悪性腫瘍における TUBB3 の発現解析と Paclitaxel 感受性に関する解析を行った。

4. 研究成果

(1) 卵巣癌培養細胞株における TUBB3 の発現とプロモーター領域の解析 (発表論文 7)。

卵巣癌培養細胞株における TUBB3 の発現は、約半数の培養細胞株で過剰発現が見られた。逆に発現の低下していた細胞株では、RE-1 配列周囲の DNA メチル化状態が hypermethylation を示すものと、低メチル化でも histone 蛋白質のアセチル化状態が亢進している株があった。

DNA メチル化の亢進している細胞株では、脱メチル化剤 (5-Aza-dC) による処理で TUBB3 の発現が回復する株と、しない株があった。TUBB3 の発現の回復しない細胞株では、ヒストン蛋白質の hyperacetylation が生じていた。

TUBB3 の発現状態と Paclitaxel 感受性の間には、有意の相関が見られた。REST 遺伝子自体には変異は生じておらず、REST 遺伝子の発現と TUBB3 の発現の間には相関は認められなかった。

(2) 卵巣癌原発巣における TUBB3 の発現 (発表論文 7)

卵巣癌原発巣 49 例について TUBB3 の発現を解析した。TUBB3 の発現は約半数の症例で認められ、過剰発現は有意に進行度癌や転移例で多く認められ、生存解析でも予後不良例

で過剰発現していた。

(3) 卵巣癌原発巣におけるメチル化解析 (発表論文7)

卵巣癌原発巣において、TUBB3の発現状態とプロモーター領域のDNAメチル化状態と比較したが、有意の相関は認められなかった。

(4) REST inducible clone における腫瘍生物学解析 (発表論文2)

RESTの発現および遺伝子変異を認めなかったため、dominant negative型のREST inducible clone を作製し、解析を行った。REST inducible clone では細胞の増殖能に影響を与えた。RESTは細胞周期依存性の発現を呈しており、induceではG2 arrestを引き起こすことが明らかとなった。

(5) 悪性黒色腫におけるTUBB3の発現とPaclitaxel感受性との関連(発表論文3)

悪性黒色腫におけるTUBB3の発現は、2割の培養細胞株および原発巣で減弱していた。卵巣癌の原基となる胚中皮細胞がTUBB3陰性であるのに対して、悪性黒色腫ではその発生母地はmelanocyteである。Melanocyteはneural crest由来でありTUBB3陽性である。TUBB3陽性の悪性黒色腫はPaclitaxelに対して抵抗性を示した。悪性黒色腫では卵巣癌と異なり大多数の症例でPaclitaxel抵抗性であることを裏付ける所見であった。一方、TUBB3の発現低下の認められた細胞株はPaclitaxel感受性であり、siRNA knockdownによるTUBB3の発現低下は悪性黒色腫におけるPaclitaxel感受性を増強させた。

Paclitaxelに対する感受性は腫瘍の組織型によって異なっており、それは腫瘍の発生母地の特性によるものと考えられた。

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10件)

1. Tada T, Maesawa C, Oikawa H, Tatemichi Y, Shibazaki M, Kanno S, Muraoka S, Miyamoto A, Nishida J, Shimamura T, Sugiyama T, Wakabayashi G, Masuda T. Interaction between NACC1, a BTB/POZ family member, and histone deacetylase 6 is involved in microtubule acetylation in tumor cells. *J Biol Chem*, in press.

2. Shibazaki M, Akasaka K, Maesawa C, Mori N, Masuda T. Cell cycle-dependent regulation of class III β -tubulin by NRSF/REST in non-neuronal cells and its involvement in cell growth, *Oncogen*, in press.
3. Akasaka K, Maesawa C, Shibazaki M, Maeda F, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T. Loss of class III beta-tubulin induced by histone deacetylation is associated with chemosensitivity to paclitaxel in malignant melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2009;**129**:1516-26.
4. Sugiyama T. [Second-line treatment using novel chemotherapeutic and biologic agents]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2009;**36**:730-5.
5. Hayashi R, Nakai K, Fukushima A, Itoh M, Sugiyama T. Development and significance of a fetal electrocardiogram recorded by signal-averaged high-amplification electrocardiography. *Int Heart J* 2009;**50**:161-71.
6. Sugiyama T, Kumagai S, Hatayama S. [Treatments of epithelial ovarian cancer by histologic subtype]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2009;**36**:187-92.
7. Izutsu N, Maesawa C, Shibazaki M, Oikawa H, Shoji T, Sugiyama T, Masuda T. Epigenetic modification is involved in aberrant expression of class III beta-tubulin, TUBB3, in ovarian cancer cells. *Int J Oncol* 2008;**32**:1227-35.
8. Sugiyama T, Konishi I. Emerging drugs for ovarian cancer. *Expert Opin Emerg Drugs* 2008;**13**:523-36.
9. Sugiyama T, Kou T. [Classification and treatment of ovarian cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2008;**35**:228-32.
10. Sugiyama T, Yoshizaki A, Hatayama S. [Ovarian cancer treatment from the standpoint of the gynecologic oncologist]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2007;**34**:1011-6.

[学会発表] (計3件)

1. Akasaka K, Maesawa C, Sakurai E, Masuda T. Loss of TUBB3 induced by histone deacetylation is associated with chemosensitivity to Paclitaxel in melanoma cells. 第67回日本癌学会総会 ; 2007 ; 名古屋.

2. Izutsu N, Maesawa C, Sugiyama T, Masuda T. Epigenetic modification is involved in aberrant expression of TUBB3 in ovarian cancer cells. 第67回日本癌学会総会；2007；名古屋.
3. 井筒直子, 阿保亜紀子, 前沢千早, 増田友之. 卵巣癌におけるβIII-tubulin過剰発現に関わるエピジェネティックな制御機構. 第97回日本病理学会総会；2008；金沢.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 徹 (SUGIYMA TORU)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：40162903

(2) 研究分担者

前沢 千早 (MAESAWA CHIHAYA)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：10326647

(3) 連携研究者

熊谷 晴介 (KUMAGAI SEISUKE)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：10326647