

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790249
 研究課題名（和文） 婦人科癌における分泌型 Frizzled 関連遺伝子の発現とエピジェネティックな制御
 研究課題名（英文） The expression and epigenetic regulation of secreted Frizzled related genes in gynecological malignancies.
 研究代表者 赤平 純一（AKAHIRA JUNICHI）
 東北大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：90359505

研究成果の概要：

分泌型 Frizzled 関連遺伝子を含む多数の遺伝子について、卵巣癌におけるメチル化の有無を検討し、多数遺伝子のメチル化の有無（CIMP）および臨床病理学的な意義について検討した。検索した15遺伝子のうち卵巣癌では平均2.95個の遺伝子が高度にメチル化されており、CIMP陽性率ともども正常卵巣に比較して有意に高値であった。上記のような研究により卵巣癌においてメチル化により抑制されている新たな癌抑制遺伝子を同定しておくことで、将来個別の難治性卵巣癌に対する治療として臨床へフィードバックできる可能性があるものと考えている。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,000,000 | 0 | 2,000,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 390,000 | 3,690,000 |

研究分野：婦人科腫瘍学

科研費の分科・細目：人体病理

キーワード：婦人科癌、分泌型 Frizzled 関連遺伝子、メチル化

1. 研究開始当初の背景

分泌型 Frizzled 関連遺伝子：Wnt シグナル伝達経路は線虫、ショウジョウバエなどからヒトにいたるまで進化上広く保存されており、発生、形態形成などさまざまな生命現象に重要な役割を果たしている。特に、近年、 β カテニンを介した canonical 経路（左図）が癌をはじめとしたいろいろな疾病の発症に深く関わっていることが明らかになって

おり、Wnt シグナルにかかわる数十種類の分子がどのようにシグナルの伝達およびその制御に関わっているか、多彩な生命現象においてどのような役割を担っているのか、疾病発生における意義は何かなどが次々と報告され注目を集めている。Wnt シグナルの活性化により、 β カテニンを介した標的遺伝子の転写活性化が引き起こされる。例えば癌化に重要な標的遺伝子としては、サイクリン

D1 や癌遺伝子 Myc などが知られている。分泌型 Wnt インヒビターとして Secreted Frizzled-related protein (SFRP), Wnt-inhibitory factor (WIF), Dickkopf (Dkk) のように、Wnt に直接結合して機能を阻害する分泌型インヒビターの働きが知られており、これらのインヒビターの働きが何らかの原因で抑制されることで、Wnt シグナルの活性化が引き起こされる。

最近、大腸癌において、SFRP 遺伝子がメチル化により広範に不活化されており、Wnt シグナルが活性化されていることが報告された (Nat Genet 2004)。またその他の癌においても SFRP, WIF などの遺伝子がメチル化により不活化され、Wnt シグナルの活性化を引き起こしていることが報告されてきている (Oncogene 2006 など)。婦人科癌においては、子宮体癌で高頻度に β カテニンの核内移行および Wnt シグナルの活性化が認められ、また卵巣癌においても特に類内膜型の腺癌において β カテニンの核内移行がみられるとされている (Oncogene 2002, Hum Pathol 2006 など)。しかしながら、分泌型 Wnt インヒビターについてはいずれの婦人科癌においてもほとんど報告が認められず、Wnt シグナルの細胞外因子による制御についてはこれまでほとんど検討されていない状況にあった。

現在我々の施設では、多数の婦人科癌細胞株、臨床検体を保有しており、また患者の予後データを含めた臨床データを多数保有している。また我々はこれまでに DNA メチル化についての研究成果も豊富に有しており、特に細胞周期関連遺伝子である 14-3-3 sigma (Clin Cancer Res 2004)、cyclin D2 (Cancer Sci in press)、アポトーシス関連遺伝子である TMS1 (Cancer Sci 2004) などについての婦人科癌における DNA メチル化を含む詳細な検討を行って論文報告している。そこで、このような背景から婦人科癌における Wnt シグナルの制御機構の全容解明およびその臨床的な意義について解明するという発想に至った。

2. 研究の目的

現在までに、婦人科癌における Wnt シグナルについての研究は一貫性に乏しく、その意義については未だ明確にはなっていない。そのため、まずは β カテニンの細胞内局在の異常の有無について、癌細胞株を用いて検討する。その後、 β カテニンの局在に異常が見られた細

胞および見られない細胞のそれぞれについて、分泌型 Frizzled 関連遺伝子、蛋白 (SFRP1~5, WIF, Dkk) の発現について検討を加える。さらに、遺伝子の発現が DNA プロモータ領域の CpG island メチル化と関係があるかどうかについて、メチル化特異的 PCR (MSP) および bisulfite sequencing 法により検討する。ここで必要であればさらにルシフェラーゼ活性の検討により、メチル化の発現に対する直接的関係について検討する。またこれまでの報告では、これら遺伝子の発現には遺伝子突然変異の影響は少ないとされているが、突然変異についても検索をする予定である。

3. 研究の方法

婦人科癌における分泌型 Frizzled 関連遺伝子・蛋白の発現およびその制御機構~婦人科癌 (子宮体癌および卵巣癌) における以下の検討により、分泌型 Frizzled 関連蛋白・遺伝子の発現の状態およびその制御メカニズムについて検討する。

以下の検討には子宮体癌細胞株 15 株、卵巣癌細胞株 15 株、卵巣表層上皮由来細胞株 2 株、同意を得て採取された子宮体癌組織 200 例 (凍結保存およびパラフィン包埋保存切片)、正常子宮内膜および内膜増殖症各 15 例、卵巣癌組織 200 例、正常卵巣~境界悪性卵巣腫瘍組織各 20 例程度の検体を使用する予定である。これらの細胞株、臨床検体については我々の研究室で管理しており、いつでも使用可能な状況である。また臨床検体については予後を含めたその詳細なデータを保有しており、予後因子についての迅速な解析が可能である。

婦人科癌細胞株における β カテニン蛋白の局在の検討婦人科癌細胞株において、Wnt シグナルの活性化がみられるかどうかについて、検討する。具体的には蛍光免疫染色法を用いて、多数の癌細胞株における β カテニン蛋白の核内移行の有無について核染色および β カテニン蛋白に対する抗体を用いた二重染色により検討する。

婦人科癌細胞株における活性型 β カテニン蛋白の有無についての検討上記①と同時に、婦人科癌細胞株において、Wnt シグナルの活性化の有無について、活性型 β カテニン蛋白に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを施行し検討をする。

癌細胞株における分泌型 Frizzled 関連遺伝子のメチル化の解析上記において異常が認められた細胞株を中

心に、分泌型 Frizzled 関連遺伝子 DNA (SFRP1~5, WIF, Dkk) の CpG island のメチル化の有無について、DNA を抽出後、bisulfite により処理をし、Methylation specific PCR 法、Bisulfite sequencing 法により検討を行う。またヒストンアセチル化の状態について、抗ヒストン抗体を用いて Chromatin immunoprecipitation(ChIP) 法により検討する。

癌細胞株における分泌型 Frizzled 関連遺伝子の遺伝子突然変異の解析さらに上記遺伝子の遺伝子突然変異の有無について、PCR-SSCP 法などにより解析を加える

癌細胞株における分泌型 Frizzled 関連遺伝子、蛋白の発現の解析細胞株における上記遺伝子、蛋白の発現について検討する。具体的には細胞株より RNA, 蛋白を抽出し、遺伝子発現については Reverse transcription 後に Light cycler を用いた Real-time PCR 法により、定量的に mRNA の発現を検討する。また蛋白発現については、蛋白抽出後、ウエスタンブロッティング法により半定量的に蛋白の発現を検討する。定量的 RT-PCR の結果と DNA メチル化の有無について、統計学的に関連があるかどうかを検討する。また蛋白発現については、RT-PCR の結果および DNA メチル化の有無と関連があるかどうかを統計学的に検討する。上記③において、DNA メチル化がみられた細胞株については、脱メチル化剤である 5azaC およびヒストンアセチル化阻害剤である Trichostatin A (TSA)により処理を行い、mRNA の発現の回復について検討を加える。

婦人科癌組織における分泌型 Frizzled 関連遺伝子の DNA メチル化および遺伝子発現の検討婦人科癌凍結切片より DNA を抽出し、上記と同様に分泌型 Frizzled 関連遺伝子の DNA メチル化について検討する。また RNA 抽出後、Reverse transcription を施行し、Real-time PCR 法により mRNA の発現について検討する。定量的 RT-PCR の結果と DNA メチル化の有無の関連について、統計学的検討を加える。

婦人科癌組織における分泌型 Frizzled 関連蛋白の発現と臨床病理学的因子の関連についての検討癌組織を用いて、分泌型 Frizzled 関連蛋白の発現を、免疫組織学的に検討する。

同時に、 β カテニンの発現の有無および局在の異常についても検討し、比較検討する。蛋白の発現について、予後を含めた臨床データと比較し、予後および臨床病理学的因子との関連について考察する。さらに正常～前癌病変（子宮内膜増殖症あるいは卵巣境界悪性腫瘍）についても蛋白発現を検討し、その発現形式から癌の発生・進展におけるこれら遺伝子の働き、癌抑制遺伝子としての働きについて考察を加える。

平成 20 年度以降～分泌型 Frizzled 関連遺伝子の機能解析～上記で得られた **新知見をさらに発展させ、遺伝子の機能解析を行う**。具体的には、メチル化により抑制されている遺伝子が婦人科癌細胞株において癌抑制遺伝子としての働きを有しているか、またこれら遺伝子の抑制により発現が誘導される遺伝子について網羅的に検索を加える。

遺伝子強制発現が癌細胞株の増殖に与える影響に関する検討上記の検討により明らかになった癌細胞においてメチル化あるいは遺伝子変異により抑制されている遺伝子について、発現のみられない細胞株に遺伝子導入により強制的に発現させ、細胞増殖の抑制がみられるか否かについて検討する。

遺伝子ノックダウンが癌細胞株の増殖に与える影響に関する検討上記の遺伝子が発現している細胞に対して、RNAi により遺伝子をノックダウンし、細胞増殖の亢進がみられるか否かについて検討する。

遺伝子ノックダウンにより発現が誘導される遺伝子の網羅的検索さらに、遺伝子をノックダウンした際に発現が誘導される遺伝子を、4 万以上の遺伝子を含むマイクロアレイにより解析し、これら遺伝子のメチル化による発現抑制がどういった遺伝子の発現あるいは抑制を介して癌抑制遺伝子としての働きを有しているかを網羅的に解析し、これらの遺伝子の詳細について検討を行う。

4. 研究成果

平成 19 年度は主として分泌型 Frizzled 関連遺伝子を含む多数の遺伝子について、卵巣癌におけるメチル化の有無を検討し、多数遺伝子のメチル化の有無 (CIMP) および臨床病理学的な意義について検討した。

対象は卵巣癌凍結標本 64 例および正常卵巣

凍結標本 6 例である。対象となる遺伝子としては、14-3-3sigma(σ), TMS1, cyclinD2, RIZ1, p16, DAPK, RASSF1A, WIF1, RAR β 2, SFRPs (SFRP1, 2, 5), CHFR, BMP2とし、これら遺伝子のメチル化の有無をmethylation specific PCR (MSP)法により検討し、臨床病理学的因子との関連について検討を行った。

15遺伝子のうち、メチル化陽性遺伝子数は正常卵巣で1.5個、卵巣癌で2.95個であった ($p < 0.05$)。また3個以上の遺伝子がメチル化されている症例をCIMP陽性とする正常卵巣で12.5%、卵巣癌で51.6%がCIMP陽性であった ($p < 0.05$)。CIMPの有無は組織型、進行期および術後残存腫瘍と有意な相関が認められたが、予後との関連は明らかではなかった。

CIMPについての検討から、卵巣癌のメチル化についてはランダムに起こっているのではなく、組織型や進行期などによりメチル化されやすい腫瘍群が存在することが示唆された。

平成19年度に得られた卵巣癌における分泌型Frizzled関連遺伝子を含む多数遺伝子のメチル化の情報を元に、平成20年度には我々はエストロゲンレセプター β (ER β)に注目した。卵巣癌においては、ER α やPRの発現がみられるものの、ホルモン療法の奏効率率は低く、ホルモン不応性のメカニズムを探るため、ER β のメチル化、発現について詳細を検討した。対象は卵巣癌細胞株15株、正常卵巣表層上皮細胞 (OSE) 8株および卵巣癌組織55例、正常卵巣組織6例である。Real-time RT-PCRを用いてOK, ON, ER β 1, β 2(β cx)、 β 3、 β 4、 β 5のmRNA発現レベルを検討し、組織型等の臨床病理学的因子との関連について検討した。またメチル化の解析はBisulfite sequenceを用いて検討した。

卵巣癌細胞株では、OSEに比較してON、ER β 1、ER β 2の発現が有意に低下していた ($p < 0.01$)。対照的に、ER β 5の発現はOSEに比較して有意に発現レベルの増加が認められた ($p < 0.01$)。さらに、ON、ERb1、ERb2の発現は癌細胞株、癌組織いずれにおいてもON領域プロモータ領域のメチル化頻度およびメチル化の領域と密接に関連していた。OSEにおいては、メチル化は検出されなかった。

卵巣癌においてはER β isoformのうち特に β 1、 β 2がexonONと共に有意に抑制されており、卵巣癌の発癌・進展に関わっている可能性が示唆された。

近年、脱メチル化剤による治療が臨床応用されようとしているが、上記のような研究により卵巣癌においてメチル化により抑制されている新たな癌抑制遺伝子を同定してお

くことで、将来個別の難治性卵巣癌に対する治療として臨床へフィードバックできる可能性があるものと考えている。

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・査読有] (計 13 件)

1: Tokunaga H, Takebayashi Y, Utsunomiya H,

Akahira J, et al. Clinicopathological significance of circadian rhythm-related gene expression levels in patients with epithelial ovarian cancer. Acta Obstet Gynecol Scand. 2008;87(10):1060-1070.

2: Niikawa H, Suzuki T, Miki Y, Suzuki S, Nagasaki S, **Akahira J**, et al. Intratumoral estrogens and estrogen receptors in human non-small cell lung carcinoma. Clin Cancer Res. 2008 Jul 15;14(14):4417-4426.

3: Suzuki T, Miki Y, **Akahira J**, et al. Aromatase in human breast carcinoma as a key regulator of intratumoral sex steroid concentrations. Endocr J. 2008;55:455-463.

4: Shibuya R, Suzuki T, Miki Y, Yoshida K, Moriya T, Ono K, **Akahira J**, et al. Intratumoral concentration of sex steroids and expression of sex steroid-producing enzymes in ductal carcinoma in situ of human breast. Endocr Relat Cancer. 2008 Mar;15(1):113-124.

5: Dohi O, Hatori M, Suzuki T, Ono K, Hosaka M, **Akahira J**, et al. Sex steroid receptors expression and hormone-induced cell proliferation in human osteosarcoma. Cancer Sci. 2008 Mar;99(3):518-523.

6: **Akahira J**, Suzuki F, Suzuki T, et al. Decreased expression of RIZ1 and its clinicopathological significance in epithelial ovarian carcinoma: correlation with epigenetic inactivation by aberrant DNA methylation. Pathol Int. 2007 Nov;57(11):725-733.

7: Suzuki T, Miki Y, Moriya T, **Akahira J**, et al. In situ production of sex steroids in human breast carcinoma. Med Mol Morphol. 2007 Sep;40(3):121-127.

8: Suzuki T, Inoue A, Miki Y, Moriya T, **Akahira J**, et al. Early growth responsive gene 3 in human breast carcinoma: a regulator of estrogen-mediated invasion and a potent prognostic factor. Endocr Relat Cancer. 2007 Jun;14(2):279-292.

9: Ota K, Ito K, **Akahira J**, et al. Expression of organic cation transporter SLC22A16 in human epithelial ovarian cancer: a possible role of the adriamycin importer. Int J Gynecol Pathol. 2007 Jul;26(3):334-340.

10: Tokunaga H, **Akahira J**, Suzuki T, et al. Ovarian epithelial carcinoma with estrogen-producing stroma. Pathol Int. 2007 May;57(5):285-290.

11: Nagase S, Mikami Y, Moriya T, Niikura H, Yoshinaga K, Takano T, Ito K, **Akahira J**, et al. Vaginal tumors with histologic and immunocytochemical feature of gastrointestinal stromal tumor: two cases and review of the literature. Int J Gynecol Cancer. 2007 Jul-Aug;17(4):928-933.

12: Suzuki T, Urano T, Miki Y, Moriya T, **Akahira J**, et al. Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. Cancer Sci. 2007 May;98(5):644-651.

13: **Akahira J**, Tokunaga H, Toyoshima M, et al. Prognoses and prognostic factors of carcinosarcoma, endometrial stromal sarcoma and uterine leiomyosarcoma: a comparison with uterine endometrial adenocarcinoma. Oncology. 2006;71(5-6):333-340.

[学会発表] (計 2 件)

1. 赤平 純一、三木康宏、八重樫伸生、笹野公伸
Tissue concentration of sex steroid hormones and its clinicopathological significance in epithelial ovarian cancer.

2008/10/28 日本癌学会 (名古屋)

2. 赤平 純一、鈴木史彦、三木康宏、八重樫伸生、笹野公伸
Analysis of CpG island methylator phenotype in human epithelial ovarian cancer.

2007/10/3 日本癌学会 (横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤平 純一 (AKAHIRA JUNICHI)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 90359505

(2) 研究協力者

鈴木 史彦 (SUZUKI FUMIHIKO)
東北大学・大学院医学系研究科・大学院生
研究者番号: なし