

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791160

研究課題名（和文）卵巣癌腹膜播種機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of ovarian cancer metastasis

研究代表者

吉田 裕之（YOSHIDA HIROYUKI）

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20423890

研究成果の概要：Tight Junction 関連蛋白質の一つである claudin-4 が卵巣癌の転移形成にどのように関与しているかを検討した。その結果 claudin-4 は卵巣癌の進展に関与しており、それには E-cadherin が関連している可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	240,000	2,140,000

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：婦人科腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣癌は早期において特徴的な症状に乏しく、また効果的なスクリーニング法も確立していない。それゆえに早期発見が困難な疾患であり、半数以上の症例で、病変がすでに骨盤腔外に進展した進行癌として発見される。化学療法の進歩により改善傾向がみられるものの、5年生存率は臨床進行期 期で20～30%、期で5～10%に留まっており、進行卵巣

癌患者の予後は未だに不良である。卵巣癌の転移形式で最も頻度が高いのは腹膜播種転移であり、それは卵巣の解剖学的な位置も関係していると考えられる。それゆえに、卵巣癌の予後改善には腹膜播種の制御が重要であり、そのメカニズムの解明および制御法の確立が強く望まれるところである。

(2) 癌細胞の原発巣からの離脱、転移巣への接着に大きく関与しているのが、細

胞間接着因子である。腹膜転移における細胞間接着因子の関連については、これまでに多くの報告がある。例えば原発巣からの癌細胞遊離はE-cadherinの発現低下によって、細胞間接着が減弱することが一因と考えられ、また、遊離した癌細胞はintegrinなどの接着因子を発現し、それによって腹膜に接着するものと報告されている。しかし、卵巣癌の腹膜播種における接着因子の働きは、これまでに十分解明されているとは言えない。特にTight Junction (TJ)を形成するTJ関連蛋白質の卵巣癌腹膜播種における働きは、これまでほとんど検討されていないのが現状である。

2. 研究の目的

ClaudinはTJ関連蛋白質の一つであり、TJ形成に主要な役割を有している。Claudinはこれまで20種以上が同定されており、それぞれのclaudinが特有の組織発現パターンを示すことが明らかになっている。また、claudinはさまざまな腫瘍において増加もしくは減少していることが、これまでに報告されている。たとえばclaudin-1は乳癌において、またclaudin-4は膵臓癌において発現が減少していることが報告されている。腫瘍細胞におけるclaudin発現の減少は、腫瘍細胞が細胞間接着から遊離され、転移してゆく要因のひとつと考えられている。一方、卵巣癌においては逆にclaudin-3やclaudin-4の発現が増加しており、また卵巣癌細胞の浸潤能や生存・増殖を促進することが報告されている。しかしながら、claudinが卵巣癌の転移形成にどのように関与しているかは、まだほとんど解明されていない。そこで本研究ではTJ関連因子であるclaudinが、卵巣癌の転移形成にどのように関与しているかを明らかにし、その臨床的応用について

検討した。

3. 研究の方法

(1) 卵巣癌臨床検体におけるclaudin発現の検討

臨床進行期 期以上の卵巣癌摘出組織を用い、腫瘍原発巣および腹膜播種巣におけるclaudinの発現を免疫組織学的に検討する。抗ヒトclaudin-4抗体を用いてホルマリン固定した卵巣癌標本に免疫染色を行う。その後、染色発現強度をスコアリングし、原発巣および腹膜播種巣での発現の相違を調べる。

(2) 卵巣癌細胞株におけるclaudin発現の抑制

2種類の卵巣癌細胞株(OVCAR3, RMG-1)のclaudin-4発現をsmall interfering RNA (siRNA)にて抑制した。その抑制効果はWestern blottingにて確認した。

(3) Migration assayによるclaudin発現抑制とその転移能への影響の検討

卵巣癌細胞にsiRNAをtransfectionしてclaudin-4発現を抑制し、48時間後にmigration chamberに撒き、その2時間後にmigrating cellをカウントした。

(4) 卵巣癌臨床検体におけるclaudinとE-cadherinの発現の相関

卵巣癌摘出組織におけるclaudin-4とE-cadherinの発現を免疫組織学的に調べ、両者の発現に相関があるかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) 免疫染色にて卵巣癌組織におけるclaudin-4の発現を調べ、その発現強度を原発巣と腹膜播種巣とで比較した。両者で明らかな発現強度の差は認めなかった。(図1)

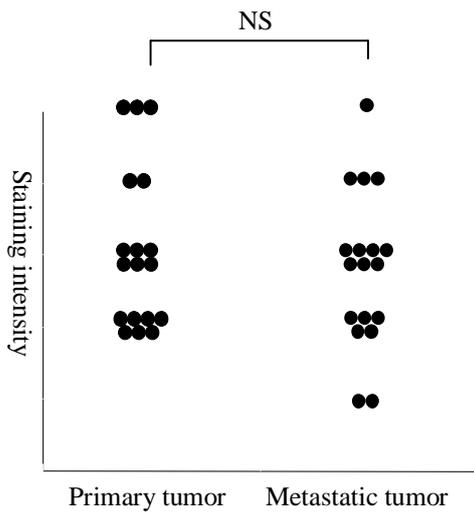


図 1 卵巣癌組織における claudin-4 の発現

(2) siRNA を用いて卵巣癌細胞株 (OVCAR3 と RMG-1) の claudin-4 発現を抑制した。siRNA transfection 後 48 時間の claudin-4 蛋白の発現をウェスタンブロッティングにて調べたところ、Negative control siRNA を transfection しても claudin-4 の発現は維持されたが、claudin-4 に対する siRNA を transfection した場合、その発現が抑制された(図 2)。

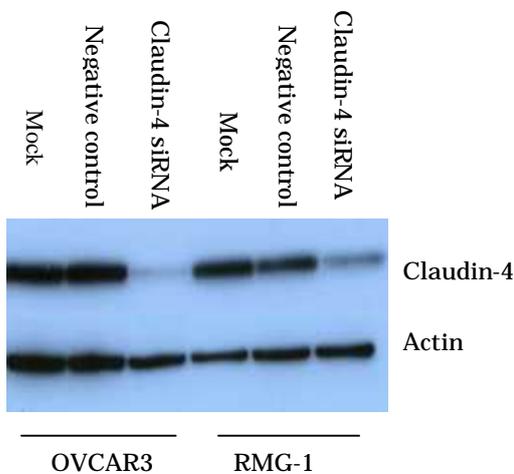


図 2 siRNA による claudin-4 発現抑制

(3) 卵巣癌細胞に siRNA を transfection して claudin-4 発現を抑制し、Migration assay を行った。その結果、siRNA を transfection して claudin-4 を抑制した細胞では、コントロールと比較して有意にその遊走能が亢進した(図 3)。

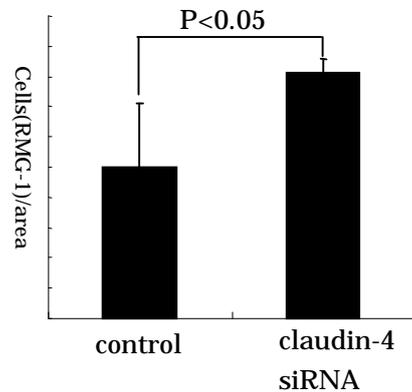
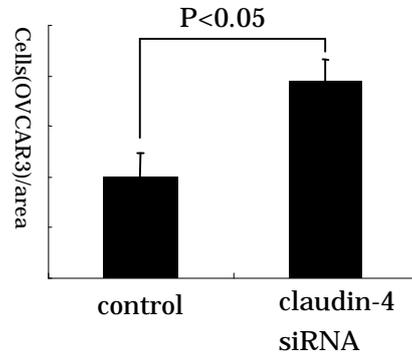


図 3 Migration assay

(4) 卵巣癌摘出組織における claudin-4 と E-cadherin の発現を免疫組織学的に調べ、両者の発現に相関があるかどうかを検討したところ、両者には有意な正の相関がみられた。

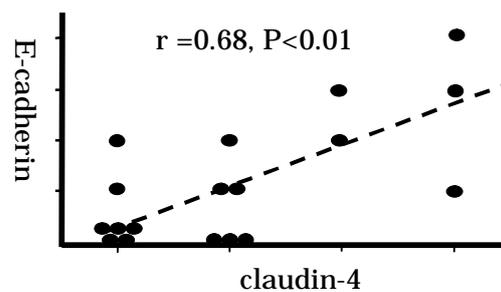


図 4 claudin-4 と E-cadherin の相関

(5) 癌化の初期過程においては TJ の機能が抑制され、その結果上皮細胞間の接着や極性が失われると考えられる。今回 claudin-4 抑制により卵巣癌細胞の遊走能が亢進したことは、この考えを支持する結果ではあった。しかしながら、claudin-4 は卵巣癌転移を促進するという報告もあり、claudin-4 が卵巣癌の転移形成にどのように関与しているかについて、その mechanism は未だ controversial で、今後さらなる検討が必要と考える。さらに今回の検討においては claudin-4 と E-cadherin の発現に何らかの関与が示唆されたが、臨床検体の n 数は十分ではなく、claudin-4 と E-cadherin の関係についてはさらなる詳細な検討が必要であると考えられた。

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)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 裕之 (YOSHIDA HIROYUKI)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号 : 20423890

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし