

機関番号：15501
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591949
 研究課題名（和文）腫瘍抑制性セルピンであるマスピンの子宮頸癌の進展制御機構に関する研究
 研究課題名（英文）Study for a tumor suppressive serpin, maspin in cervical cancer
 研究代表者
 縄田 修吾（NAWATA SHUGO）
 山口大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：60294625

研究成果の概要(和文)：腫瘍抑制性セルピンであるマスピンの分子多様性やその機能に及ぼす意義、子宮頸癌における発現動態について解析した。分子内ジスルフィド結合を形成した新たなマスピンの分子種が酸化ストレス条件下で増加することを見出した。この酸化型マスピンは、細胞内グルタチオン-S-トランスフェラーゼとの反応性が低下・消失しており、マスピンの機能発現に何らかの影響を及ぼすことが示唆された。また、骨盤内リンパ節転移を認めた子宮頸癌症例ではマスピンの発現が低下している傾向を認め、腫瘍進展機構に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Our series of recent study has demonstrated that there is a distinct difference between normal and malignant uterine cervical squamous epithelial tissues in the molecular heterogeneity of the tumor-related serine proteinase inhibitor (serpin), Squamous Cell Carcinoma (SCC) antigen. On the other hand, although maspin, identified as a 42-kDa unique tumor suppressive serpin in breast cancer, has multifaceted biological functions by interacting with various target molecules under physiological and pathological conditions including tumor progression, oxidative stress and so on, it is unknown what post-translational modification contributes the specific binding affinity of maspin to target molecules, such as glutathione S-transferase (GST). The aim of this study is therefore to analyze the molecular heterogeneity of maspin and identify its modification in MCF-10A cell, which is known to express abundant maspin protein, using various electrophoretic analyses. We successfully identified the novel form of endogenous maspin generated by intramolecular disulfide-bonded linkage under oxidative stress. Furthermore, glutathione beads pull-down assay revealed that intramolecular disulfide-bonded maspin lost the binding activity with endogenous GST, indicating that intramolecular disulfide-bonded maspin might have some distinct properties under oxidative stress, although the precise biological significance of this modification remains elusive. The western blot analysis using cervical primary cancer tissues showed that maspin expression levels in cervical cancer patients with pelvic lymph node metastasis were relative low compared to those with no pelvic lymph node metastases, suggesting that the suppression or post-translational modification of the tumor suppressive serpin, maspin might be related to tumor progression in cervical cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000

2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総 計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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:マズピン、SCC 抗原、セルピン、分子多様性、子宮頸癌

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌において腫瘍関連セリンプロテアーゼインヒビター(セルピン)である扁平上皮癌関連抗原 Squamous cell carcinoma (SCC) 抗原には、分子多様性が存在し、正常組織とがん組織ではその分子種の発現に差異を認めることを見出し、蛋白発現量のみならず、その分子多様性の存在が子宮頸癌の病態に深く関わっていることを示してきた。例えば、SCC 抗原は、がん組織において発現が亢進するが、リン酸化された分子種は逆に発現が減弱していることを報告した。すなわち、がんと正常組織の差異を捉えるためには、単に蛋白質の発現のみならず、蛋白質の翻訳後修飾などによる分子多様性の存在に着目することはきわめて重要であると考えられる。マズピンは、乳癌の腫瘍抑制遺伝子として発見されたが、SCC 抗原と同じくセルピファミリーに属し、乳癌や前立腺がんで腫瘍抑制性分子としての役割が近年脚光を浴びてきている。しかしながら、マズピンの分子多様性に関する検討や子宮頸癌における発現動態の解析の報告はほとんどされておらず、それらを明らかにしていくことは、セルピン分子に着目した子宮頸癌の進展制御機構解明のための新たな糸口として意義深いものと考えられる。

2. 研究の目的

子宮頸癌では、腫瘍関連セルピンである SCC 抗原が、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-9 産生促進による腫瘍細胞浸潤能亢進や、腫瘍内への NK 細胞の遊走性抑制や、あるいは、種々の刺激に対するアポトーシス抑制などを介して、腫瘍進展に促進的に働くセルピン分子であることを報告してきた。一方、子宮頸癌における腫瘍抑制的な機能を有するセルピンについての報告はほとんどなく、SCC 抗原とは相反する生物学的機能を有することが乳癌などで報告されているマズピンに着目することとした。実際、このマズピンの腫瘍抑制機能の作用機構としては、腫瘍細胞の浸潤能抑制、アポトーシス誘導促進、血管新生抑制などが考えられている。興味深いことに、これら様々な作用は、細胞内蛋白の Heat shock protein (HSP) 70 や HSP 90、細胞表

面に存在する beta1-integrin、urokinase-type plasminogen activator (uPA) / uPA receptor (uPAR) 複合体、あるいは、核内蛋白の Histone deacetylase (HDAC) 1 など、いくつかの標的蛋白質と反応することで生じることが報告されている。さらに、最近では、酸化ストレス条件下で、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と直接相互作用することによって、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の産生を制御していることが報告された。しかしながら、SCC 抗原で報告されているような、その機能調節に影響を及ぼすマズピン蛋白の分子多様性の存在に関する報告はないが、マズピン蛋白も何らかの翻訳後修飾による分子多様性が存在し、それに伴って機能変化が起こる可能性は十分に予想される。そこで、まず、酸化ストレス条件下におけるマズピン蛋白の分子多様性の存在やその機能に及ぼす意義に着目して解析した。また、子宮頸癌組織におけるマズピン蛋白の発現動態について SCC 抗原の発現動態と比較し検討を行った。

3. 研究の方法

マズピンを高発現している乳腺上皮細胞株 MCF-10A 細胞に酸化ストレス条件処理を加えマズピンの分子種の発現変化を明らかにするとともに、その標的分子との反応性の変化について種々の電気泳動法を用いて検討した。MCF-10A 細胞をサブコンフルエントまで培養し、Hydrogen peroxide (H2O2) 処理後、細胞を回収し、遠心後の上清を試料とした。この際、マズピン蛋白には8個のシステイン残基を有するので試料調整中のシステイン残基の酸化修飾の可能性をなくすために、細胞回収時に iodoacetamide 処理を行った。マズピン蛋白は、試料を未変性条件下ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE)、あるいは、非還元条件下で SDS-PAGE にて分離後、数種類のマズピンに対する特異的抗体を用いた Western blot 法にて検出した。マズピンの新たな分子種の成因に関し、分子内ジスルフィド結合の関与を Non-reducing / Reducing 2-D SDS-PAGE を用いて解析した。さらに、マズピンとその標的蛋白質との反応性を解

析するため、種々の binding assay を利用して検討した。子宮頸癌におけるマスピンの、SCC 抗原の発現動態については、Western blot 法と免疫組織化学染色法を用いて検討した。

4. 研究成果

マスピンは、Non-reducing SDS-PAGE で分子量 42 kDa のインタクトと分子量 36 kDa のその分解産物からなる 2 本のバンドとして認められた。一方、酸化ストレス条件下である H₂O₂ 処理後の細胞では新たなマスピンの分子種が Non-reducing SDS-PAGE 上で 42kDa と 36kDa のバンドの間の位置に明らかに認められたが、還元条件下では消失した。また、生理的条件下の蛋白を反映すると考えられている電気泳動条件の PAGE においても酸化ストレス条件下では、インタクトのマスピンのバンドに比較して移動度の早い新たなマスピンの分子種のバンドを認めた。Non-reducing / Reducing 2-D SDS-PAGE で解析した結果、この分子種は、インタクトのマスピンの同じ電気泳動上の移動度を示し、分子内ジスルフィド結合により生じたものであることが明らかとなった。この分子内ジスルフィド結合を形成した酸化型マスピンは、生理的にもわずかに存在していたが、H₂O₂ 濃度依存的に増加した。GSH-pull down assay 法でマスピンの標的蛋白の一つである endogenous GST との相互作用を解析した結果、酸化型マスピンは、細胞内 GST との反応性が低下ないしは消失していた。しかしながら、酸化ストレス処理した細胞から調整した試料とリコンビナントマスピン蛋白を利用した binding assay を利用して、マスピンの他の標的分子との相互作用をさらに検討した結果、細胞内蛋白の HSP 70 や HSP 90、あるいは、細胞表面に存在する beta1-integrin、pro-uPA / uPAR 複合体、あるいは、核内蛋白の HDAC1 とマスピンの親和性変化には分子内ジスルフィド結合形成に伴う差異を認めなかった。すなわち、マスピン分子は、酸化ストレス条件下では分子内ジスルフィド結合形成により立体構造が変化し、GST との反応性に変化をきたすなど、その機能発現に影響をきたす可能性が示唆された。子宮頸癌原発巣では、重要な予後因子である骨盤内リンパ節転移をきたしている症例で、SCC 抗原蛋白の発現動態とは異なり、マスピン蛋白の発現が低下している傾向を認めた。子宮頸癌の進展機構には原発巣での腫瘍促進的セルピンである SCC 抗原の異常発現に加えて、腫瘍抑制性セルピンであるマスピン蛋白の発現低下、あるいは、分子多様性の変化が関与している可能性があるものと推察された。子宮頸癌の進展機構の解明のために、腫瘍抑制性セルピンであるマスピン蛋白や腫瘍促進的セルピンである SCC 抗原の分子多様性を含めた発現動態変化、それに伴う機能変化をさらに解析していくことは重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)

[雑誌論文](計 9 件)

- ①Comparative proteomic profiling in squamous cell carcinoma of the uterine cervix, C. Fukushima, A. Murakami, K. Yoshitomi, K. Sueoka, S. Nawata, K. Nakamura and N. Sugino, **Proteomics Clin. Appl.**, 5, 133-140, 2011 査読有
- ②Evidence of post-translational modification of the tumor suppressor maspin under oxidative stress, S. Nawata, HY. Shi, N. Sugino and Zhang M, **Int J Mol Med.**, 27, 249-254, 2011 査読有
- ③臨床進行期 I・II 期子宮頸部神経内分泌腫瘍 6 例の検討 吉富恵子、村上明弘、福島千加子、末岡幸太郎、縄田修吾、杉野法広、**日本婦人科腫瘍学会雑誌**、29, 107-111, 2011 査読有
- ④Tumor-related protein, the squamous cell carcinoma antigen binds to the intracellular protein carbonyl reductase, A. Murakami, C. Fukushima, K. Yoshitomi, K. Sueoka, S. Nawata, M. Fujimoto, K. Nakamura and N. Sugino, **Int J Oncol.**, 36, 1395-1400, 2010 査読有
- ⑤Squamous cell carcinoma antigen, S. Nawata, N. Sugino and H. Kato, **Nippon Rinsho**, 68, 729-731, 2010 査読無
- ⑥Squamous cell carcinoma antigen (SCC), S. Nawata, F. Numa and N. Sugino, **Obstet and Gynecol (Tokyo)**, 77, Suppl 281-284, 2010 査読無
- ⑦子宮体癌根治術後に発症した乳び腹水に対する一治療例 松岡亜希、折田剛志、福島千加子、末岡幸太郎、村上明弘、縄田修吾、杉野法広、**現代産婦人科**、57, 11-13, 2009 査読有
- ⑧Biological Function and Clinical Significance of a Serological Tumor Marker, Squamous Cell Carcinoma Antigen in Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix, S. Nawata, **Tumor Biol.**, 29, Suppl 24, 2008 査読無
- ⑨Relationship between decreased expression of squamous cell carcinoma antigen 2 and E-cadherin in primary cervical cancer lesions and lymph node metastasis, A. Murakami, T. Nakagawa, C. Fukushima, M. Torii, K. Sueoka, S. Nawata, O. Takeda, H. Ishikawa and N. Sugino, **Oncol Rep.**, 19, 99-104, 2008 査読有

[学会発表](計 12 件)

- ①高齢者婦人科癌患者の治療法と副作用に関する検討、末岡幸太郎、吉富恵子、福島千加子、村上明弘、縄田修吾、杉野法広、第 48 回日本癌治療学会学術集会 2010 年 10 月

- 28-30日、京都 国立京都国際会館
- ②子宮頸癌Ib期からIIb期のリンパ節転移症例
 においての術後補助療法の検討、吉富恵子、
 村上明弘、福島千加子、末岡幸太郎、縄田修吾、
 杉野法広、第48回日本婦人科腫瘍学
 会学術集会2010年7月8-10日、茨城 つく
 ば国際会議場
- ③高齢者婦人科癌患者の治療の問題点、末岡
 幸太郎、吉富恵子、福島千加子、村上明弘、
縄田修吾、杉野法広、第48回日本婦人科腫
 瘍学会学術集会2010年7月8-10日、茨城
 つくば国際会議場
- ④臨床進行期I・II期子宮頸部神経内分泌腫瘍
 6例の検討 吉富恵子、村上明弘、矢壁和之、
 三輪照未、福島千加子、末岡幸太郎、縄田
修吾、杉野法広、第62回日本産科婦人科学
 会学術講演会2010年4月23-25日、東京
 東京国際フォーラム
- ⑤プロテオーム解析による子宮頸部扁平上皮
 癌のバイオマーカーの検索、福島千加子、村
 上明弘、吉富恵子、末岡幸太郎、縄田修吾、
 杉野法広、第47回日本癌治療学会学術集
 会2009年10月22-24日、横浜 パシフィコ
 横浜
- ⑥ SCC 抗原の結合分子である carbonyl
 reductase の機能解析と臨床的意義の解明、
 村上明弘、福島千加子、末岡幸太郎、縄田
修吾、杉野法広、第47回日本癌治療学会学
 術集会2009年10月22-24日、横浜 パシフ
 イコ横浜
- ⑦プロテオーム解析による子宮頸部扁平上皮
 癌の新たなバイオマーカーの検索、福島千加
 子、村上明弘、末岡幸太郎、縄田修吾、杉野
 法広、第61回日本産科婦人科学会学術集
 会2009年4月3-5日、京都 国立京都国際
 会館
- ⑧酸化ストレス条件下乳腺上皮細胞における腫
 瘍抑制性セルピン、マスピンの分子多様性の
 解析、縄田修吾、福島千加子、末岡幸太郎、
 村上明弘、杉野法広、第67回日本癌学会学
 術集会2008年10月28-30日、名古屋 名
 古屋国際会議場
- ⑨Biological Function and Clinical Significance
 of a Serological Tumor Marker, Squamous Cell
 Carcinoma Antigen in Squamous Cell
 Carcinoma of the Uterine Cervix, S. Nawata,
 The 36th Meeting of the International Society
 of Oncology and Biomarkers, ISOBM October
 5-9, 2008, Tokyo Inter Continental TOKYO
 BAY
- ⑩SCC抗原の結合分子 carbonyl reductase の機
 能解析と子宮頸部扁平上皮癌における臨床
 的意義の解明、村上明弘、福島千加子、末岡
 幸太郎、縄田修吾、武田理、杉野法広、第44
 回日本婦人科腫瘍学会学術集会 2008年7
 月17-19日、名古屋 名古屋国際会議場
- ⑪腫瘍抑制セリンプロテアーゼインヒビター(セ

ルピン)であるマスピンの分子多様性に
 関する解析、縄田修吾、福島千加子、末岡幸
 太郎、村上明弘、武田理、杉野法広、第60
 回日本産科婦人科学会学術集会 2008年4
 月12-15日、横浜 パシフィコ横浜

- ⑫ SCC 抗原の結合分子である carbonyl
 reductase の機能解析と臨床的意義の解明、
 村上明弘、福島千加子、末岡幸太郎、縄田
修吾、武田理、杉野法広、第60回日本産
 科婦人科学会学術集会 2008年4月12-15
 日、横浜 パシフィコ横浜

[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]

ホームページ等
 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

縄田 修吾(NAWATA SHUGO)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号:60294625

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし