

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591950

研究課題名(和文) SCC抗原の結合分子の検索と機能解析、臨床的意義の解明および分子標的治療への応用

研究課題名(英文) Search for molecules which bind to SCC antigen, analysis of their functions and clinical significance, and application to the molecular target therapy

研究代表者

村上 明弘 (MURAKAMI AKIHIRO)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70379965

研究成果の概要(和文)：

SCC 抗原の結合分子として carbonyl reductase (CR) を同定した。CR 遺伝子の導入によって機能解析を行った結果、CR の発現抑制により細胞形態は線維芽細胞様に変化し、MMP の発現、細胞浸潤能および移動能は亢進した。一方、CR の過剰発現では MMP の発現は抑制された。子宮頸部扁平上皮癌で CR の発現パターンを解析した結果、CR の発現低下パターンでは骨盤リンパ節転移と有意の相関を認め、無進行生存と全生存は有意に低下していた。以上より、CR の発現低下は癌の進展に促進的に働き、予後不良となることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：

The SCC antigen binds to the protein, which was identified to be carbonyl reductase (CR). The immunostaining analyses revealed that CR is located in the cytoplasm of keratinocytes and the normal squamous epithelial cells of the uterine cervix as well as SCCA1 and SCCA2. Sense and antisense CR cDNAs were transfected into a human uterine SCC cell lines to investigate the role of CR in cancer cell invasion and metastasis. In an in vitro experiment, suppression of CR showed morphology changes to like fibroblast, increased cancer cell invasion, secretion of MMP. On the other hand, over-expression of CR decreased MMP secretion. Paraffin sections from uterine cervical SCC tissues, FIGO stage Ib1-IIb were immunostained with anti-CR antibodies. Overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) were analyzed by the Kaplan-Meier method. Immunohistochemical analyses showed that reduced CR expression patterns in primary cancer lesions were closely associated with a high incidence of pelvic lymph node metastasis, poor OS, and poor PFS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：婦人科腫瘍学

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：SCC 抗原、carbonyl reductase (CR)、予後判定

1. 研究開始当初の背景

当教室で発見した扁平上皮癌の腫瘍マー

カーである SCC 抗原は、子宮頸部癌のみならず、肺癌、食道癌、頭頸部癌を含めた扁平

上皮癌患者の病状管理において臨床的に広く用いられている。近年、我々は SCC 抗原の cDNA を明らかにして以来、分子生物学的解析が進行し、SCC 抗原は単なる腫瘍マーカーの範疇を超え、生物活性を持つ非常に興味ある分子となっている [Suminami et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 181: 51-58 (1991)]。

転移機構に関して、一般的に E-カドヘリンが重要な役割を果たしていることが知られている。興味深いことに SCC 抗原も E-カドヘリンと同様に高分化型の扁平上皮癌では高発現しているが、低分化型では低発現であることが知られている。最近の我々のデータでは中和抗体による E-カドヘリンの機能抑制によって SCC 抗原の発現は抑制され [Hirakawa et al. *Oncol Rep* 11: 415-419 (2004)]、また、E-カドヘリンの過剰発現によって、Akt のリン酸化を介して SCC 抗原の発現亢進が明らかとなった [Nakagawa et al. *Oncol Rep* 18: 175-179 (2007)]。さらに、SCC 抗原の発現を抑制することによって、E-カドヘリンの発現も低下し、その結果、癌細胞の浸潤能・遊走能が亢進することを明らかにしている [Murakami et al. *Int J Oncol* 29: 1231-5 (2006)]。ヒト組織を用いた *in vivo* の検討においても SCC 抗原と E-カドヘリンの発現態度は一致し、さらに SCC 抗原の発現低下は骨盤リンパ節転移と有意な関係が認められた [Murakami et al. *Oncol Rep.* 19: 99-104 (2008)]。以上より、SCC 抗原は、癌の浸潤・転移機構において E-カドヘリンとの相互作用によって重要な機能を有することが考えられる。癌を制圧するためには、局所における腫瘍塊の増大を抑制することはもちろん、癌の浸潤・転移を抑制することはさらに重要である。そのために、癌細胞内における SCC 抗原の分子機構を明らかにすることが重要であると考えられる。しかしながら、SCC 抗原が上記の生物活性を有することが報告されているにもかかわらず、分子作用機構やその細胞内標的分子については不明であったが、我々はプロテオーム解析により SCC 抗原の細胞内結合分子として *carbonyl reductase* (CR) を明らかにしている。CR の機能に関しては現在まで十分に解明されていないが、SCC 抗原と結合する分子であるために、CR も癌の局所増殖や浸潤・転移に関与する機能を有する分子であることが予想される。SCC 抗原の分子作用機構や CR の機能を解明することは、新規の分子標的治療法あるいは新たな診断法の開発に発展する可能性があり、将来のテーラーメイド医療にも発展する可能性が大いに考えられ、非常に意義深いものと思われる。

2. 研究の目的

- (1) CR に対する抗体を作製し、細胞内局在および組織局在を明らかにする。
- (2) CR の強発現および発現抑制による細胞機能 (細胞浸潤能や細胞移動能等) を検討し、その分子機能を解析する。
- (3) CR の臨床的意義 (リンパ節転移、再発、生存期間との関係、予後を予測する因子として臨床応用が可能であるか) について検討する。
- (4) CR の臨床的意義が明らかとなれば、予後判定の新たなバイオマーカーとして測定系の確立を行う。また、CR の発現を調節することによって *in vivo* で癌細胞の増殖・転移抑制を検討し、新たな分子標的治療への応用を検討する。

3. 研究の方法

(1) SCC 抗原の結合分子である *carbonyl reductase* の抗体を作製し、細胞内局在および組織局在を検討する。

carbonyl reductase (CR) の抗体を作製 (以下の実験のためには CR の抗体を作成することが必須条件である) し、培養したヒトケラチノサイトを免疫染色して細胞内局在を検討する。組織採取に際しては既に山口大学医学部附属病院治験臨床研究審査委員会承認を得ている。実際に組織を採取する際には、文書によるインフォームド Consent の上、患者の同意を得る。対象とする組織は、手術により摘出した子宮筋腫等の正常子宮腔部組織を用いて組織局在を検討する。

(2) SCC 抗原の結合分子である *carbonyl reductase* の強発現および発現抑制による細胞機能 (細胞増殖能、浸潤・転移能等) を検討する。

細胞内における *carbonyl reductase* (CR) の役割を明らかにするため、遺伝子導入実験による CR の過剰発現および発現抑制を行う。まず、作製する CR の抗体を用いて、6 種類の子宮頸部扁平上皮癌培養細胞における CR の発現をウエスタンブロット法により確認する。CR の発現が認められないことを確認した子宮頸部扁平上皮癌培養細胞に CR のセンス cDNA をリポフェクション法によって遺伝子導入することによって過剰発現させる。さらに、元来より CR を発現している (前実験により確認する) 子宮頸部扁平上皮癌細胞に対して RNA 干渉によって CR 遺伝子のノックダウンを行う。以下の実験には、いずれも作製する CR の抗体を用いたウエスタンブロット法により、CR の発現程度を確認したクローンを用い、検討する。

- ①細胞形態の変化 (細胞凝集等) を位相差顕微鏡で観察する。
- ②細胞機能として、癌細胞の浸潤および転移能の変化を評価する。具体的な方法として、

i) invasion assay; 培養開始後 21 時間後にマトリゲルを重層したチャンバーにおいて浸潤した細胞あるいはマトリゲルを重層していないコントロールチャンバーを遊走した細胞をギムザ染色し、細胞数を評価する。その結果として、細胞浸潤能を評価する。

ii) scratch assay; 単層で培養した細胞のシャーレの底に傷を作り、24 時間後同じ場所の修復程度を測定する。その結果として、水平方向の細胞移動能を評価する。

iii) 細胞浸潤に関与する MMP-2 および MMP-9 の細胞外分泌の程度について zymography により検討する

(3) 結合分子 (carbonyl reductase) の臨床的意義 (リンパ節転移、再発、生存期間との関係、予後予測因子として応用可能であるか) について検討する。

我々は、リンパ節転移巣を有する子宮頸部扁平上皮癌 I、II 期の患者 70 症例の子宮頸癌原発巣の組織を用いた SCC 抗原の免疫組織染色による細胞内局在と発現強度をもとにした染色パターンの決定とその発現態度を解析している。具体的には、Shiozaki et al. [Am J Pathol 139: 17-23 (1991)] の分類に従い、i) 癌細胞すべてが正常上皮と同程度に染色されるパターン (strong pattern)、ii) 癌細胞すべてが一様に染色されているものの発現程度は正常上皮よりも弱いパターン (weak and homogenous pattern)、iii) 正常上皮と同程度の染色性を示す癌細胞と染色性が失われている癌細胞の両者が混在しているパターン (heterogenous pattern) の計 3 パターンに大別している。この発現パターンをもとにして骨盤リンパ節への転移との関連性、さらに無進行生存・全生存との関連性について統計学的に解析した。その結果、SCC 抗原の heterogenous pattern は骨盤リンパ節転移と有意に関連を認め、無進行生存率は strong pattern と比較して heterogenous pattern では有意に低下していた (Murakami et al. Oncol Rep. 2008)。

carbonyl reductase (CR) の臨床的意義 (リンパ節転移、再発、生存との関係) について、作製する CR の抗体を用いて以下の方法に従って明らかにする。

① 子宮頸癌 I、II 期症例の原発巣組織を用いて、CR の発現態度について免疫組織染色を実施する。発現態度に関しては、SCC 抗原と同様に上記 3 パターンに分類する。

② CR の発現態度 3 パターンについて、骨盤リンパ節転移との関連性、無進行生存、全生存について統計学的に検討する。CR も骨盤リンパ節転移や予後を予測する因子となりうる可能性があるかと予想している。さらに、Murakami et al. (Oncol Rep. 2008) が報告した SCC 抗原の予後判定の有用性と比較し、

CR が SCC 抗原より優れた骨盤リンパ節転移の予測や予後を予測する新たな因子となりうるかを統計学的に検討する。

4. 研究成果

(1) CR に対する抗体を作製し、細胞内局在および組織局在を明らかにする。

CR のアミノ酸配列より合成ペプチドを作成し、CR の抗体を作成し、特許を取得した (扁平上皮癌の予後判定方法 特開 2008-182987)。また、免疫染色により細胞質に局在を確認した。

(2) CR の強発現および発現抑制による細胞機能 (細胞浸潤能や細胞移動能等) を検討し、その分子機能を解析する。

① 細胞形態の変化 (細胞凝集等) を位相差顕微鏡で観察する。

CR の発現抑制により細胞の形態は線維芽細胞様の形態に変化した。

② 細胞機能として、癌細胞の浸潤および転移能の変化を評価する。

i) invasion assay; 子宮頸癌細胞 SiHa および SKG II では CR の発現抑制により細胞浸潤能は亢進した。

ii) scratch assay; 子宮頸癌細胞 SiHa および SKG II では CR の発現抑制により細胞移動能は亢進した。

iii) 細胞浸潤に関与する MMP-2 および MMP-9 の細胞外分泌の程度について zymography により検討する。

CR の発現抑制により MMP の発現は亢進する、一方、CR の過剰発現では MMP の発現は抑制される。

(3) CR の臨床的意義 (リンパ節転移、再発、生存期間との関係、予後を予測する因子として臨床応用が可能であるか) について検討する。

CR の発現パターンを SCC 抗原と同様に CR の発現が保たれている strong pattern、癌細胞すべてが一様に染色されているものの発現程度は正常上皮よりも弱いパターン (weak and homogenous pattern)、正常上皮と同程度の染色性を示す癌細胞と染色性が失われている癌細胞の両者が混在しているパターン (heterogenous pattern) の 3 パターンに分類できた。strong pattern と比較して、発現が低下している細胞が混在する weak and homogenous pattern および heterogenous pattern では無進行生存および全生存は有意に低下していた。以上より、CR の発現低下は予後不良を示すことが明らかとなった。これに関しては特許を取得した (扁平上皮癌の予後判定方法 特開 2008-182987)。

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3件)

- ① Comparative proteomic profiling in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Fukushima C, **Murakami A** 他5名(2番目) Proteomics-Clinical applications-, in press 2011
査読有
- ② Tumor-related protein, the squamous cell carcinoma antigen binds to the intracellular protein carbonyl reductase. **Murakami A**, 他7名(1番目) Int J Oncol 36: 1395-1400, 2010 査読有
- ③ Relationship between decreased expression of squamous cell carcinoma antigen 2 and E-cadherin in primal cervical cancer lesions and lymph node metastasis. **Murakami A**, 他7名
(1番目) 2008 19: 99-104, 2008 査読有

〔学会発表〕(計7件)

- ① SCC抗原の結合分子である carbonyl reductase の機能解析とその臨床的意義の解明。**村上明弘** 第60回日本産婦人科学会学術講演会(パシフィコ横浜 横浜市 2008.4.14)
- ② SCC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** 第44回日本婦人科腫瘍学会(名古屋国際会議場 名古屋市 2008.7.18)
- ③ Carbonyl reductase, a binding molecule to SCC antigen, is a new predictive biomarker for the prognosis of uterine cervical squamous cell carcinoma. Fukushima C, **Murakami A** IGCS Bangkok, Thailand 2008.
- ④ Identification and analysis of the intracellular molecules bound to SCC

antigen. **Murakami A** IGCS Bangkok, Thailand 2008.10.27

- ⑤ SCC抗原の結合分子である carbonyl reductase の機能解析。**村上明弘** 日本産婦人科学会学術講演会(国立京都国際会館 京都市 2009.4.4)
- ⑥ SCC抗原の結合分子である carbonyl reductase の機能解析。**村上明弘** 日本婦人科腫瘍学会(朱鷺メッセ 新潟市 2009)
- ⑦ 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** 日本癌治療学会(パシフィコ横浜 横浜市 2009.10.24)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 子宮体部類内膜腺癌の予後判定法
発明者: **村上明弘**、杉野 法広
権利者: 山口大学
種類: 特願
番号: 2010-149369
出願年月日: 平成22年6月30日
国内外の別: 国内

○取得状況(計2件)

名称: 子宮頸癌の検出方法
発明者: 福島千加子、**村上明弘**、杉野法広
権利者: 山口大学
種類: 特開
番号: 2010-203988
取得年月日: 平成22年9月16日
国内外の別: 国内

名称: 扁平上皮癌の予後判定方法
発明者: **村上明弘**、杉野法広
権利者: 山口大学
種類: 特開
番号: 2008-182987
取得年月日: 平成20年8月14日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者

村上 明弘 (MURAKAMI AKIHIRO)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70379965

(2)研究分担者

縄田 修吾 (NAWATA SHUGO)
山口大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：60294625

(3)連携研究者

なし