

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07397

研究課題名(和文) 卵巣明細胞癌の抗癌剤耐性関連新規バイオマーカー：EBP50の同定とその機能解析

研究課題名(英文) Cytoplasmic EBP50 and elevated PARP1 are unfavorable prognostic factors in ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

松本 俊英 (Matsumoto, Toshihide)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：10623184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：OCCCの臨床検体での免疫組織学的検索で、EBP50高発現群は低発現群に比して予後不良であった。OCCC培養細胞のCDDP処理によりEBP50と共にリン酸型(p)Akt発現の増加を認めた。一方、PI3K/Akt活性阻害により、pAkt/EBP50の発現低下を示した。EBP50ノックダウン系では、CDDPおよびPTXによるアポトーシス誘導が亢進した。そこで、EBP50と結合するタンパク質を網羅的に解析し、DNA修復に関与するPARP-1を同定した。EBP50ノックダウン系は、CDDP処理下のPARP-1の発現及びその酵素活性の低下を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で用いたホルマリン固定パラフィン包埋検体のショットガンプロテオミクス法による網羅的解析は、我々のグループ独自の解析手法である。本法によりOCCCの再発・予後を規定する候補因子としてEBP50を見出し、国内外を通じて、OCCCにおけるEBP50発現とその機能解析は殆ど手付かずの状態であり、極めて独自性の高い研究である。小分子化合物等を用いたEBP50シグナル系阻害による新規治療法の分子基盤を築くことができる。特に、本分子を標的とした治療法は、再発例や標準治療に抵抗性を示すOCCCに対しても有効であることが想定され、患者予後改善に著しく貢献できることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Patients with ovarian clear cell carcinoma (OCCC) experience frequent recurrence, which is most likely due to chemoresistance. We used shotgun proteomics analysis and identified upregulation of EBP50 in recurrent OCCC samples. Abrogation of resistance following knockdown of EBP50 was accompanied by increased apoptotic cells. We found that PARP1, which is involved in DNA damage detection and repair, binds to EBP50 through its PDZ1 domain. Cisplatin treatment of cells expressing EBP50 increased nuclear PARP1 expression, whereas knockdown of EBP50 cells decreased PARP1 expression and activity following Cisplatin treatment. Finally, OCCC patients with a combination of EBP50 and high PARP1 score had worst the prognosis for overall and progression-free survival.

研究分野：分子病理学

キーワード：卵巣明細胞癌 プロテオーム EBP50 PARP1 抗癌剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

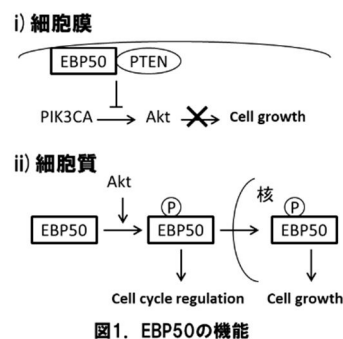
1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣明細胞癌 (OCCCa) の臨床的問題点

卵巣癌の4大組織型 (OCCCa、漿液癌、粘液癌、類内膜癌) のうち、OCCCa は本邦における発生率が約20%で、欧米の4~6%に比して極めて高い (Kobayashi et al, Onco Rep, 2009)。一般的に卵巣癌の標準治療としてプラチナ製剤 (シスプラチン: CDDP など) とタキサン系抗癌剤 (パクリタキセル: PTX など) を併用した抗癌剤が有効とされ、漿液癌や類内膜癌は奏効率が75%を超える。一方、OCCCa は18%で抗癌剤耐性能が極めて高いため、その進行期癌や再発癌は極めて予後不良である。このため、進行期または再発 OCCCa に対する新規治療法の開発は、患者の予後改善に直結する喫緊の課題である。

(2) 再発 OCCCa 例の新規バイオマーカー同定への挑戦

現在、OCCCa 再発症例の診断は、画像診断が主な手法である。しかし、患者のフォローアップの観点からも、OCCCa の再発予測マーカーの同定は重要であり、新規治療法開発のターゲットにもなり得る。そこで、研究代表者は、再発 OCCCa 症例で特異的に高発現する新規バイオマーカーの同定を目指した。5症例の OCCCa 原発及び再発病変、計10サンプルのホルマリン固定パラフィン包埋検体より研究代表者ら独自の手法によりタンパク質を抽出し、ショットガンプロテオミクス法により発現するタンパク質を網羅的に解析した。その結果、総計2273種のタンパク質から原発巣に比べて再発巣で特異的に高発現する EBP50 (ezrin-radixin-moesin binding phosphoprotein 50) を見出した。EBP50 は、上皮細胞の細胞膜上で高発現する足場タンパク質として報告されている。近年は種々の腫瘍における発現とその機能について報告されはじめ、脳腫瘍においては細胞膜近傍で PTEN と結合することにより PI3K/Akt シグナル系を阻害する (Molina et al, Cancer Res, 2010)。一方で、細胞質における発現は Akt による EBP50Thr156 のリン酸化により核内へ移行し細胞増殖に関与するなど、その局在により機能が異なるタンパク質として報告されている (図1)。



2. 研究の目的

OCCCa において、EBP50 が再発・予後に関する新規バイオマーカーであることの証明、PI3K/Akt 系による EBP50 発現制御機構の解明、EBP50 と PARP1 による抗癌剤耐性能獲得機構の分子機序を解明する。目標 - を達成した上で、EBP50 が再発 OCCCa の新たなバイオマーカーであることを提唱し、そのシグナル系をターゲットにした、再発 OCCCa 例を含む新規治療法戦略に向けた分子基盤構築を目的とする。

3. 研究の方法

A. OCCCa における EBP50 の発現制御機構の解明 (2020 年度)

1) 臨床検体による EBP50 発現検索 (松本、大学院生)

150 例の OCCCa 臨床検体で、in situ hybridization 法 (独自に設計・作製した RNA プローブを利用) による mRNA の検索、免疫組織化学法によるタンパク質発現の検索、40 例の新鮮検体で、real time RT-PCR 法と Western Blot 法による EBP50 の mRNA およびタンパク質発現検索を行う。

2) EBP50 と PI3K/Akt シグナル系の関与 (松本)

i) 上記臨床検体を用いて、免疫組織学的に PI3K/Akt および PTEN 発現を検索する。ii) OCCCa 細胞株を無血清培養後、血清刺激による Akt の活性化、あるいは LY294002 などの Akt 阻害剤処理後の、EBP50 および PTEN の mRNA・タンパク質発現変化を real time-PCR 法や Western Blot 法で検索する。iii) EBP50 遺伝子プロモーター領域をクローニングし、PI3K/Akt シグナル系によるそのプロモーター活性の変化を Luciferase assay により解析する。

B. EBP50 による抗癌剤耐性獲得の分子メカニズムの解明 (2021 年度以降)

1) EBP50 発現検索と細胞動態に及ぼす影響の検索 (松本、技術員)

i) 5 種の OCCCa 培養細胞株 (ES-2、OVTOKO、OVISE、KOC7C、TOV-21G) から細胞内タンパク質分画を行い、EBP50 発現を局在別に検索する。ii) 各種増殖・細胞周期マーカー (Ki-67、Cyclin A、p21waf1、p27kip1) や細胞死シグナル (bax/bcl-2、cleaved caspase-3、cleaved PARP1) に関連するタンパク質発現、及び TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出を行い、EBP50 発現との関連性を検索する。

2) EBP50 発現と抗癌剤耐性との関連性の証明 (松本)

i)OCCCa 細胞株に shRNA コンストラクト導入による EBP50 ノックダウン系細胞を作製する(一部作製済み)。作製した細胞株に抗癌剤処理 (CDDP 及び PTX) 後、ii)WST assay による IC50 算出および細胞生存曲線から抗癌剤耐性能を評価する、iii)TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出および Propidium Iodide (PI) 染色を用いた Flow cytometry による細胞周期解析を行う、iv)各種増殖・細胞周期関連因子や細胞死関連シグナル発現を Western Blot 法により解析する。

3) EBP50 と PARP1 クロストークによる機能解析 (松本)

B-2)で作製した培養細胞を用いて、i)IP 法により PARP1 との結合能の変化を検索する、ii)PARP/Apoptosis Assay Kit の化学発光法により直接 PARP 活性を測定する、iii)CDDP 及び PTX 処理後の 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) を利用した ELISA 法と PARP/Apoptosis Assay Kit の化学発光法により、DNA 損傷レベルと修復活性レベルを解析する。

4. 研究成果

(1) OCCCa における EBP50 発現検索および臨床的意義の検討

69 症例の OCCCa 検体を用いた免疫染色の結果、EBP50 は細胞質/核発現 (55.1%) または細胞膜発現 (44.9%) に分類され、細胞質/核発現は全生存期間・無増悪生存期間ともに有意に予後不良であった。次に、EBP50 発現を示す OCCCa 培養細胞を検索したところ、TOV21G が細胞質発現、OVISE 細胞が細胞膜発現であった。TOV21G 細胞については shRNA コンストラクトを遺伝子導入し、EBP50 ノックダウン系(EBP-KD)を作製した。EBP50-KD 細胞は mock に比して、シスプラチン(CDDP) 刺激によるアポトーシス細胞の増加と抗アポトーシス因子である XIAP と Bcl-2 の低下、アポトーシス誘導因子である bax および Cleaved caspase-3 の増加を認め、結果として抗癌剤感受性が亢進していることが示唆された。

(2) EBP50 結合パートナー分子の網羅的検索：PARP1 の同定

EBP50 は 3 つのドメイン (PDZ1, PDZ2, EB) を介して様々なタンパク質と結合し、多様な機能を有することが知られている。そこで、OCCCa における細胞質 EBP50 の発現意義を詳細に検討するため、免疫沈降法とショットガンプロテオミクス法を組み合わせることにより、EBP50 と結合を示すタンパク質を網羅的に解析した。検出結果を Cluster 解析および Scatter plot 解析したところ、両者ともに DNA 修復酵素である PARP-1 (poly[ADP-ribose]polymerase-1) が最も強い結合因子であることが示唆された (図 2)。免疫沈降-Western blot 法により、TOV21G 細胞では PARP1 との結合を認め、OVISE ではバンドが全く検出されなかった。また、GST-tag 付発現タンパク質による Pull-down assay により、PARP1 は EBP50 の PDZ1 ドメインで結合することが明らかとなった。

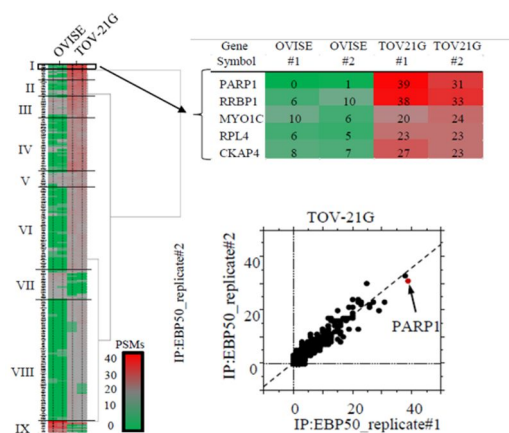


図2. EBP50結合タンパク質の網羅的解析

(3) EBP50/PARP1 axis の機能解析

まず、細胞質発現を示す EBP50 と核内因子である PARP1 の結合証明を行った。TOV21G 細胞に CDDP 刺激後の EBP50 発現解析を実施したところ、細胞質 EBP50 は核内に移行していることが明らかとなった。同様に、OVISE 細胞における細胞膜 EBP50 発現を検出したところ、核内移行は生じていなかった。また、EBP50-KD 細胞では mock に比して、Cleaved PARP1 発現が著しく亢進しており、EBP50 は PARP1 発現安定化を担っていることが示唆された。さらに、ELISA 法により PARP 活性について検討したところ、mock では活性維持を認め、EBP-KD 細胞では有意に活性が落ちていた。

(4) OCCCa 臨床検体による EBP50/PARP1 axis の証明

OCCCa 臨床検体を用いた免疫染色法により、EBP50 細胞質/核発現を示す症例は、PARP1 発現が亢進していることが分かった。さらに、EBP50 と PARP1 発現強度により 4 群に分けたところ、細胞質 EBP50 (+)/PARP1 (+) 症例 (13 例: 18.8%) は、全生存期間・無増悪生存期間ともに最も予後不良群であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakagawa Mayu, Higuchi Shyoma, Hashimura Miki, Oguri Yasuko, Matsumoto Toshihide, Yokoi Ako, Ishibashi Yu, Ito Takashi, Saegusa Makoto	4. 巻 22
2. 論文標題 Functional interaction between S100A1 and MDM2 may modulate p53 signaling in normal and malignant endometrial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-022-09249-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inukai Madoca, Yokoi Ako, Ishizuka Yuuki, Hashimura Miki, Matsumoto Toshihide, Oguri Yasuko, Nakagawa Mayu, Ishibashi Yu, Ito Takashi, Kumabe Toshihiro, Saegusa Makoto	4. 巻 20
2. 論文標題 A functional role of S100A4/non-muscle myosin IIA axis for pro-tumorigenic vascular functions in glioblastoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12964-022-00848-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Hiroyuki, Watanabe Hirono, Hashimura Miki, Matsumoto Toshihide, Yokoi Ako, Nakagawa Mayu, Ishibashi Yu, Ito Takashi, Ohhigata Kensuke, Saegusa Makoto	4. 巻 8
2. 論文標題 A combination of stromal PD L1 and tumoral nuclear catenin expression as an indicator of colorectal carcinoma progression and resistance to chemoradiotherapy in locally advanced rectal carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology: Clinical Research	6. 最初と最後の頁 458 ~ 469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cjp2.285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokoi Aki, Minami Marina, Hashimura Miki, Oguri Yasuko, Matsumoto Toshihide, Hasegawa Yoshinori, Nakagawa Mayu, Ishibashi Yu, Ito Takashi, Ohigata Kensuke, Harada Youhei, Fukagawa Naomi, Saegusa Makoto	4. 巻 20
2. 論文標題 PTEN overexpression and nuclear β -catenin stabilization promote morular differentiation through induction of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in endometrial carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12964-022-00999-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Akemi, Matsumoto Toshihide, Ito Yuka, Saegusa Makoto, Takahashi Hiroyuki	4. 巻 130
2. 論文標題 TP53 positivity combined with high fibrinogen expression defines a subtype of oral squamous cell carcinoma with an unfavorable prognosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Pathology	6. 最初と最後の頁 25 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.humpath.2022.10.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tazawa Ryo, Kenmoku Tomonori, Uchida Kentaro, Arendt-Nielsen Lars, Nagura Naoshige, Nakawaki Mitsufumi, Matsumoto Toshihide, Inoue Gen, Takeuchi Hiroto, Jimbo Takenori, Nakazawa Toshiyuki, Fukuda Michinari, Takaso Masashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Increased nerve growth factor expression in the synovial tissues of patients with rotator cuff tears	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/17448069211021252	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Toshihide, Oda Yusuke, Hasegawa Yoshinori, Hashimura Miki, Oguri Yasuko, Inoue Hisako, Yokoi Aki, Tochimoto Masataka, Nakagawa Mayu, Jiang Zesong, Saegusa Makoto	4. 巻 191
2. 論文標題 Anaplastic Lymphoma Kinase Overexpression Is Associated with Aggressive Phenotypic Characteristics of Ovarian High-Grade Serous Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1837 ~ 1850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2021.06.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Toshihide, Yoki Ako, Konno Ryo, Oguri Yasuko, Hashimura Miki, Tochimoto Masataka, Nakagawa Mayu, Jiang Zesong, Ishibashi Yu, Ito Takashi, Koderu Yoshio, Saegusa Makoto	4. 巻 42
2. 論文標題 Cytoplasmic EBP50 and elevated PARP1 are unfavorable prognostic factors in ovarian clear cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 1162 ~ 1170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgab070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mukai Manabu, Uchida Kentaro, Okubo Tadashi, Takano Shotaro, Matsumoto Toshihide, Satoh Masashi, Inoue Gen, Takaso Masashi	4. 巻 8
2. 論文標題 Regulation of Tumor Necrosis Factor- by Peptide Lv in Bone Marrow Macrophages and Synovium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 702126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2021.702126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Toshihide, Chino Hiromi, Akiya Masashi, Hashimura Miki, Yokoi Ako, Tochimoto Masataka, Nakagawa Mayu, Jiang Zesong, Saegusa Makoto	4. 巻 59
2. 論文標題 Requirements of LEFTY and Nodal overexpression for tumor cell survival under hypoxia in glioblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 1409 ~ 1419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mc.23265	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiruta Ai, Oguri Yasuko, Yokoi Ako, Matsumoto Toshihide, Oda Yusuke, Tomohiro Mikiyama, Hashimura Miki, Jiang Zesong, Tochimoto Masataka, Nakagawa Mayu, Saegusa Makoto	4. 巻 190
2. 論文標題 S100A4/Nonmuscle Myosin IIA/p53 Axis Contributes to Aggressive Features in Ovarian High-Grade Serous Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 2304 ~ 2316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2020.07.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokoi Aki, Matsumoto Toshihide, Oguri Yasuko, Hasegawa Yoshinori, Tochimoto Masataka, Nakagawa Mayu, Saegusa Makoto	4. 巻 18
2. 論文標題 Upregulation of fibronectin following loss of p53 function is a poor prognostic factor in ovarian carcinoma with a unique immunophenotype	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12964-020-00580-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松本俊英、横井愛香、紺野亮、小栗康子、橋村美紀、中川茉祐、小寺義男、三枝信
2. 発表標題 卵巣明細胞癌においてcytoplasmic EBP50/PARP-1は抗癌剤耐性能獲得に寄与する
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshihide Matsumoto
2. 発表標題 Research on mechanisms of carcinogenesis and chemo-resistance in ovarian clear cell carcinoma
3. 学会等名 The 111th Annual Meeting of the Japanese Society of Pathology. Award Lecture
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本俊英、横井愛香、紺野亮、小寺義男、三枝信
2. 発表標題 卵巣明細胞癌においてEBP50/PARP-1 axisは抗癌剤耐性能獲得に寄与する
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本俊英、秋谷昌史、川島祐介、小寺義男、小栗康子、橋村美紀、三枝信
2. 発表標題 卵巣明細胞癌における臨床応用に向けた新規バイオマーカー探索とその機能解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2021大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本俊英、川島祐介、紺野亮、小寺義男、横井愛香、秋谷昌史、小栗康子、橋村美紀、三枝信
2. 発表標題 卵巣明細胞癌の新規バイオマーカー探索とその機能解析：病理検体を用いたショットガンプロテオミクス法
3. 学会等名 第72回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本俊英、秋谷昌史、川島祐介、小寺義男、横井愛香、小栗康子、橋村美紀、三枝信
2. 発表標題 病理検体を用いた卵巣明細胞癌の新規バイオマーカー探索：Leftyの同定とその臨床的意義の検討
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本俊英、横井愛香、紺野亮、小寺義男、三枝信
2. 発表標題 EBP50は卵巣明細胞癌の再発・予後不良因子である
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------