

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号： 20101
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2009～2011
 課題番号： 21592141
 研究課題名（和文） 婦人科腫瘍でのギャップ結合を介するバイスタンダー効果の遺伝子治療への応用
 研究課題名（英文） Bistandar effect via gap junctional intercellular communication for gene-therapy in gynecologic cancers.
 研究代表者
 齋藤 豪 (SAITO TSUYOSHI)
 札幌医科大学・医学部・教授
 研究者番号： 90145566

研究成果の概要（和文）： 婦人科腫瘍とりわけ子宮内膜癌におけるギャップ結合を介するバイスタンダー効果を HSV-tk 遺伝子導入によって確認することができた。また、このバイスタンダー効果はレチノイドを添加することによって増強することが確かめられた。

研究成果の概要（英文）： We have confirmed bistandar effect via gap junctional intercellular communication in gynecologic cancers especially endometrial cancer cell. We have also found the bistandar effect was accelerated to add retinoids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：子宮体癌、遺伝子治療、バイスタンダー効果、ギャップ結合、ヘルペスウイルス

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦において婦人科腫瘍の中でもとりわけ子宮体癌と卵巣癌の罹患率が上昇している。これら子宮体癌と卵巣癌の進行期とその治療戦略は主に手術所見に基づいて決定されるが、進行期決定のためには後腹膜リンパ節転移の有無を郭清および生検によって確認する必要があり、またリンパ転移の有無が予後や補助療法などの治療方針決定に大きな影響を及ぼしていることは議論の余地がない。しかし、リンパ浮腫をはじめとする術後合併症による治療後の QOL 低下も見逃すことはできず、症例による縮小手術は体癌・卵巣癌の

治療戦略上の検討課題となっている。また、手術後の放射線療法についても、放射線腸炎や膀胱炎などの合併症が問題となる。しかし、これらの問題を解決するには従来の病理組織学的因子に加え、種々のバイオマーカーによる多面的解析によって治療の個別化を図る必要がある。また、進行あるいは再発癌の補助療法として放射線療法や化学療法が行われているが、これらの治療が充分癌を制御しているとは言えず、新しい治療法の開発が待たれている。

癌浸潤転移機構は細胞接着の異常、間質組織の破壊と細胞運動性の亢進などを含む多段

階複合的な生物現象で、この解明とその阻害は癌研究のもっとも重要な課題の一つである。この複雑系としての転移浸潤機構も近年の分子生物学的アプローチにより徐々に解明されつつあり、我々も子宮体癌においてもその悪性度や予後を規定するいくつかの分子について報告してきた。子宮内膜は一層の円柱上皮からなる腺上皮と間質細胞よりなり、子宮体癌取り扱い規約ではこの腺構造の占める割合によって G1 (高分化型腺癌)、G2 (中分化型腺癌)、G3 (低分化型腺癌) 分類される。この細胞形態の分類は強く予後を反映することが知られている。たとえば、我々の教室のデータでは子宮体癌の五年生存率が G1 で 95.8%、G2 で 83%そして G3 で 56.1%と細胞形態が正常の腺構造から離れるほど予後が悪くなる。このような子宮内膜を始めとする腺上皮組織は接着装置を有しこれらが細胞の機械的結合や形態の維持に重要な働きを有していると考えられる。

我々はこれまで、E-カドヘリン遺伝子の発現・メチル化と子宮内膜癌の進展、予後との関係について検討し、E-カドヘリン遺伝子メチル化の有無は子宮体部癌の筋層浸潤やリンパ転移の予測因子となりうるということが報告した。また、細胞接着装置の一つであるギャップ結合の正常子宮内膜、子宮内膜増殖症、子宮内膜癌での発現について、分子生物学的に解析した。子宮内膜上皮ではコネキシン 26 と 32 が発現しており、間質細胞には 43 の発現が認められた。ギャップ結合を形成するコネキシン 26 と 32 は正常子宮内膜増殖期ではほとんど観察されなかったにもかかわらず、排卵後・分泌初期からその発現は急速に増加し、分泌中期にピークを認めた。子宮内膜増殖症、子宮内膜癌の免疫染色ではコネキシンの発現は極端に減弱あるいは発現していても細胞質に局在するなどの局在異常を認め、これらの状態では細胞間コミュニケーションが低下していることを報告してきた。In vitro の検討ではこのギャップ結合を介する細胞間コミュニケーションはE-カドヘリンの発現低下によってコネキシンの局在異常を引き起こし抑制されることが明らかになった。これまでわれわれは主に癌組織から得られた遺伝子を種々の側面より解析し、臨床あるいは病理学的パラメーターと対比し解析を行ってきたが、本研究ではこれらの知見を元に①治療を行う前にこれらの遺伝子の解析を行って治療戦略の個別化を図る、②われわ

れが癌組織で解析してきた遺伝子をターゲットとした新しい治療法の開発を目的として以下に示すように研究を進める。

2. 研究の目的

子宮体癌治療の個別化のための細胞接着分子測定

子宮体癌の初期診断には子宮内膜細胞診が通常行われる。これは子宮内膜ブラシで子宮内膜細胞を採取しその形態から癌の診断を行うが、ここで得られた細胞の一部より DNA を抽出し E-カドヘリン遺伝子のメチル化の有無を検討する。先にも述べたように E-カドヘリン遺伝子のメチル化の有無は体癌のリンパ転移を初めとした病理組織学的パラメーターと関連しており、リンパ郭清を初めとした手術の個別化に対する有用な情報となりうると思われる。また、ブラシで細胞を採取することにより①侵襲がほとんど無い、②組織と異なり子宮体部全体から網羅的にサンプルを集めることが可能で偽陰性の可能性が低くなる、③蛋白や RNA と異なり DNA の解析なので細胞変性などの影響を受けにくい、などのメリットがある。また、我々はこれまでも卵巣癌で種々の癌抑制遺伝子メチル化に関する検討を行ってきたが、得られた DNA を用いて E-カドヘリンばかりでなく p16, APC, hMLH1 などの癌関連遺伝子の網羅的検討も行う。ここで得られた遺伝子データを手術時に得られたリンパ転移や筋層浸潤などの病理組織学的パラメーターと対比させ、癌治療の個別化となりうるものかどうかを検討する。

細胞接着分子の遺伝子治療への応用—最小量のベクターで最大の効果をめざす

近年、悪性腫瘍に対する遺伝子治療の有効性が数多く報告されその臨床応用が期待されたが、ベクターの毒性や腫瘍に対する特異性などの問題が未だ解決されたとはいえない。遺伝子治療においては、通常は目的遺伝子が組み込まれた細胞のみが障害を受けるのであるが、時にこの組み込まれた周辺の細胞にも障害をおよぼすことがある。このことをバイスタンダー効果と言うが、このメカニズムの一つにギャップ結合を介した細胞間コミュニケーション(GJIC)が関与していることが知られている(文献 4, 5, 6)。本研究ではこのメカニズムの癌治療への応用を目指す。このことによって、①少量のベクターで済むので副作用を最小限に抑えることが可能になる、②GJICは同種の細胞(癌細胞)にしか及ばないという性質があるので投与の仕方でも治療の特異性を高めることが可能になる、などの問題が解決される可能性がある。本研究の具体

目標としては、①子宮体癌および卵巣癌細胞を用いて実際に GJIC がバイスタンダー効果に寄与しているかを確認する、②まだコネキシンの発現などが検討されていない卵巣癌についてこれを行う、我々のこれまでの研究では性ステロイドが GJIC を制御することを報告してきたが(文献 6)③レチノイドや性ステロイドなどを用いて in vitro および in vivo で GJIC あるいはバイスタンダー効果を増強する方法の検討を行う、④ヌードマウスモデルを用いて実際に本研究の有効性を検証する、を到達点として研究を進める。

3. 研究の方法

1. 子宮体癌・卵巣癌でのコネキシン発現とバイスタンダー効果の関係

1) コネキシン 26 発現とバイスタンダー効果
コネキシンを全く発現していない HeLa 細胞を用い、子宮体癌・卵巣癌で発現しているコネキシン 26 をこれに遺伝子導入した。これらの細胞に HSV-tk 遺伝子を強制発現させコネキシン 26 を遺伝子導入していない細胞と 1 : 1 で共培養した。これに ganciclovir を添加することによってコネキシン 26 を発現している細胞としていない細胞での生細胞数や apoptosis の程度を比較し、バイスタンダー効果の有無を検討した。

2) 子宮体癌・卵巣癌細胞でのバイスタンダー効果の検討

子宮体癌・卵巣癌細胞で発現しているコネキシン26がバイスタンダー効果に関与していることが実証された段階で、子宮体癌・卵巣癌細胞を用いてバイスタンダー効果について検討した。ギャップ結合が正常に機能(=GJIC)するためにはコネキシンの発現ばかりでなくE-カドヘリンの発現が必須であることから、これらの発現を検討した後、GJICの程度とバイスタンダー効果の関係について検討する。GJICはScrape loading法で評価を行った。

3) レチノイン酸、性ステロイドがGJICに及ぼす影響の検討

子宮内膜および卵巣は生体内では性ステロイドの影響下にあり、子宮体癌・卵巣癌細胞においても性ステロイドがGJICに影響を及ぼす可能性がある。また、種々の細胞で細胞分化を引き起こすことが知られているレチノイン酸についても、同様の実験を行った。

① 子宮体癌・卵巣癌細胞それぞれ数株ずつピックアップし、これらの細胞よりRNAを抽出し性ステロイドレセプター(ER-a, ER-b, PR)およびレチノイン酸レセプター(RAR-およびRXR-)の発現をRealtime PCR

法で解析した。

② 上記細胞からレセプター発現があるものについて、エストロジェン、プロジェステロン、レチノイン酸を添加し、GJICがどの様に変化するか上記方法で観測した。上記実験でGJICに変化が得られるようであれば、レチノイン酸あるいは性ステロイドを添加した状態でバイスタンダー効果が増強されるかどうかについて検討した。

4. 研究成果

本研究によって、①少量のベクターで済むので副作用を最小限に抑えることが可能になる、②GJICは同種の細胞(癌細胞)にしか及ばないと言う性質があるので投与の仕方で治療の特異性を高めることが可能になる、などの問題が解決される可能性がある。平成23年度として、①子宮体癌および卵巣癌細胞を用いて実際にGJICがバイスタンダー効果に寄与しているかを確認する実験を行い、レチノイドの培養細胞への添加によってコネキシン mRNAの発現が上昇することをリアルタイムPCRによって確認した。②まだコネキシンの発現などが検討されていない卵巣癌についてこれを行い、卵巣癌細胞においてはコネキシン26と32が発現していることを確認した。我々のこれまでの研究では性ステロイドがGJICを制御することを報告してきた③レチノイドや性ステロイドなどを用いてin vitro およびin vivoでGJICあるいはバイスタンダー効果を増強する方法の検討を行い、レチノイドがGJICの形成に促進的に働くと同時に、レチノイドを加えた細胞ではHSV-tk とGCVを用いた系ではバイスタンダー効果が増強されることを証明した。

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 17 件)

1. Yoshihara K, Tsunoda T, Shigemizu D, Fujiwara H, Hatae M, Fujiwara H, Masuzaki H, Katabuchi H, Kawakami Y, Okamoto A, Nogawa T, Matsumura N, Udagawa Y, Saito T, Itamochi H, Takano M, Miyagi E, Sudo T, Ushijima K, Iwase H, Seki H, Terao Y, Enomoto T, Mikami M, Akazawa K, Tsuda H, Moriya T, Tajima A, Inoue I, and Tanaka K for The Japanese Serous Ovarian Cancer Study Group. High-Risk Ovarian Cancer Based on 126-Gene

- Expression Signature Is Uniquely Characterized by Downregulation of Antigen Presentation Pathway. *Clin Cancer Res.* 2012 Mar 1;18(5):1374-85. (査読有) DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2725
2. Takeda N, Suzuki T, Suzuki M, Matsuura M, Tanaka R, Fujii M, Ito E, Saito T. Evaluation of cervical conization as a definitive treatment for microinvasive cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *Arch Gynecol Obstet.* 2012 Feb;285(2):453-7. (査読有) DOI:10.1007/s00404-011-1944-4
 3. Endo T, Nagasawa K, Umemura K, Baba T, Henmi H, Saito T. A remarkably easy knot-tying technique for single-incision laparoscopic surgery with the SILS port for gynecologic diseases. *J Minim Invasive Gynecol.* 2011 Jul-Aug;18(4):500-2. (査読有) DOI:10.1016/j.jmig.2011.03.014
 4. Baba T, Endo T, Ikeda K, Shimizu A, Honnma H, Ikeda H, Masumori N, Ohmura T, Kiya T, Fujimoto T, Koizumi M, Saito T. Distinctive Features of Female-to-Male Transsexualism and Prevalence of Gender Identity Disorder in Japan. *J Sex Med.* 2011 Jun;8(6):1686-93. (査読有) DOI: 10.1111/j.1743-6109.2011.02252.x
 5. Suzuki M, Iwasaki M, Sugio A, Hishiya A, Tanaka R, Endo T, Takayama S, Saito T. BAG3 (BCL2-associated athanogene 3) interacts with MMP-2 to positively regulate invasion by ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2011 Apr 1;303(1):65-71. (査読有) DOI:10.1016/j.canlet.2011.01.019
 6. Sasaki Y, Negishi H, Idogawa M, Yokota I, Koyama R, Kusano M, Suzuki H, Fujita M, Maruyama R, Toyota M, Saito T, Tokino T. p53 negatively regulates the hepatoma growth factor HDGF. *Cancer Res.* 2011, 71:7038-47. (査読有) DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1053
 7. Matsuura M, Suzuki T, Suzuki M, Tanaka R, Ito E, Saito T. Statin-mediated reduction of osteopontin expression induces apoptosis and cell growth arrest in ovarian clear cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2011 Jan;25(1):41-7. (査読有) Doi: 10.3892/or_00001039
 8. Endo T, Hayashi T, Shimizu A, Matsuura M, Mizuuchi M, Nagasawa K, Ezaka Y, Baba T, Ishioka S, Saito T. Successful uterus-preserving surgery for treatment of chemotherapy-resistant placenta increta. *Gynecol Obstet Invest.* 2010;69(2):112-5. (査読有) DOI: 10.1159/000262320
 9. Matsuura M, Suzuki T, Saito T. Osteopontin is a new target molecule for ovarian clear cell carcinoma therapy. *Cancer Sci.* 2010 Aug;101(8):1828-33. (査読有) DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01615.x
 10. Suzuki M, Suzuki T, Matsuura M, Iwasaki M, Tanaka R, Ito E, Fujii M, Saito T. Prediction of histologic type and lymph node metastasis for advanced ovarian cancer on uterine cervical and endometrial cytology. *Acta Cytol.* 2010 Jul-Aug;54(4):575-81. (査読有) DOI: 10.1159/000325180
 11. Honnma H, Endo T, Kiya T, Shimizu A, Nagasawa K, Baba T, Fujimoto T, Henmi H, Kitajima Y, Manase K, Ishioka S, Ito E, Saito T. Remarkable features of ovarian morphology and reproductive hormones in insulin-resistant Zucker fatty (fa/fa) rats. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010 Jun 24;8:73. (査読有) DOI:10.1186/1477-7827-8-73
 12. Umemura K, Ishioka S, Endo T, Baba T, Ezaka Y, Nagasawa K, Takahashi M, Mizuuchi M, Iwami N, Adachi H, Takeda N, Tamagawa M, Saito T. Changes of uterine blood flow after vaginal radical trachelectomy (VRT) in patients with early-stage uterine invasive cervical cancer. *Int J Med Sci.* 2010, 7:260-6. (査読有) DOI:10.7150/ijms.7.260
 13. Asakura S, Mori M, Suzuki T, Saito T. A case-control study of endometrial cancer especially with reference to lifestyle and other factors of Japanese women. *Sapporo Medical Journal,* 78:1-6, 2009. (査読有)
 14. Baba T, Endo T, Sata F, Nagasawa K, Honnma H, Kitajima Y, Hayashi T, Manase K, Kanaya M, Moriwaka O, Kamiya H, Yamada H, Minakami H, Kishi R, Saito T. The contributions of

resistin and adiponectin gene single nucleotide polymorphisms to the genetic risk for polycystic ovary syndrome in a Japanese population. Gynecol Endocrinol. 2009 Aug;25(8):498-503. (査読有) DOI:10.1080/09513590902972042

15. Ishioka S, Ezaka Y, Endo T, Nagasawa K, Shimizu A, Sato A, Inoue M, Saito T. Outcomes of planned delivery delay in pregnant patients with invasive gynecologic cancer. Int J Clin Oncol. 2009 Aug;14(4):321-5. (査読有) DOI: 10.1007/s10147-008-0861-4
16. Baba T, Endo T, Kitajima Y, Kamiya H, Moriwaka O, Saito T. Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome and pituitary adenoma: incidental pregnancy triggers a catastrophic event. Fertil Steril. 2009 Jul; 92(1):390.e1-3.(査読有) DOI:10.1016/j.fertnstert.2009.02.071
17. Matsuura M, Suzuki T, Morishita M, Tanaka R, Ito E, Saito T. Chemotherapy (CT) with radiotherapy versus CT alone for FIGO Stage IIIc endometrial cancer. Eur J Gynaecol Oncol. 2009; 30:40-4. (査読有)

[学会発表] (計 2件)

1. 卵巣癌における BAG3 遺伝子発現 第48回日本臨床細胞学会学術総会(日本臨床細胞学会)(福岡・2009年10月30日~31日)
鈴木 美和・岩崎 雅宏・松浦 基樹・池田 桂子・梅村 康太・田中 綾一・鈴木 孝浩・伊東 英樹・斎藤 豪
2. オステオポンチンによる卵巣明細胞癌治療の可能性 第48回日本婦人科腫瘍学会学術講演会(つくば・2010年7月8日~10日)
鈴木 孝浩・松浦 基樹・鈴木 美和・田中 綾一・伊東 英樹・藤井 美穂・斎藤 豪

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 豪 (SAITO TSUYOSHI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：90145566

(2) 研究分担者

鈴木 孝浩 (SUZUKI TAKAHIRO)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：60398328

岩崎 雅宏 (IWASAKI MASAHIRO)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：20516504