

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25年6月14日現在

機関番号：82406
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22790364
 研究課題名（和文） 新規卵巣癌抑制遺伝子候補CTGFを指標とした卵巣癌化学療法個別化の試み
 研究課題名（英文） Analysis of CTGF, the new candidate of the tumor suppressor gene in ovarian cancer, for personalized anti-cancer therapy.
 研究代表者
 菊池 良子 (KIKUCHI RYOKO)
 防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・助教
 研究者番号:80535063

研究成果の概要（和文）：

卵巣明細胞腺癌細胞株OVISeと卵巣漿液性腺癌細胞株OVSAHOにおいてCTGFsiRNAを投与した群ではControlsiRNAを投与した群とくらべて、パクリタキセルの感受性が低い傾向がみられた。カルボプラチン、シスプラチン、ドキシソルビシンにおいてはOVISe, OVSAHOともに、CTGFsiRNAを投与した群とControlsiRNAを投与した群とで抗癌剤の感受性の違いはみられなかった。

研究成果の概要（英文）：

Knockdown of CTGF with specific small interfering RNAs in OVISe cells, the ovarian clear cell carcinoma cell line, and in OVSAHO cells, the ovarian serous carcinoma cell line enhanced resistance to apoptosis on exposure to paclitaxel, but not enhanced resistance to apoptosis on exposure to carboplatin, cisplatin and doxorubicin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	1,100,000	0	1,100,000
2012年度	800,000	0	800,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	0	3,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：分子病理・卵巣癌

1. 研究開始当初の背景

私たちがこれまでの研究で卵巣癌細胞株におけるArrayCGH解析により同定した新規卵巣癌抑制遺伝子候補CTGF(Connective Tissue Growth Factor)について、臨床病理検体を用いた免疫組織化学染色による臨床病理学的因子との関連に着目した解析によりCTGFが化学療法の感受性に関与している可能性があった。

CTGFについて、防衛医科大学校で外科的に切除された卵巣がん検体262例（化学療法施行症例のみ）の臨床病理検体（Tissue Microarray検体）を用いて、免疫組織化学染色によりCTGFの発現と臨床病理学的因子との関連に着目した解析を行ったところ、全例（一般化Wilcoxon test $p=0.068$ ）

ならびに病期Ⅲ, IV例($p=0.033$)の解析にてCTGF陰性群はCTGF陽性群に比べ早期死亡例が多い傾向を示し、手術後に残存腫瘍のあった症例127例では、CTGF陽性群は陰性群に比し、全例(80% vs 60% $p=0.051$)、とくに進行期である病期Ⅲ, IV例(82% vs 58% $p=0.024$)の解析にてCTGFの発現のある群で化学療法の奏効率が高い傾向を示した。また、組織型では明細胞腺癌において有意にCTGFの発現の頻度が低かった($p=0.0022$)。そのため、病期Ⅲ, IV例におけるCTGFの発現と化学療法感受性について、臨床的に抗癌剤の効果の高いとされている組織型と低いとされている組織型2群（漿液性腺癌および類内膜腺癌症例と明細胞腺癌および粘液性腺癌症例）にわけて

検討したところ、CTGF陽性群は陰性群に比し、抗癌剤の効果の高いとされている漿液性腺癌および類肉膜腺癌症例(87% vs 67% p=0.069)において抗癌剤の効果の低いとされている明細胞腺癌および粘液性腺癌症例(33% vs 40% p=1.000)にくらべ化学療法の奏効率の高い傾向を示した。以上の結果より、私たちは、抗癌剤の情報伝達系にCTGFの発現が関与している可能性に着目するに至った。

2. 研究の目的

卵巣癌抑制遺伝子候補であり卵巣癌化学療法において抗癌剤の作用機序に関与すると思われるCTGFという因子に着目して、これまで未知であった抗癌剤の作用機序におけるCTGFの役割を明確にすることを目的とした。

(1) そのため、臨床病理検体を用いた免疫組織化学染色による検討で化学療法の感受性がCTGF陽性例で優位に高い傾向(Yates 2x2 Chi square test p=0.045)にあったCAP療法に含まれる抗癌剤(Cyclophosphamide、Adriamycin、Cisplatin)とCTGF陽性例で優位はみられなかったものの同様の傾向を示したTJ療法に含まれる抗癌剤(Carboplatin、Paclitaxel)について、卵巣癌細胞株を用いて、CTGFの発現の変化による卵巣癌細胞死への影響の違いを検討することを目的とした。

(2) また、卵巣癌の抗癌剤作用機序におけるCTGFの情報伝達系に関与する分子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 卵巣癌細胞株を用いて、臨床病理検体を用いた解析でCTGFが化学療法の感受性に関与している可能性のあった抗癌剤について、CTGFsiRNAによって細胞増殖が変化するかWST-8 Assayを用いて検討した。

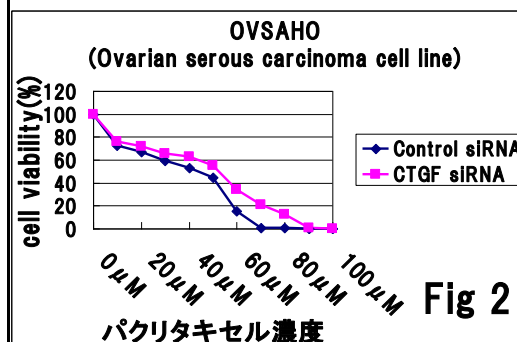
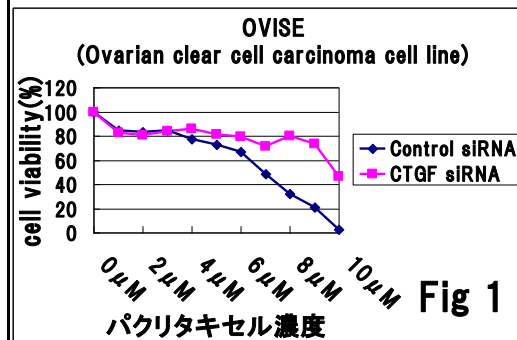
(2) また、蛍光標識二次元ディファレンシャルゲル電気泳動法の系を立ち上げ、卵巣癌の抗癌剤作用機序におけるCTGFの情報伝達系に関与する可能性のある分子の同定を試みた。

蛍光標識二次元ディファレンシャルゲル電気泳動法(2D-DIGE法)とはサンプル間でタンパク質発現量の比較を行う解析手法であり、異なる試料から抽出したタンパクを異なる蛍光色素で標識し、それを二次元電気泳動にて各々のタンパク分子を等電点のpHと分子量によって分離展開し、蛍光強度の差で異なる試料間での分子タンパク発現の差を網羅的に検討する方法である。当教室の2D-DIGE法で使用している蛍光試薬はCyDye DIGE Fluor minimal dyeであり、タンパク質のリジン残基をラベルして観察する。リジン残基を持たないタンパク質はヒトタンパク質データベースに登録されているタンパク質全体の0.58%であるといわれており、蛍光色素の特性からして観察できないタンパク質の数はたいへん少なく、理論的にはほとんどのタンパク質を網羅しうる。

一元目の等電点電気泳動には、市販のIPGストリップゲル(一定のpH勾配になったポリアクリルアミドゲル)を用いるが、ヒトタンパク質データベースに登録されているタンパク質のうち、等電点が4から10の間のタンパク質の数は全体の95.5%に相当し、この間のpHレンジのIPGストリップゲルを使用することで、ほとんどのタンパク質を網羅しうる。タンパク質の二次元目の分離にSDS-PAGE法を使用し、一般的に一次元目の分離にIPGストリップゲルを使用する場合、SDS-PAGE法は分子量が10から200kDaのタンパク質を網羅する。ヒトタンパク質データベースに登録されているタンパク質のうち、分子量が10から200kDaのタンパク質は全体の94.7%に相当し、二次元目の分離にSDS-PAGE法を使用する2D-DIGE法は、分子量の制限からしてもほとんどのタンパク質を網羅しうる(Genome Medicine Database of Japan)。卵巣癌において抗癌剤の作用機序におけるCTGFの情報伝達系に関与するタンパク質は全く未知であり、これを網羅的に解析するには良い手段であると考えた。

4. 研究成果

(1) 卵巣明細胞腺癌細胞株OVISe、卵巣漿液性腺癌細胞株OVSAHOにおいてCTGFsiRNAを投与した群ではControl siRNAを投与した群とくらべて、パクリタキセルの感受性が低い傾向がみられた(Fig 1, 2参照)。カルボプラチン、シスプラチン、ドキシソルビシンにおいてはOVISe, OVSAHOともに、CTGFsiRNAを投与した群とControl siRNAを投与した群とで抗癌剤の感受性の違いはみられなかった。



(2) 卵巣癌細胞株において、低酸素暴露下でCTGFの発現が低下する傾向があり、低酸素になることによって抗癌剤耐性になることから、正常酸素分圧暴露下と低酸素暴露下での卵巣癌細胞株におけるタンパク発現の違いを蛍光標識二次元電気泳動法(2D-DIGE法)を用いて解析したところ、3つの卵巣癌細胞株(RMUG-S, ES-2, KFr13)で低酸素暴露下でタンパク発現が減少するタンパク質スポットを検出した(Fig 3, 4, 5の赤丸で囲ったスポットが当該タンパク質スポット)。RMUG-Sは卵巣粘液性腺癌細胞株、ES-2は卵巣明細胞腺癌細胞株、KFr13は卵巣漿液性腺癌細胞株である。このタンパク質スポットをCBB染色にて染色したゲルより切り出し、In gel digestion法にてトリプシン消化し、MALDI-TOF-MSを用いてMascot解析にて解析したところ、このタンパク質スポットはHSC70であることがわかった。HSC70とCTGFの情報伝達系の連関については現在解析中である。

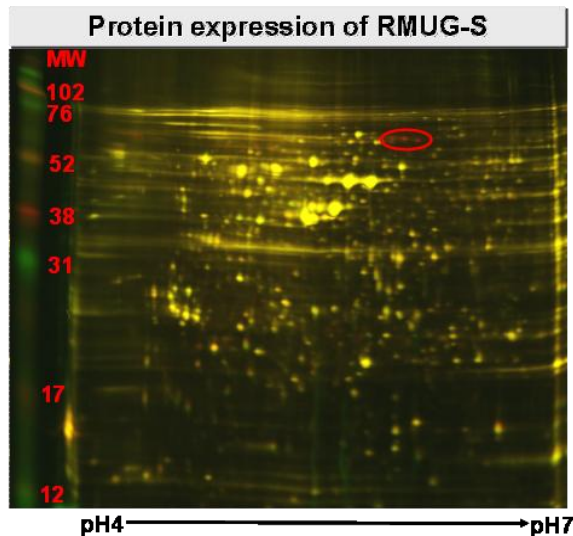


Fig 3

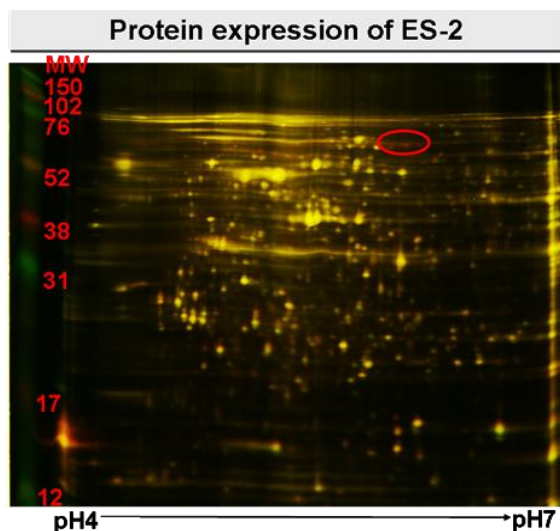


Fig 4

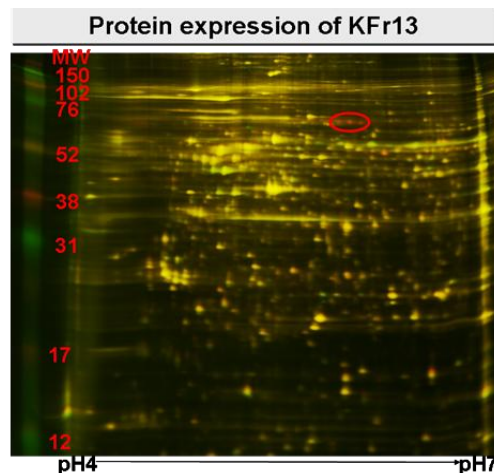


Fig 5

乳癌でのパクリタキセルの耐性機序におけるCTGFの役割については、すでに報告がある(Lai D et al. Cancer Res. 71:2728-38, 2011)が、卵巣癌でのパクリタキセル耐性機序におけるCTGFの役割については現在報告がない。私たちの成果では興味深いことに乳癌とはパクリタキセルの耐性機序における働きが逆である。私たちは、臓器によってCTGFの働きは異なると考えており(Kikuchi R et al. Cancer Res. 67:7095-7105, 2007)、今後、解析を進めていきたいと考えている。

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4件)

- ①Oda M, Iwaya K, Kikuchi R, Kobayashi T, Yoneda T, Nishikawa K, Matsubara O, Kohno N, Stathmin is involved in the cooperative effect of Zoledronic acid and gefitinib on bone homing breast cancer cells in vitro.、Journal of Bone Oncology、査読有、Vol. 1、2012、pp. 40-46
- ②Kikuchi R, Iwaya K, Matsubara O, Proteome analysis of ovarian cancer cell lines under hypoxic condition by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) [abstract].、In: Proceedings of the 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research: 2012 Mar 31-Apr 4; Chicago, Illinois. Philadelphia (PA): AACR; 2012. 査読有、2012、p 462. Abstract nr 3948
- ③Takano M, Kikuchi Y, Kudoh K, Goto T, Furuya K, Kikuchi R, Kita T, Fujiwara K, Shiozawa T, Aoki D、Weekly administration of temsirolimus for heavily pretreated patients with clear cell carcinoma of the ovary: a report of six cases.、International Journal of Clinical Oncology、査読有、Vol. 16、2011、pp. 605-609
- ④Kudoh K, Takano M, Kouta H, Kikuchi R, Kita T, Miyamoto M, Watanabe A, Kato M, Goto T, Kikuchi Y、Effects of bevacizumab and pegylated liposomal doxorubicin for the patients with recurrent or refractory ovarian cancers.、Gynecologic Oncology、査読有、Vol.122、2011、pp. 233-237

[学会発表] (計3件)

- ①菊池良子、井本逸勢、嘉屋隆介、三宅清彦、茂木真、坂本優、田中忠夫、岡本愛光、松原修、稲澤譲治、アレイCGH解析による卵巣癌関連遺伝子の同定と分子細胞診断への応用、日本臨床細胞学会、2012年11月9日～11月10日、新潟
- ②小田美規、岩屋啓一、菊池良子、山田公人、海瀬博史、松原修、河野範男、乳癌の骨転移に関与するstathminの過剰発現と抗腫瘍効果との関連、第20回日本乳癌学会学術総会、2012年6月28日～6月30日、熊本
- ③菊池良子、岩屋啓一、松原修、低酸素暴露下の卵巣癌細胞株のプロテオーム解析、第101回日本病理学会総会、2012年4月26日～4月28日、東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

菊池 良子 (KIKUCHI RYOKO)

防衛医科大学校・

医学教育部医学科専門課程・助教

研究者番号：80535063