

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月12日現在

機関番号： 15501
 研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 23791845
 研究課題名（和文） 子宮頸癌の新たなバイオマーカーの検索—測定系の確立と分子標的治療への応用—
 研究課題名（英文） Research of new biomarker for cervical cancer
 研究代表者
 末岡 幸太郎 (SUEOKA KOTARO)
 山口大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号： 40452643

研究成果の概要（和文）：子宮頸部扁平上皮癌組織で増加する蛋白である HSP70 に着目し研究を行った。(1)HSP70 の蛋白発現は6種類の子宮頸癌細胞株全てで増加していた。(2) HSP70 発現を抑制すると、抑制遊走能および浸潤能は有意に抑制され、また、シスプラチンによるアポトーシスの誘導は増加した。

子宮頸癌における HSP70 の発現抑制は癌の増殖、浸潤・転移に抑制的に作用するだけでなく、抗癌剤の作用を増強させることが示された。

研究成果の概要（英文）：HSP70, which was expressed in the uterine squamous cell carcinoma tissue, was high expressed in the all six SCC cell lines. Knockdown of HSP70 expression significantly suppressed cell proliferation, cell migration and cell invasion. HSP70 knockdown was enhanced apoptosis induced by the treatment with CDDP.

In conclusions, our data suggested that HSP70 plays roles in cell migration, invasion and proliferation and built up the effect of apoptosis by CDDP treatment of SCC cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：産婦人科学

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：子宮頸癌、扁平上皮癌、HSP70

1. 研究開始当初の背景

(1)現在、子宮頸癌に罹患する患者は若年化しており、それに伴い子宮温存は極めて重要な問題である。従って、早期発見、早期治療が欠かせないが、早期発見のための子宮癌検診の受診率は本邦では約20%と諸外国と比較して極めて低い。検診の啓蒙活動はもちろんであるが、検診を受け入れやすい方法、例えば採血による検査で子宮頸癌のスクリーニングが可能となれば、その意義は非常に大きいと思われる。当教室で見出し、現在広く臨床応用されている子宮頸部扁平上皮癌の腫瘍マーカーであるSCCは、早期癌では陽性率は低い

という問題点がある。

(2)最近の悪性腫瘍治療では分子標的治療薬が注目されているが、このような薬剤の開発には網羅的な発現蛋白の解析が必須であり、標的となる分子を同定することが鍵となる。残念ながら現在のところ、子宮頸癌に有効な分子標的治療薬は報告されていない。発現蛋白の網羅的解析にはプロテオーム解析が行われているが、一般的には同一症例から癌部と非癌部を採取して蛋白発現の差異を比較し、解析する。しかしながら、子宮頸癌は容易に正常子宮腔部を占拠するため、正常上皮の採取が極めて困難であり、これが子宮頸癌の解

析が進まない最大原因と考える。我々は正常子宮腔部組織と扁平上皮癌組織のプロテオーム解析を比較し、網羅的解析を初めて報告した。扁平上皮癌で明らかに増加する蛋白として、Transgelin, Protein disulfide-isomerase (PDI), HSP70, HSP27を同定した(福島千加子、村上明弘、杉野法広 子宮頸癌の検出方法 特開 2010-203988)。

2. 研究の目的

我々のプレリミナリーな研究で、これまでに報告した扁平上皮癌で明らかに増加する蛋白のうち、HSP70 の免疫組織染色を行ってみると、異形成から微小浸潤癌までの連続した切片において、非癌部(異形成)では HSP70 の発現はごく軽度であるが、癌部では全層性に強く発現していることが明らかとなった。HSP70 は初期癌の検出には有望な蛋白の候補であると考え、今回特に着目して検討を行うこととした。

そこで、HSP70 蛋白が本当に初期の子宮頸癌の腫瘍マーカーとして利用可能となるか、多数例の臨床検体を用いて蛋白発現を検討する。すなわち、摘出標本の組織からの抽出液を用いたウェスタンブロットや、組織切片を用いた免疫組織染色により、初期癌でも発現しているかを確認したい。有望な結果が得られれば、組織切片を用いるのではなく、より簡便に測定し評価できるようにするために血液検体を利用した測定系(EIA、ELISA等の免疫測定系)の確立を目指したい。さらに、HSP70 蛋白が癌細胞内で果たす生物学的機能を解析し、今後、分子標的治療のターゲットとなるかについて検討を進めていきたい。

3. 研究の方法

(1) 多数例での臨床検体での検討を行うことと、癌の早期から発現を検討するために、正常扁平上皮組織、早期癌組織、進行癌組織における手術摘出組織からの抽出液を用いて、HSP70 の発現強度をウェスタンブロット法で検討した。

(2) ヒト子宮頸癌細胞株(BOKU、ME-180、SiHa、SKG I、SKG II、SKG IIIa)においても同様に、ウェスタンブロット法で、HSP70 の発現強度を検討した。

(3) そのうちSiHa、SKG II細胞株において siRNA法によりHSP70の発現を抑制したうえで、以下の具体的な機能について解析した。

①vi-CELL counter により増殖能および細胞周期について検討した。またHSP70は抗アポトーシス作用を有すると言われており、HSP70

発現を抑制していない細胞と抑制した細胞を、アポトーシス初期の段階をとらえるため、アネキシンV陽性かつヨードプロピディウム陰性の細胞を、フローサイトメトリーによって検出した。アポトーシス細胞の割合を比較することで、アポトーシスに対する影響を検討した。

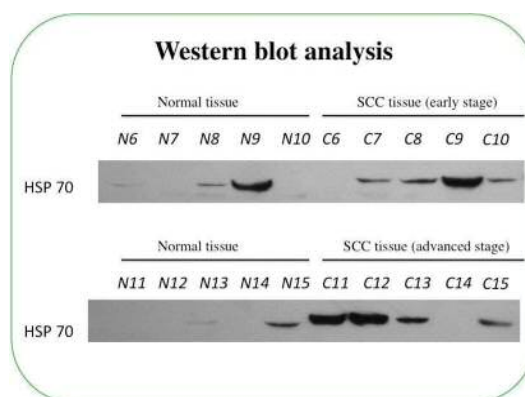
②スクラッチアッセイにより遊走能について検討。

③インベーションアッセイにより浸潤能について検討。

④子宮頸癌治療におけるキードラッグであるシスプラチンを用いて、抗癌剤が誘導するアポトーシスに対する影響を、今回の培養系で検討した。①と同様の方法でフローサイトメトリーによって、アポトーシス細胞を検出し、その割合を比較することで、シスプラチンによるアポトーシス誘導に対するHSP70の働きを検討した。

4. 研究成果

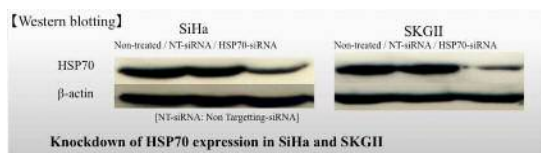
(1) 蛋白発現の検討では癌で10例中8例、正常組織で10例中3例でHSP70の発現を認めた。特に早期症例でもよく発現していることが示された。



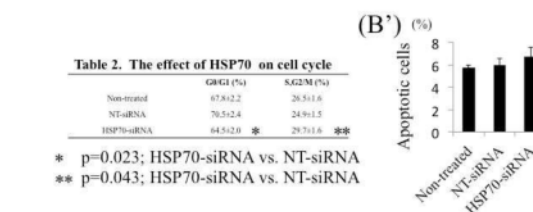
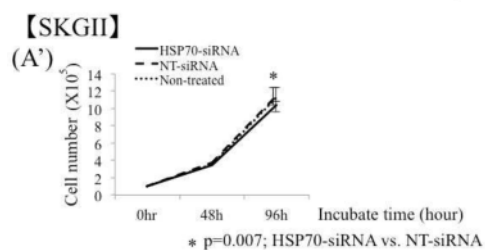
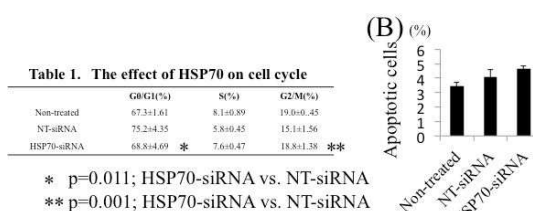
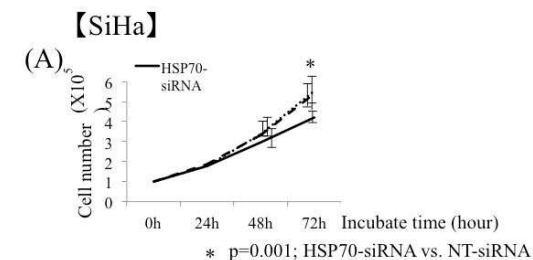
(2) また細胞株での検討でも、正常細胞であるケラチノサイトと比較し、今回検討した6種類すべての子宮頸癌細胞株でHSP70の発現は増加していた。



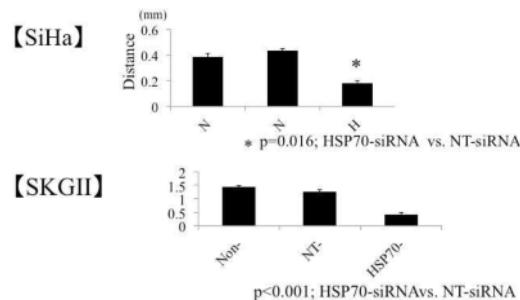
(3) HSP70の機能解析は、以下に示す発現抑制クローンを作成して行った。



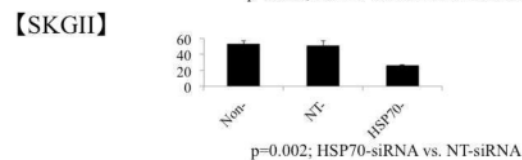
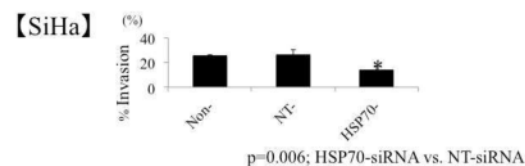
①HSP70の発現抑制により増殖能は有意に抑制され、細胞周期はG2/M期に停止が認められた。なお、単独でアポトーシスに対する影響には有意差を認めなかった。



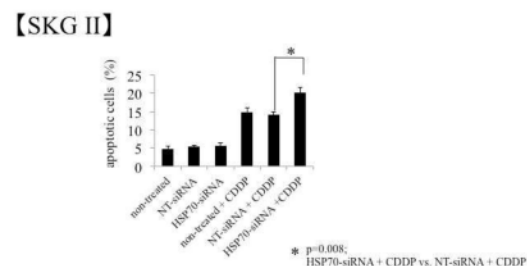
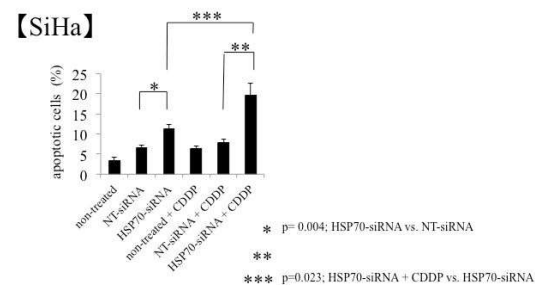
②HSP70の発現抑制により遊走能は有意に抑制された。



③HSP70の発現抑制により浸潤能は有意に抑制された。



④HSP70の発現抑制によりシスプラチン添加で誘導されたアポトーシス細胞の割合は有意に増加した。



まとめると、HSP70は初期子宮頸癌でも発現の増強が認められ、またHSP70の発現を抑制することにより、癌の増殖、浸潤・転移を抑制するだけでなく、シスプラチンのアポトーシス誘導作用を増強させることが示された。このことからHSP70は子宮頸部扁平上皮癌の分子マーカーになり得る可能性が示唆され、その発現抑制は従来の抗癌剤治療に加えた新規の癌分子標的治療としての抗腫瘍作用の増強が期待できると考えられた。

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)

〔学会発表〕(計7件)

(1) 吉富恵子 子宮頸部扁平上皮癌における

HSP70 の機能解析 日本癌治療学会
2012. 10. 25-27 パシフィコ横浜 (横浜)

(2) Kotaro Sueoka, Role of Heat Shock Protein 70 (HSP70) in cell proliferation, migration and invasion of uterine cervical squamous cell carcinoma cells. 14th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society 2012. 10. 13-15 Vancouver (Canada)

(3) 吉富恵子 子宮頸部扁平上皮癌における HSP70 の機能解析 日本婦人科腫瘍学会
2012. 7. 19-21 グランドプリンスホテル高輪 (東京)

(4) 吉富恵子 子宮頸部扁平上皮癌における HSP70 の機能解析 日本産婦人科学会
2012. 4. 13-15 神戸ポートピアホテル (神戸)

(5) 吉富恵子 子宮頸部扁平上皮癌で発現が増加している HSP70 の機能解析 日本癌治療学会
2011. 10. 19 名古屋国際会議場 (名古屋)

(6) 吉富恵子 子宮頸癌で発現が増加している HSP70 の機能解析 日本産婦人科学会
2011. 8. 29-31 リーガロイヤルホテル (大阪)

(7) 吉富恵子 子宮頸癌で発現が増加している HSP70 の機能解析 日本婦人科腫瘍学会
2011. 7. 24 札幌コンベンションセンター (札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末岡 幸太郎 (SUEOKA KOTARO)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40452643