

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592520

研究課題名(和文) 卵巣癌腹膜播種に対する Tat ペプチドをベクターとしたカルポニン h1 遺伝子治療

研究課題名(英文) Calponin h1-gene therapy using Tat-peptide vector against peritoneal dissemination of ovarian cancer

研究代表者

小林 裕明 (Kobayashi, Hiroaki)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：70260700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：アクチン結合蛋白カルポニンh1 (CNh1)は細胞骨格蛋白アクチンを安定化させるので、卵巣がん治療の分子標的となりうるその責任部位を同定することとした。CNh1全長とCNh1の構造の一部を卵巣癌株に導入した。免疫染色で外因性CNh1の局在とアクチン重合度合を検討し、細胞の増殖能、運動能、浸潤能に与える影響も検討した。アクチン重合比率はCNh1全長で73%、カルポニンリピート構造(CNR1)で66%とコントロール(36%)に比べて高率を示し、細胞形態も変化した。CNh1全長やCNR1を導入した細胞は、増殖能、細胞運動能、浸潤能のすべてが有意に抑制された。CNR1は分子標的になりうると思われた。

研究成果の概要(英文)：Objectives: Actin binding protein calponin h1 (CNh1) stabilizes cytoskeletal actin. We tried to identify the responsibility site in actin stabilization which can be a molecular target for ovarian cancer therapy. Methods: The full length or several mutant form of CNh1 were constructed and introduced into ovarian cancer cell lines. Immunocytochemistry was performed to evaluate the localization of transfected CNh1 and the level of actin polymerization. The growth, migration and invasion ability of transfected cells were also measured. Results: The ratio of actin polymerization was revealed as follows: 73% in CNh1 full length transfection; 66% in calponin repeat structure (CNR1); 36% in mock transfection. The cell morphology changed depending on the actin polymerization. The growth, migration and invasion ability were significantly suppressed in both CNh1 full length and CNR1 introduced cells.

Conclusion: CNR1 was suggested to become a molecular target for ovarian cancer therapy.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：カルポニンh1 アクチン 細胞骨格蛋白質 卵巣癌 癌性腹膜炎 分子標的治療 Tat ペプチド 膜透過性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

卵巣がん治療の大きな障壁として腹膜播種という難治性の進展様式が挙げられる。卵巣の原発巣から遊離した癌細胞が腹膜中皮に着床した後、浸潤・増殖し播種巣を形成していくという癌性腹膜炎の成立機序を考えると、その過程において癌細胞-腹膜中皮細胞間の相互作用が重要な役割を果たしていることは容易に推察できるが、この細胞間相互作用に着目して癌性腹膜炎の治療を考えた研究は国内外を通じて少数である。

研究代表者らは以前の科研費による研究テーマにもあるように、特に癌細胞-腹膜中皮細胞間の相互作用に着目しながら研究を進めてきた。分子量34kd のアクチン結合蛋白質であるアクチン結合蛋白質カルポニンh1

(Calponin h1: CNh1) は主に平滑筋細胞に発現されるが、MgATPase の抑制を介した平滑筋収縮の調節、アクチンの重合促進および脱重合の抑制などの作用に加えて、Rho kinase の基質でありMAPK やPKC のシグナル伝達にも関わっていることが明らかとなっている。最近、Ramaswamy らは各種臓器由来の腺癌について転移巣で普遍的に発現低下する遺伝子を大規模に検索したが、得られた9 つの遺伝子の大半が細胞骨格関連分子で、その中にCNh1 も含まれており転移関連分子としても着目されている(Nat Genet, 2003)。共同研究者である信州大学の谷口俊一郎博士らはCNh1 の発現が低下している平滑筋肉腫の細胞にCNh1 を強制発現させると増殖抑制をもたらすこと(JNCI, 1999 等)、ヒト線維肉腫細胞株であるHT1080 細胞に対してはCNh1 遺伝子導入が細胞運動能や接着能を抑制し浸潤能を低下させることを報告した(Eur J Cancer, 2002)。

研究代表者らもCNh1 に関して、

(1) 卵巣癌細胞は血小板由来増殖因子(PDGF)などの液性因子を放出して、周囲間質細胞のCNh1 や平滑筋型 アクチン(α-SMA)などの細胞骨格関連蛋白の発現を低下させ、自己の

間質浸潤にとって有利な環境を生み出している可能性があること。

(2) 腹膜播種における宿主側のバリアである腹膜中皮細胞にCNh1 を遺伝子導入すると、細胞骨格(アクチンストレスファイバー)が安定し、腹膜中皮細胞層が卵巣癌細胞の浸潤を抑制したこと。

(3) 卵巣癌細胞自身にCNh1 を遺伝子導入すると、アクチンストレスファイバーの発達を伴う細胞形態の伸展が生じ、増殖能および浸潤能が低下したこと。

(4) 腹膜中皮と卵巣癌の両細胞にCNh1 を遺伝子導入すると、培養系(in vitro)では更に癌細胞は腹膜中皮層に浸潤し難くなり、担癌ヌードマウス(in vivo)では腹膜播種の抑制と生存期間の延長が得られたこと。

を報告した(Kobayashi et al., Gynecol Oncol 1993, Clin Cancer Res 2006)。

以上の結果より、CNh1 は癌細胞の増殖・浸潤を抑制するばかりでなく、宿主側細胞である腹膜中皮細胞の癌浸潤に対するバリアとしての機能を高める作用も有すると考えられ、CNh1 遺伝子治療は同一遺伝子が癌抑制と宿主防御能の増強という二面的効果を有する新しい遺伝子治療となる可能性が示された。

しかし、アデノウイルスをベクターとした遺伝子治療はすでに臨床で試みられたものの、施行する際の煩雑な手続きや安全性に関する問題、ウイルスに対する中和抗体の出現による効果減弱(繰り返しの治療に不向き)の問題などがあり、実臨床に応用するには不向きと思われた。そこで、本研究では臨床応用しやすい安全なベクターとしてTat ペプチドに着目し、これにCNh1 の作用部位ペプチドを結合したCNh1 - Tat 合成ペプチドを用いたCNh1 遺伝子治療の可能性を検討することとした。

Tat ペプチドはHIV-1 ウイルス由来のTAT (Trans-Activator of Transcription Protein)が細胞膜を通過し、細胞質内へ移行することが報告されて以来、ベクターとして

注目されてきたペプチドである。すなわち、HIV ウイルス由来の細胞膜透過能を持つ10個のアミノ酸から構成されるペプチドで、細胞膜のマクロピノサイトーシスで効率よく細胞内に取り込まれる。これまでに細胞毒性の報告はなく動物実験にも安全に投与され、欧米ではすでに約20のPhase や の臨床試験も行われている。その後も同様の作用を有するペプチドがいくつか見つかかり、膜透過性ペプチド (Cell Penetrating Peptide : CPP) と総称されるようになった。CPP をタンパク質、ペプチド、低分子化合物に結合することで、これらの分子を細胞内へ導入し機能させる技術が開発され、ドラッグデリバリーをはじめとする様々な分野で注目されているベクターである。

2 . 研究の目的

前述のように、動物実験でもその有効性を確認したCNh1の強制発現による卵巣がん腹膜播種に対する分子標的治療を臨床応用可能とするために、我々は安全に人体投与可能なベクターとして高い導入効率を持ちながら細胞毒性を示さないTat ペプチドに着目した。臨床に応用する場合は、CNh1 の作用部位ペプチドを結合したCNh1 - Tat 合成ペプチドを作成するわけであるが、CNh1の全長を組み込むことは困難である。そこでCNh1のタンパク質構造のうちアクチンの安定化に有効な最小部位のアミノ酸配列を同定することを本研究の目的とした。

3 . 研究の方法

- (1) CNh1 遺伝子のどの部分がCNh1 遺伝子全長導入と同様の効果を発揮するか、腹膜中皮細胞と卵巣癌細胞の培養系で検証する。
- (2) 上記で有効と判明した遺伝子部分に対応するCNh1 ペプチドをTat ペプチドに融

合させ、CNh1 - Tat 合成ペプチドを作成する。それがCNh1 遺伝子導入と同様の効果を発揮するか、腹膜中皮細胞と卵巣癌細胞の培養系で検証する。

4 . 研究成果

平成 24 年度に、CNh1 全長や CNh1 の構造の一部を GFP 標識して発現ベクターに組み込み、卵巣癌細胞株 SKOV3i.p.-1 と SHIN-3 に導入した。免疫染色でアクチンの重合度合およびアクチンと外因性 CNh1 の局在を検討した。その結果、細胞質内のアクチン重合比率は CNh1 全長で 71%、カルボニリピード構造だけ (以下、CNR) でも 41%と GFP のコントロール (6%) に比べて高率を示し、細胞形態にも変化を認めた。アクチンの重合部位に一致して GFP が局在していた。卵巣癌細胞において CNR は CNh1 全長と同様に機能し、アクチンの重合を促進しアクチンファイバーを生じさせた。CNR は標的治療の候補になりうると考えられた。

平成 25 年度は、CNR ががん細胞の運動能、浸潤能、増殖能に与える影響を検討した。その結果、細胞運動能と浸潤能は有意に抑制したが、増殖能は変化なかった (CNh1 全長では細胞増殖能も抑制された)。

平成 26 年度は、細胞増殖も抑制しうるアミノ酸配列を再度 CNh1 の全長から探索した。CNR1 は CNR のさらに小部分の配列であるが、これを卵巣癌細胞株 SKOV3i.p.-1 と SHIN-3 に導入したところ、細胞質内のアクチン重合比率は CNh1 全長で 73%に対し、CNR1 では 66%と GFP のコントロール (36%) に比し高率であった。良好なアクチン重合促進効果が確認できたため、CNR1 が卵巣がん細胞の運動能、浸潤能、増殖能に与える影響を検討した。CNR では認めなかった卵巣がん細胞への有意な増殖抑制効果が確認できた。以上より、CNR1の方が CNR より、Tat ペプチドに融合させる

べき候補と考えられた。

今後は CNR1 の腹膜中皮細胞への影響を評価し、満足する結果が得られたら、CNR1 ペプチドを Tat ペプチドに融合させ、それが卵巣癌細胞と腹膜中皮細胞に容易に取り込まれ、同様の細胞効果を発揮するか検証したい。

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7件)

Satoh T, Aoki Yo, Kasamatsu T, Ochiai K, Takano M, Watanabe Y, Kikkawa F, Takeshima N, Hatae M, Yokota H, Saito T, Yaegashi N, Kobayashi H, Baba T, Kodama S, Saito T, Sakuragi N, Sumi T, Kamura T, Yoshikawa H: Administration of standard-dose BEP regimen(bleomycin + etoposide + cisplatin) is essential for treatment of ovarian yolk sac tumour. Eur J Cancer 査読有、51 (3): 340-351, 2015 doi: 10.1016/j.ejca.2014.12.004

Kawamura K, Kaneki E, Ogawa S, Imamura H, Ohishi Y, Kobayashi H, Kato K: Primary uterine müllerian mucinous borderline tumor (MMBT) associated with adenomyosis: a case report. Int J Gynecol Pathol. 査読有、33(2): 146-150, 2014 doi: 10.1097/PGP.0b013e318288b364

Eto T, Saito T, Shimokawa M, Hatae M, Takeshima N, Kobayashi H, Kasamatsu T, Yoshikawa H, Kamura T, Konishi I: Status of treatment for the overall population of patients with stage IVb endometrial cancer, and evaluation of the role of preoperative chemotherapy: a retrospective multi-institutional study

of 426 patients in Japan.

Gynecol Oncol. 査読有、131(3): 574-580, 2013

doi: 10.1016/j.ygyno.2013.08.036

Katsumata N, Yoshikawa H, Kobayashi H, Saito T, Kuzuya K, Nakanishi T, Yasugi T, Yaegashi N, Yokota H, Kodama S, Mizunoe T, Hiura M, Kasamatsu T, Shibata T, Kamura T

Phase III randomized controlled trial of neoadjuvant chemotherapy plus radical surgery vs radical surgery alone for stages IB2, IIA2, and IIB cervical cancer: a Japan Clinical Oncology: Group trial (JCOG 0102).

Br J Cancer. 査読有、108(10): 1957-1963, 2013

doi: 10.1038/bjc.2013.179

Takeuchi T, Ohishi Y, Imamura H, Aman M, Shida K, Kobayashi H, Kato K, Oda Y Ovarian transitional cell carcinoma represents a poorly differentiated form of high-grade serous or endometrioid adenocarcinoma.

Am J Surg Pathol. 査読有、37(7): 1091-1099, 2013

doi: 10.1097/PAS.0b013e3182834d41

Matsumoto T, Hiura M, Baba T, Ishiko O, Shiozawa T, Yaegashi N, Kobayashi H, Yoshikawa H, Kawamura N, Kaku T Clinical management of atypical polypoid adenomyoma of the uterus. A clinico-pathological review of 29 cases Gynecol Oncol. 査読有、129(1): 54-57, 2013 doi: 10.1016/j.ygyno.2012.12.040

Li D, Takao T, Tsunematsu R, Morokuma S,

Fukushima K, Kobayashi H, Saito T, Furue M, Wake N, Asanoma K

Inhibition of AHR transcription by NF1C is affected by a single nucleotide polymorphism, and is involved in suppression of human uterine endometrial cancer

Oncogene 査読有、32(41): 4950-4959, 2013
doi: 10.1038/onc.2012.509

〔学会発表〕(計4件)

ポスター； 卵巣癌腹膜播種の分子標的治療に向けたカルボニンh1 遺伝子の構造解析
山根敬子、浅野間和夫、小林裕明、八木裕史、恒松良祐、園田顕三、和氣徳夫、加藤聖子
第73回日本癌学会学術総会
平成26年9月26日 (神奈川県横浜市)

血管新生ターゲットとした卵巣癌治療の到来：基礎から臨床まで

小林裕明：
鹿児島分子標的治療学術講演会
平成26年6月24日 (鹿児島県鹿児島市)

卵巣癌細胞におけるカルボニン h1 遺伝子の機能解析と応用(カルボニンリピート1配列の有効性の検討)

山根敬子、浅野間和夫、北出尚子、八木裕史、恒松良祐、小林裕明、和氣徳夫、加藤聖子
第12回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会
平成25年7月6日 (奈良県奈良市)

卵巣癌腹膜播種に対する Tat ペプチドをベクターとしたカルボニン h1 遺伝子治療の試み
山根敬子、小野山一郎、八木裕史、北出尚

子、園田顕三、小林裕明、和氣徳夫
第64回日本産科婦人科学会学術講演会
平成24年4月14日 (兵庫県神戸市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 裕明 (KOBAYASHI HIROAKI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：70260700