

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670707

研究課題名(和文) 卵巣癌におけるアイソフォーム特異的TrkBシグナルのEMT関連機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis on TrkB signal change in ovarian cancer associated with epithelial mesenchymal transition

研究代表者

後藤 優美子 (GOTO, Yumiko)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：50624574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣に豊富に存在する神経栄養因子受容体TrkBに着目し、卵巣癌におけるTrkBの発現と、TrkBが誘導する上皮間葉転換シグナルを解明すること目的とした。まず、TrkBタンパクが卵巣癌で高発現し、特に明細胞腺癌の浸潤部で強く発現することを免疫染色により明らかにした。次に卵巣癌で発現するTrkB分子構造をRT-PCRにより明らかにし、明細胞腺癌ではTrkBシグナルを弱める働きを持つTrkB-Shc、TrkB-T1アイソフォームの発現が病期の進行とともに低下することを示した。卵巣癌細胞株でも卵巣癌組織と同様のTrkBアイソフォームの発現変化が観察され、細胞株を用いたTrkBシグナル解析を行う。

研究成果の概要(英文)：We focused on neurotrophin receptor TrkB which exists abundantly in ovary. We investigated TrkB expression in ovarian cancer and epithelial mesenchymal transition (EMT) signal induced by TrkB. We elucidated that TrkB over expression was observed in ovarian cancer, especially in clear cell adenocarcinoma by immunohistochemistry. We also found that TrkB-Shc and TrkB-T1 isoform which suppress tyrosine kinase signal decreased with advanced stage. We used cell lines of ovarian cancer and we obtained the same founding as above. We will analyse TrkB signal associated with EMT using these cell lines.

研究分野：産婦人科

キーワード：卵巣明細胞腺癌 TrkB BDNF アイソフォーム 上皮間葉転換

### 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌の組織型は悪性度と関連があり、悪性度は明細胞腺癌及び粘液性腺癌で高い。しかし、これらの悪性度の高さを規定する癌遺伝子は明らかになっていない。腫瘍の悪性転化を誘導すると考えられている上皮間葉転換 (EMT) はまだ培養細胞やマウスでは同定されているものの、患者組織では同定されていない。その同定を含め、腫瘍型固有の悪性度を規定する性質を明らかにすることは急務である。近年、卵巣を含む婦人科系組織において TrkB の発現が報告されているが、この分子は脳由来神経栄養因子 BDNF をリガンドとする受容体型チロシンキナーゼであり、チロシンキナーゼ (TK) 部位の活性化を通じて細胞の生存維持に関わる事が明らかになってきている。TrkB にはドメインの有無を含め 3 種のアイソフォームが優位であるが、ヒト TrkB は 24 個のエクソンを持ち、理論上 100 以上のアイソフォームを形成する可能性がある。TrkB のリガンドである BDNF は、卵巣に豊富に存在することが知られ、TrkB とともにオートクラインなシグナルを誘導することができる。そこで我々は TrkB の分子構造の変化によるシグナル変容が卵巣癌の発生・進行に関与する可能性に着目した。癌化に伴う遺伝子発現の変化に関わる機構として、突然変異ではなく、スプライシング機構の変化の関与も禁煙指摘されている。本研究では卵巣癌組織型によっては、スプライシング機構の変化により TrkB 癌遺伝子が発現し、癌化が誘導される可能性を検討する。

### 2. 研究の目的

BDNF/TrkB は神経栄養因子及びその受容体であり、卵巣を含む婦人科系組織にも発現し、腫瘍においてもその重要性が報告されている。本研究では、卵巣腫瘍組織型における各々の TrkB アイソフォームの発現とそれに伴うシグナル変化が誘導する上皮間葉転換シグナルの解明を目的とする。具体的な研究項目は以下の 3 点である。

- (1) 卵巣及び各種卵巣癌における TrkB アイソフォーム及びスプライシングバリエント発現プロファイルの解析
- (2) 患者ゲノムの TrkB 遺伝子解析及びスプライシングバリエントとの相関分析
- (3) TrkB アイソフォームの関連シグナルと上皮間葉転換の関連性

### 3. 研究の方法

(1) 卵巣癌の各組織型に発現している TrkB 分子構造の解明 (参照: 図 1)

卵巣癌の各組織型における TrkB 分子の発現の局在を明らかにする。

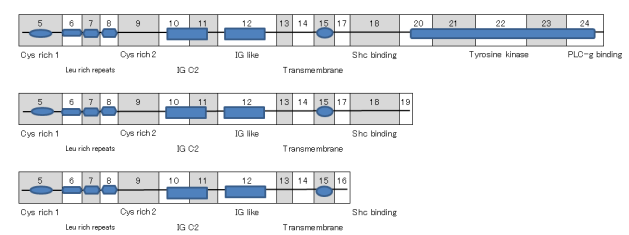
卵巣癌の各組織型における TrkB 分子の発現の局在を明らかにする。

卵巣癌の手術摘出標本のパラフィン包埋切片について、市販の抗 TrkB 抗体を用いて免疫組織化学線染色を行う。抗体は TrkB の細胞外ドメインを認識する抗体と、細胞内の TK 部位を認識する抗体の 2 種類を用いる。これにより、各組織型で発現する TrkB が TK 部位を持つ完全長型であるか、もたない型であるかを判別することができる。また、正常対照群となる良性卵巣腫瘍、子宮内膜等について免疫組織化学染色を行い、TrkB 分子の局在を明らかにする。卵巣癌の各組織型において発現している TrkB の分子構造を明らかにする。

卵巣癌の手術摘出凍結標本を用いて RNA 抽出を行う。TrkB の細胞外の BDNF 結合部位、より細胞膜に近い部位、細胞膜部位、細胞内の TK 部位、Shc 結合タンパク、等の主要な部位を認識するプライマーを設計し、RT-PCR を行う。RNA レベルで変異が明らかになった検体については、さらに cDNA 遺伝子配列を次世代シーケンサーにより明らかにする。これにより、各組織型で発現する TrkB の分子構造を明らかにする。患者ゲノムの DNA 解析を行う。

具体的には上記の新鮮凍結標本を用いて DNA を抽出し、DNA レベルでの卵巣癌特異的な変化があるか否かを cDNA とゲノムの遺伝子配列を比較することにより明らかにする。これにより、発現している TrkB の分子構造がスプライシングの変化によるものなのか、DNA の突然変異などによるものなのかを明らかにする。

< 図 1 > TrkB スプライシングバリエントの構造



(2) BDNF/TrkB シグナル変容に関する生化学的解析 (参照: 図 2)

(1) で明らかになった卵巣癌に発現する TrkB の分子構造が、既知の 3 つのアイソフォームと同じである場合に BDNF/TrkB シグナルの変容が生じているか、また、既知の 3 つのアイソフォームとは異なる場合に BDNF/TrkB シグナルにどのような変化がみられるか、を明らかにする。

手術摘出標本を用いて卵巣癌における BDNF/TrkB シグナルの変容を明らかにする。

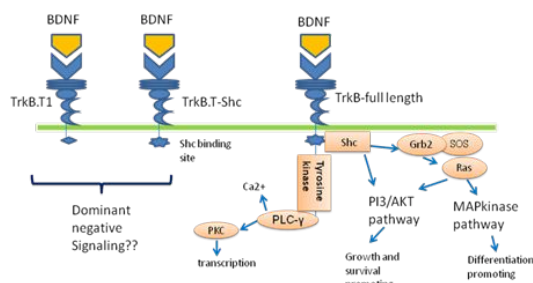
新鮮凍結標本を用いて、当該組織で発現している TrkB がどのようなタンパク質分

子であるのかについて、SDS-PAGE 及び Western blotting 法を用いて解析する。また、o-banadate (脱リン酸化酵素阻害剤) の存在下で新鮮凍結標本より組織のタンパクを抽出し、抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降を行った後、SDS-PAGE と immunoblotting によりチロシン及びセリン・スレオニン等のリン酸化された TrkB タンパクの下流シグナルの変異の有無を明らかにする。

卵巣癌細胞株を用いて BDNF/TrkB シグナルの変容を解析する。

まず、(1) で明らかになった TrkB の分子構造が各組織型卵巣癌培養細胞株に発現しているかを明らかにする。もし細胞株に特定された TrkB の分子構造と同じ構造がみられない場合には、遺伝子組み換えによりその構造を細胞株に発現させる。と同様に TrkB の分子構造を導入した細胞株で発現しているタンパク質分子を SDS-PAGE 及び Western blotting 法を用いて解析し、さらに抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降を行い SDS-PAGE と Western blotting 法により下流タンパク質のリン酸化の有無を明らかにする。また、同時に Snail, Zeb など EMT 関連遺伝子群の発現がこれらのアイソフォーム発現により動くかどうかについても解析する。

#### < 図 2 > TrkB のアイソフォームと BDNF/TrkB シグナル



#### (3) 卵巣癌における BDNF/TrkB シグナルの機能解析

卵巣癌では、卵巣に豊富な BDNF と TrkB のオートクラインなシグナル形成が示唆される。卵巣癌における BDNF/TrkB シグナルについてさらに詳しく機能解析を行う。

卵巣癌細胞株およびその TrkB トランスフェクタントを用いて、BDNF の添加、あるいは BDNF 阻害剤、TrkB 阻害剤の添加により、細胞増殖や分化・生存にどのような影響を及ぼすかを明らかにする。具体的には、BDNF の添加により細胞増殖・分裂能や卵巣癌化学治療で汎用されるパクリタキセル、カルボプラチン等の抗がん剤耐性が増強され、BDNF 阻害剤・TrkB 阻害剤により細胞増殖・分裂能や抗がん剤耐性が低下する

ことが予想される。

さらに、TrkB アイソフォームトランスフェクタントの EMT の亢進について、トランスウェルを用いた細胞移動の解析を行い、EMT が生じるのかについて解析を行う。

#### 4. 研究成果

初年度において、卵巣癌の 4 つの主な組織型において TrkB 分子の細胞外ドメイン、細胞内ドメインともに、良性組織に比べて発現が亢進していることを免疫染色により明らかにした。特に、明細胞腺癌の浸潤部において TrkB が強く発現していた。また、卵巣癌の各組織型において発現している TrkB の分子構造を RT-PCR により明らかにした。明細胞腺癌では TrkB-T-Shc、TrkB-T1 アイソフォームの mRNA 発現が病期の進行とともに相対的に低下し、BDNF 結合ドメインの欠如を含む多様なアイソフォームの形成を多く認めた。また cDNA 遺伝子配列を次世代シーケンサーにより解析し、遺伝子変異は認めなかった。

最終年度では、卵巣癌細胞株を用いて BDNF/TrkB シグナルの解析を行った。卵巣明細胞腺癌の細胞株では、上記の卵巣癌組織と同様の TrkB 分子アイソフォームの発現変化が観察された。また細胞株で発現しているタンパク質分子を SDS-PAGE 及び Western blotting 法を用いて解析し、TrkB-TK、TrkB-T-Shc、TrkB-T1 のアイソフォーム発現を確認した。明細胞腺癌での細胞株では正常なアイソフォームの mRNA 発現が他の組織型の細胞株に比べて低下していた。

今後、上皮間葉転換に関する分子と TrkB 分子の関連について卵巣癌組織および卵巣癌細胞株を用いて研究を行う。

#### 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 1 件)

Yumiko Goto, Yoshie Kametani, Atsuko Kikugawa, Banri Tsuda, Masaki Miyazawa, Hiroshi Kajiwara, Yasuhisa Terao, Susumu Takekoshi, Naoya Nakamura, Satoru Takeda, Mikio Mikami.

Defect of tropomyosin-related kinase B isotype expression in ovarian clear cell adenocarcinoma.

BioScience Trends, 査読有、8 巻、2014、93 - 100

DOI:10.5582/bst.8.93

##### [学会発表](計 8 件)

Yumiko Goto, Atsuko Togo, Akane Kondo,

Toshinari Muramatsu, Hitoshi Ishimoto. A case of postpartum cardiomyopathy after bromocriptine use to treat depression. 2014 Pregnancy Summit. 2014年10月. ロンドン(イギリス)

Yumiko Goto, Atusko Togo, Kanako Mitsuzuka, Osamu Nishimura, Yoshihiro Nishijima, Takahiro Suzuki, Toshinari Muramatsu, Hitoshi Ishimoto. Surgicla treatment of retained products of conception with preoperative endovascular embolization: effectiveness and pitfalls. 2014 International Federation of Placenta Associations. 2014年9月. パリ(フランス)

Yumiko Goto, Kanako Mitsuzuka, Osamu Nishimura, Kazumi Takahashi, Yuko Ohnuki, Akane Kondo, Mitsuko Mizoguchi, Shinichiro Izumi. Genetic counseling for a pregnant woman with Marfan syndrome. 2014 European Society of Human Genetics. 2014年5月. ミラノ(イタリア)

後藤優美子、榎山知明、平野結希、林優、田島敏樹、池田仁恵、信田政子、平澤猛、石本人士、和泉俊一郎、三上幹男. CIS、IA1期の円錐切除後に傍大動脈リンパ節転移・再発をきたした2症例 臨床的および病理学的検討. 第66回日本産科婦人科学会学術講演会. 2014年4月. 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

後藤優美子、亀谷美恵、宮澤昌樹、三上幹男. 卵巣明細胞腺癌において多様なTrkBアイソフォームの発現が亢進している 第72回日本癌学会学術講演会. 2013年10月. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Yumiko Goto, Akane Kondo, Shigeru Sato, Yuko Ohnuki, Hiromi Moriya, Keiko Tsuji, Hiroko Yokoyama, Shunichiro Izumi. A case report : Hirschsprung's Disease in three sisters. 2013 European Society of Human Genetics. 2013年6月. パリ(フランス)

後藤優美子、塚田ひとみ、池田仁恵、信田政子、平澤猛、松井成明、加戸伸明、宮嶋葉子、伊藤仁、井ノ元智恵、梶原博、中村直哉、三上幹男. 分娩後に持続する不正性器出血を契機に診断された胎盤部トロポブラスト腫瘍(PSTT)の一例. 第32回日本臨床細胞学会神奈川県支部学術集会. 2013年9月. 相模原南メディカルセンター(神奈川県・相模原市)

後藤優美子、榎山知明、簡野康平、三島典子、三塚加奈子、呉屋憲一、西村

修、鈴木隆弘、石本人士、和泉俊一郎、三上幹男. 下腸管膜動脈の分枝により栄養されていたと考えられる胎盤ポリープの一例. 第65回日本産科婦人科学会学術講演会. 2013年5月. 札幌市教育文化会館(北海道・札幌市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

後藤 優美子 (GOTO, Yumiko)  
東海大学・医学部・助教  
研究者番号: 50624574