

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860245

研究課題名(和文) 子宮内膜症関連卵巣発癌機構の新規バイオマーカーの探索と早期血清診断法への臨床応用

研究課題名(英文) Identification of LEFTY as a molecular marker for ovarian clear cell carcinoma: its relationship to apoptosis and cell proliferation

研究代表者

松本 俊英 (Matsumoto, Toshihide)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：10623184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：病理検体を用いたショットガンプロテオミクス法により、卵巣明細胞腺癌(OCCCa)でLeftyタンパク質が検出された。Leftyは他の組織型に比してOCCCaで有意に高発現であった。Lefty安定発現培養細胞株を作製したところ、pSmad発現量の低下と細胞増殖能の低下が認められ、また抗癌剤添加時はpSmad2を介したXIAPを抑制し、結果としてapoptosisが亢進した。OCCCa臨床検体においても、Lefty高発現症例は、高いapoptosisと低いKi-67 LIが認められた。それら結果より、LeftyはOCCCaにおいて抗腫瘍作用として機能する新規バイオマーカーである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We focused on Lefty, the protein identified by shotgun proteomics analysis. Lefty expression level was significantly higher in OCCCas compared with non-OCCCas. OCCCa cells stably overexpressing Lefty reduced cell proliferation, along with decreased pSmad2 expression and either activated p53/p21waf1 pathway or increased p27kip1 expression directly or indirectly. Moreover, treatment of the stable cells with cisplatin exhibited increased apoptotic cells, together with inhibition of pSmad2-mediated XIAP expression and decreased ratio of bcl2/bax. In clinical samples, a significantly higher number of apoptotic cells and lower Ki-67 LI were observed in OCCCa with high Lefty score relative to those with low score. These findings suggest that Lefty may be an excellent OCCCa-specific molecular marker, which has anti-tumor effects altering cell proliferation and susceptibility to apoptosis.

研究分野：人体病理学

キーワード：卵巣明細胞癌 ショットガンプロテオミクス Lefty バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮内膜症関連卵巣癌の問題点

卵巣癌は、その解剖学的位置関係から、画像による早期診断は困難なことが多い。また、卵巣癌発癌機構の解析も大幅に遅れており、分子標的薬を含む新規治療法の開発へも深刻な影響を及ぼしている。最近、一部の卵巣癌(明細胞腺癌(OCCCa)・類内膜腺癌)の前駆病変として、子宮内膜症性卵巣嚢胞が注目されている。これは、月経を有する約10%の女性に認められる現代病で、治療法として、40歳代で6cm以上、閉経後は大きさによらず全て摘出することが推奨されている。しかしながら、手術侵襲や術後後遺症等のリスクを考慮すると、癌合併を予知する新規診断法の確立が望まれる。

(2) ショットガンプロテオミクス法によるタンパク質の網羅的解析

プロテオミクス法は、タンパク質を二次元電気泳動法で展開し、質量分析により新規バイオマーカーを網羅的に探索する手法である。しかし、その解析には、凍結試料の状態により様々な制限があった。そこで、予めタンパク質をトリプシンで分解し、直接質量分析で測定・同定するショットガンプロテオミクス法が開発された。最近、申請者の研究協力者らにより、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)材料からタンパク質を高率に抽出し、ショットガンプロテオミクスで解析する方法を報告した(Kawashima et al. *Clin Proteomics* 2014)。加えて、マイクロダイセクションの併用により、病変部で特異的に発現するタンパク質を効率よく解析することが可能になった。申請者は、この応用型ショットガンプロテオミクスによる先行実験で、①熱処理によりFFPE材料からのタンパク質回収率が増加する、②抽出したタンパク質は、western blot法で、最大90kDaまで検出可能である、③16ブロックの卵巣癌(漿液性、粘液性、OCCCa、類内膜性(OEmCa))FFPE材料で、合計1521種のタンパク質が同定できた、④その内、52種のタンパク質は、OCCCaに特異的に発現するタンパク質であった、などを明らかにした。これらの結果から、FFPE材料+マイクロダイセクション+ショットガンプロテオミクス法により、OCCCaに特異的に発現するタンパク質を同定できると同時に、その発現制御系を利用した新規診断法の応用に展開できるとの立案に至った。

2. 研究の目的

卵巣癌FFPE検体より抽出したタンパク質を用いた新技術ショットガンプロテオミクス法により網羅的に解析し、OCCCaに特異的に発現するタンパク質を同定することにより新規バイオマーカーを探索する。さらに、同定した分子の発現制御機構を解明し、新規診断法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 臨床材料

北里大学病院にて2000年から2015年まで外科的切除された上皮性卵巣癌90症例(OCCCa 46、OEmCa 13、漿液性 18、粘液性 13)のFFPE材料を用いた。また、41症例(OCCCa 11、OEmCa 11、漿液性 8、粘液性 11)の凍結材料は、RT-PCR、Western Blot法に用いた。

(2) FFPE材料を用いたショットガンプロテオミクス法

卵巣癌FFPE材料を10 μ mで薄切後、脱パラフィンを行い、レーザーマイクロダイセクション(LMD)法で腫瘍成分のみを抽出し、タンパク質分解酵素(Trypsin, Lys-C)により消化し、直接質量分析を行い解析する。質量分析器は、Thermo Scientific社製EAST-nLC 1000/Q Eactiveを使用し、MASCOTデータベース検索によりタンパク質を同定する。

(3) 免疫染色法

免疫染色は、マイクロウェーブ加温による賦活化とポリマー免疫複合法を組み合わせて行った。一次抗体として抗Lefty抗体、抗pSmad2抗体、抗XIAP抗体、抗Ki-67抗体を用いた。評価方法は、染色強度と陽性細胞率から算出したIHC score(0~12)で評価を行った。

(4) RT-PCR法

凍結材料をIsogen(ニッポン・ジーン)によりtotal RNAを抽出し、Prime Script II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara)によりcDNAを合成し、PCR反応により増幅を行った。

(5) Western Blot法

凍結組織をRIPA Buffer(50mM/L, Tris-HCL(pH7.2), 1%Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate)によりタンパク質を抽出した。一定量のタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、PVDF膜に転写後、一次抗体を反応させた。検出はECL検出システム(Amersham Pharmacia Biotechnology)を用いた。

(6) Apoptosis解析

HE染色した標本を用いてアポトーシス細胞を検出する。ランダムに選出した20視野中のアポトーシス細胞の平均値を算出し評価を行う。また、*In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche)を用いたアポトーシス細胞の検出を同時に行った。

(7) 遺伝子導入

OCCCa細胞株ES-2及びTOV-21G、子宮内膜癌細胞株IshikawaにLipofectAMINE PLUS(Invitrogen)試薬を用いて遺伝子導入した。タンパク質発現系については、pcDNA3.1

(Invitrogen) へ human-Lefty A、-Lefty B、-Smad2 の発現ベクターを作製し、プロモーター解析には、pGL-3B (Promega) へ human-Lefty B promoter、-XIAP promoter を組み込んだベクターを作製した。

(8) Flow cytometry

細胞を 70% アルコールにて固定を行い、核染色液 PI (propidium iodide; Sigma-Aldrich) を用いて解析を行った。Flow cytometer は BD FACS Calibur (BD Biosciences) を使用した。

(9) メチレーション解析

培養細胞から Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega) を用いて genomic DNA を抽出し、EZ DNAMethylation-Gold kit (ZYMO Research) により Bisulfite 処理を行った。Bisulfite 処理した DNA は、Lefty B 遺伝子の CpG 領域の Primer を用いて増幅した後 TA cloning を行い、各サンプル 4 クローンずつ 3130 Genetic Analyser により塩基配列の解析を行った。

(10) 統計解析

Mann-Whitney U-test、Spearman の順位相関係数は Statview (SAS Institute) を用いて解析をした。統計学的有意性の基準は $p < 0.05$ とした。

4. 研究成果

(1) 上皮性卵巣癌 FFPE 検体を用いたショットガンプロテオミクス法

卵巣癌 FFPE 検体を各組織型 4 症例ずつから抽出したタンパク質を用いてショットガンプロテオミクス法により網羅的に解析した。解析の結果、夫々の組織型において共通に同定されたタンパク質は、OCCCa で 1267 種、類内膜で 1248 種、漿液性で 1521 種、粘液性で 1346 種のタンパク質が検出され、うち 52 種のタンパク質は OCCCa にのみ同定された (図 1)。その中で最も高いシグナルで検出されたタンパク質は Left-right determinant factor (Lefty) であった。Lefty は、TGF- β superfamily として知られており、細胞の分化や増殖に関与することが報告されているが、腫瘍における報告は乏しいため、以後詳細な検討を行った。

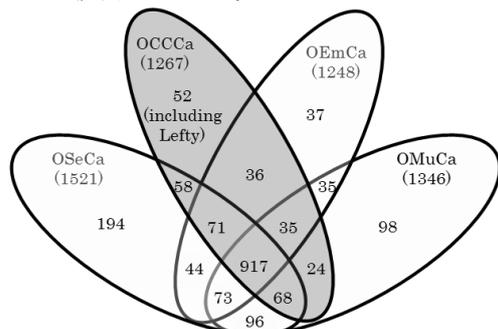


図 1. 卵巣癌検体のショットガンプロテオミクス法

(2) OCCCa における Lefty 発現の解析

卵巣癌の病理検体を用いて免疫染色法を行ったところ、Lefty は OCCCa 細胞の細胞質において強い染色性を認め、その他の組織型においては陰性または弱陽性反応であった。染色結果を数値化した結果、Lefty は OCCCa において他の組織型に比して有意に高発現であったが、臨床病理学的因子との相関性はなかった。また、卵巣癌凍結材料を用いた Western Blot 法の結果、免疫染色と同様、OCCCa において Lefty は高発現であった。Lefty を code する mRNA 発現レベルにおいては、Lefty B mRNA 遺伝子発現は OCCCa で高発現であり、タンパク質発現と正の相関関係であった (図 2)。

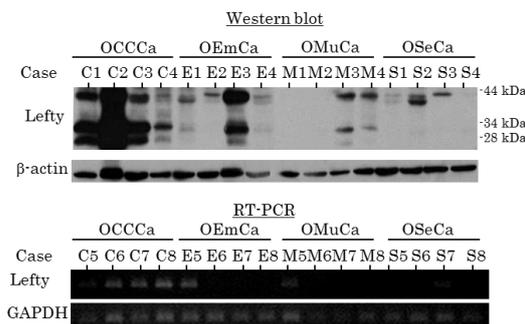


図 2. 臨床検体を用いた Lefty 遺伝子・タンパク質解析

培養細胞を用いた Western Blot 法の結果、OVCSE 株 (OCCCa) 及び Ishikawa 株 (OEmCa) は TGF- β 刺激により Lefty、pSmad2 発現が亢進した (図 3)。Luciferase assay の結果、Lefty B promoter は TGF- β 、Smad2 により活性が亢進した。

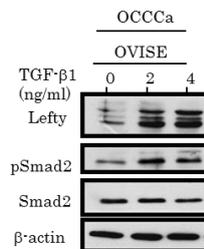


図 3. TGF- β 刺激によるタンパク質発現変化

Lefty 遺伝子は、TGF- β による脱メチル化によりタンパク質発現が制御されていることが報告されている。そこで、培養細胞を用いてメチレーション解析を行ったところ、TGF- β による明らかな脱メチル化は検出されず、タンパク質発現との相関性は認められなかった。

(3) Lefty 発現と細胞増殖能

培養細胞である TOV-21G 株 (OCCCa) に Lefty B 遺伝子の発現ベクターをトランスフェクションし、Lefty 恒常発現株を作製した。Lefty 恒常発現株は mock 株に比して、細胞増殖能が低下しており、タンパク質発現においても pSmad2 の発現低下と p53、p21^{waf1} の発現亢進が認められた。免疫染色結果からも、Lefty

高発現の症例においては Ki-67 Labeling Index は低く、細胞増殖能とは負の相関関係であった (図 4)。

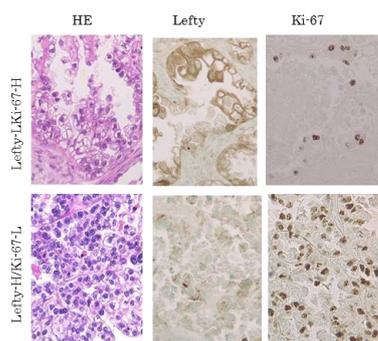


図 4. Lefty 発現と Ki-67 染色性の相関性

(4) Lefty 発現とアポトーシスとの関連性解析

Lefty 恒常発現株に抗がん剤 Cisplatin を添加すると、mock 株に比してアポトーシス細胞の増加が Flow Cytometry において観測された (図 5)。Western Blot 法では、p53, bax, p21^{waf1}, cleaved caspase 3 が高発現であり、pSmad2 と XIAP は発現が低下していた。臨床材料においても、Lefty の発現とアポトーシス細胞数は正の相関性が認められており、Lefty 高発現症例はアポトーシス細胞数も有意に増加していた。

(5) Lefty は pSmad2 を介した XIAP 発現を抑制する

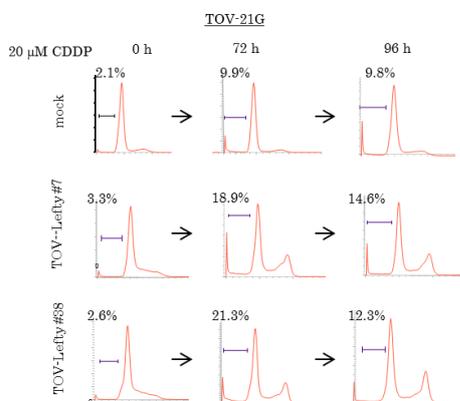


図 5. Lefty 過剰発現系のシスプラチンによるアポトーシス誘導の促進

アポトーシス抑制因子である XIAP は、TGF- β 刺激によりタンパク質、mRNA とともに発現亢進していた。Luciferase assay において、XIAP promoter は Smad2 により活性が亢進するが、Lefty B を同時にトランスフェクションすることにより、その活性が低下することが明らかとなった。さらに、Lefty 恒常発現株において、XIAP 発現は低下していた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① Matsumoto T, Yamazaki M, Takahashi H, Kajita S, Suzuki E, Tsuruta T, Saegusa M. Distinct β -catenin and PIK3CA mutation

profiles in endometriosis-associated ovarian endometrioid and clear cell carcinomas. Am J Clin Pathol. 査読有、144、2015、452-463

DOI: 10.1309/AJCPZ5T2P00FMQVN

[学会発表] (計 4 件)

① 松本俊英、高橋博之、山崎真瑛、鶴田智子、橋村美紀、梶田咲美乃、三枝信：子宮内膜症関連卵巣発癌に関与する分子機構の解析 第 103 回日本病理学会総会 (20140424). 広島国際会議場 (広島県広島市)

② 松本俊英、山崎真瑛、高橋博之、梶田咲美乃、鈴木エリ奈、鶴田智子、三枝信： β -catenin および PIK3CA 遺伝子変異に基づく子宮内膜症性卵巣発癌の解析 第 104 回日本病理学会総会 (20150502). 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

③ 松本俊英、高橋博之、橋村美紀、梶田咲美乃、小栗康子、三枝信：卵巣癌肉腫発生過程における TGF- β /Smad2/Lefty 系依存性上皮間葉転換機構の解析 第 105 回日本病理学会総会 (20160513). 仙台国際センター (宮城県仙台市)

④ 松本俊英、秋谷昌史、川島祐介、小寺義男、高橋博之、三枝信：卵巣明細胞腺癌の発癌・進展過程における Lefty の機能解析 日本プロテオーム学会 2016 年大会 (20160729). 北里大学薬学部 白金キャンパス (東京都港区)

[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

松本 俊英 (MATSUMOTO, Toshihide)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：10623184

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

三枝 信 (SAEGUSA, Makoto)

小寺 義男 (KODERA, Yoshio)

川島 祐介 (KAWASHIMA, Yusuke)