

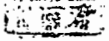
財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2005 年 2 月 22 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 谷 麗君  (印)

指導責任者名： 工藤 美樹 職名： 教授

所属機関名： 広島大学大学院医歯薬学総合研究科  
〒734-8551

所在地： 広島市南区霞 1-2-3

電話： 082-257-5262 内線： 5262

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

cDNA アレイ技術を用いた卵巣癌細胞の浸潤、転移機構に係わる新規遺伝子異常の同定

3. 成果の概要 (100字程度)

患者の同意の下に採取した卵巣癌症例より cDNA アレイ技術を用いて、新規遺伝子異常の同定を行った。さらにそれらの mRNA の発現を semiquantitative PCR 法、蛋白の発現を Immunohistochemistry 法で検討し、臨床病理学的所見と遺伝子発現の相関を解析し、その遺伝子変化が卵巣癌の発生、進展に及ぼす役割やその臨床的意義について考察した。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ (有) (学会名・演題)

第 56 回日本産科婦人科学会学術講演会

上皮性卵巣腫瘍における IGF mRNA-binding Protein (IMP) の発現と予後因子としての有用性に関する検討

第 36 回日本婦人科腫瘍学会・学術集会

上皮性卵巣癌における セリンプロテアーゼ TADG-15 の発現と予後因子としての有用性に関する検討

(2) 発表した論文 無 ・ (有) (雑誌名・題名)

Br J Cancer. 2005 Jan 31;92(2):278-83.

Transmembrane serine protease TADG-15 (ST14/Matriptase/MT-SP1): expression and prognostic value in ovarian cancer.

## cDNA アレイ技術を用いた卵巢癌細胞の浸潤、転移機構に係わ

### る新規遺伝子異常の同定

研究者氏名： 谷麗君  
中国所属機関： 中国大連医科大学附属第一病院婦産科  
日本研究機関： 広島大学大学院医歯薬学総合研究科産科婦人科  
指導責任者： 教授 大濱 紘三（2004年4月退官）  
教授 工藤 美樹  
共同研究者名： 重政和志，谷本博利，Timothy J. O' Brien

#### 要旨

卵巢癌細胞の間質組織への浸潤能及び腹腔内の転移能に関与する遺伝子異常の同定を行うことに焦点を絞り、cDNA アレイ技術を用いて、間質浸潤能を欠く卵巢境界悪性腫瘍 VS 卵巢限局浸潤型悪性腫瘍及び腹腔内転移陽性型卵巢癌 VS 卵巢限局浸潤型卵巢癌の組み合わせで遺伝子変化の検索を行い、新規遺伝子異常の同定を行うことを目的とする。

患者の同意の下に採取した対象症例より抽出した mRNA を用いて、Spotlight chemiluminescent kit もしくは 32p 標識を行った cDNA プローブを作成し、Atlas Nylon cDNA Expression Array にハイブリダイズし、シグナルを検出する。Atlas image 1.5 を用いて結果を分析し、境界悪性腫瘍と卵巢限局浸潤型悪性腫瘍の間及び腹腔内転移陽性型卵巢癌と卵巢限局浸潤型卵巢癌の間でその発現に差異を認める遺伝子変化を抽出していく。同定された遺伝子変化を確認するために、さらに多数の卵巢腫瘍症例におけるそれらの mRNA の発現を semiquantitative PCR 法、蛋白の発現を Immunohistochemistry 法で検討し、臨床病理学的所見と遺伝子発現の相関を解析し、その遺伝子変化が卵巢上皮の癌化のどの段階で出現し、またその発現変化と腫瘍の浸潤、転移がどう関連しているか検討する。

**Key Words** 卵巢癌，cDNA アレイ，遺伝子，Semiquantitative PCR，Immunohistochemistry

#### 研究項目 I: 上皮性卵巢腫瘍における IGF mRNA-binding Protein (IMP) の発現と予後因子としての有用性に関する検討

#### 緒言:

卵巢腫瘍組織より得られた poly A<sup>+</sup> RNA を鋳型にして調製したプローブを用いて cDNA マイクロアレイを行い、卵巢癌組織で過剰発現する遺伝子を網羅的に検索し、その過程で同定された遺伝子のひとつである、IGF-II mRNA-binding protein (IMP) に着目した。IGF II mRNA-binding protein (IMP-1、-2、-3) は mRNA の安定性や局在また蛋白への翻訳を調節する機能を有し、特に癌遺伝子 c-myc の mRNA と結合してその発現を増加させる機能や細胞骨格蛋白  $\beta$ -actin の mRNA と結合して細胞の運動性を亢進させる機能を介して、各種の癌腫の発生や進展に関与するとされている。そこで、本研究では上皮性卵巢腫瘍における IMP mRNA の発現を検索し、卵巢癌の発生、進展に及ぼす役割やその臨床的意義について考察した。

#### 対象と方法:

患者の同意の下に得られた卵巢腫瘍組織 59 例 (悪性 46 例，境界悪性 5 例，良性 8 例) と正常卵巢組織 7 例を

対象として、Semi-quantitative PCR 法により IMP (IMP-1, -2, -3) mRNA 発現レベルを検索し、臨床病理学的因子との関連を検討した。また、卵巣以外の各種癌組織 7 例も対象に加えた。

#### 結果:

1. 各種癌組織における IMP mRNA の発現を検討した。IMP-1, 2, 3 はいずれも卵巣癌において発現することが確認された。卵巣癌を除く各種癌組織においても、乳癌、肺癌、大腸癌、前立腺癌、膵臓癌において各種 IMP の発現が認められ、IMP が多種類の癌に発現していることが示された。
2. Semi-quantitative PCR 法により、正常卵巣および卵巣腫瘍における各 IMP mRNA の発現レベルを検討した。IMP-1 の発現量は卵巣悪性腫瘍および良性腫瘍において正常卵巣での発現量と比較して有意に高値を示した( $P < 0.05$ )。一方、IMP-2 および IMP-3 の発現量は卵巣悪性腫瘍および境界悪性腫瘍において良性腫瘍もしくは正常卵巣での発現量と比較して有意に高値を示した( $P < 0.05$ )。
3. 卵巣癌における IMP mRNA の発現状況を臨床進行期別に検討した。IMP-1 の発現量は卵巣癌の進展に伴い発現上昇し( $P = 0.015$ )、一方、IMP-3 の発現量は卵巣癌の進展に伴い発現低下していることが認められた( $P = 0.016$ )。各 IMP の発現レベルと卵巣癌の組織学的分化度との関連を解析すると、IMP-1 の発現レベルは、高分化腺癌と比較して中、低分化腺癌において有意に高値となった( $P = 0.023$ )。IMP-2 および IMP-3 の発現レベルと分化度と間には有意な相関は認められなかった。
4. 卵巣癌における IMP mRNA の発現レベルと卵巣癌患者の臨床予後との関連を分析した。単変量解析では、IMP-1 の過剰発現( $P = 0.040$ )は臨床進行期( $P = 0.005$ )とともに卵巣癌予後不良因子となった。しかし、この 2 因子で多変量解析を行うと、IMP-1 の有意差は失われ、臨床進行期のみが独立予後因子となった。

#### 考察:

IMP は卵巣腫瘍の悪性化および進展に関連する発現状況を示し、卵巣癌の発生や進展に重要な役割を果たしているものと考えられた。

#### 参考文献:

1. Parker SL, et al: Cancer statistics. CA Cancer J Clin 46, 5-27(1996).
2. Yaniv K, et al: The involvement of a conserved family of RNA binding proteins in embryonic development and carcinogenesis. Gene 287, 49-54(2002).
3. Ross AF, et al: Characterization of a  $\beta$ -actin mRNA zipcode-binding protein. Mol Cell Biol 17, 2158-2165(1997).
4. Havin L, et al: RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localization. Genes Dev 12, 1593-1598(1998).
5. Doyle GA, et al: The c-myc coding region determinant-binding protein: a member of a family of KH domain RNA-binding proteins. Nucleic Acids Res 26, 5036-5044(1998).
6. Nielsen J, et al: A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. Mol Cell Biol 19, 1262-1270(1999).
7. Mori H, et al: Expression of mouse igf2 mRNA-binding protein 3 and its implications for the developing central nervous system. J Neurosci Res 64, 132-143(2001).
8. Mueller-Pillasch F, et al: Expression of the highly conserved RNA binding protein KOC in embryogenesis. Mech Dev 88, 95-99(1999).
9. Mueller-Pillasch F, et al: Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain containing protein. Oncogene 14, 2729-2733(1997).
10. Ioannidis P, et al: C-myc and IGF-II mRNA-binding protein (CRD-BP/IMP-1) in benign and malignant

- mesenchymal tumors. *Int J Cancer* 94, 480-484(2001).
11. Doyle GA, et al: Amplification in human breast cancer of a gene encoding a c-myc mRNA-binding protein. *Cancer Res* 60, 2756-2759(2000).
  12. Wong KK, et al: Identification of differentially expressed genes from ovarian cancer cells by MICROMAX cDNA microarray system. *Biotechniques* 30, 670-675(2001).
  13. Wang T, et al: Identification of genes differentially over-expressed in lung squamous cell carcinoma using combination of cDNA subtraction and microarray analysis. *Oncogene* 19, 1519-1528(2000).
  14. Russel P: Surface epithelial-stromal tumors of the ovary. In: Blaustein' s Pathology of the Female Genital Tract. Kurman RJ (ed.) Springer-Verlag, New York, pp705-782(1995).
  15. International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) Committee on Gynecologic Oncology, Benedet JL, et al: FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecological cancers. *Int J Gynecol Obstet* 70, 209-262(2000).
  16. Shigemasa K, et al: p16 overexpression: a potential early indicator of transformation in ovarian carcinoma. *J Soc Gynecol Invest* 4, 95-102(1997).
  17. Shigemasa K, et al: p21: a monitor of p53 dysfunction in ovarian neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 7, 296-303(1997).
  18. Shigemasa K, et al: Cyclin D1 overexpression and p53 mutation status in epithelial ovarian cancer. *J Soc Gynecol Invest* 6, 102-108(1999).
  19. Shigemasa K, et al: Overexpression of testisin, a serine protease expressed by testicular germ cells, in epithelial ovarian tumor cells. *J Soc Gynecol Invest* 7, 358-362(2000).
  20. Bernstein PL, et al: Control of c-myc mRNA half-life in vitro by a protein capable of binding to a coding region stability determinant. *Genes Dev* 6, 642-654(1992).
  21. Prokipcak RD, et al: Purification and properties of a protein that binds to the C-terminal coding region of human c-myc mRNA. *J Biol Chem* 269, 9261-9269(1994).
  22. Coulis CM, et al: Inhibition of c-myc expression in cells by targeting an RNA-protein interaction using antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol* 57, 485-494(2000).
  23. Chen YT, et al: Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6919-6923(1998).
  24. Shestakova EA, et al: The physiological significance of  $\beta$ -actin mRNA localization in determining cell polarity and directional motility. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7045-7050(2001).
  25. Jones JI, et al: Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16, 3-34(1995).
  26. Yu H, et al: Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 92, 1472-1489(2000).

注： 本研究は、2004年4月12日「第56回日本産科婦人科学会学術講演会」にて高得点演題として口演発表。

研究項目Ⅱ: 上皮性卵巣癌における セリンプロテアーゼ TADG-15 の発現と予後因子としての有用性に関する検討

緒言:

我々がクローニングした卵巣癌で過剰発現を示すセリンプロテアーゼ遺伝子 TADG-15 について、その発現と臨床的因子との関連を明らかにすることを目的とした。

#### 対象と方法:

患者の同意の下に得られた上皮性卵巣癌組織 89 例 (漿液性腺癌 39 例, 粘液性腺癌 19 例, 類内膜腺癌 17 例, 明細胞腺癌 14 例) を対象として、TADG-15 蛋白の免疫組織化学的発現を検索し、Semi-quantitative PCR 法により TADG-15 mRNA 発現レベルを検索し、臨床病理学的因子との関連を検討した。

#### 結果:

TADG-15 蛋白は卵巣癌 89 例中 50 例にその発現が検出された。臨床進行期別にみると、早期癌症例(I期:72.7%)で進行癌症例(II/III/IV期:46.4%)と比較してより高頻度に発現が認められた ( $p = 0.0157$ )。組織型では明細胞腺癌での発現がその組織型と比較して高頻度であった ( $p = 0.0035$ )。生存分析 (log-rank test) では TADG-15 陽性例は陰性例と比較して有意に予後良好であった ( $p = 0.0480$ )。TADG-15 発現と患者年齢、組織分化度との有意な関連は認められなかった。また、semi-quantitative PCR 法により TADG-15 の mRNA 発現レベルを検討した。Internal control として  $\beta$ -tubulin を用い、target gene の発現量を評価した結果、正常卵巣と比較して卵巣癌で過剰発現レベルが認められた。

#### 考察:

TADG-15 は早期卵巣癌症例において高頻度に発現が認められ、腫瘍の進展とともに発現の down-regulation が起こることが示唆された。また、TADG-15 発現は卵巣癌において良好な予後との関連があることが明らかとなった。

#### 参考文献:

1. Diamandis EP, et al: Human tissue kallikreins: a family of new cancer biomarkers. *Clin Chem* 48, 1198-1205(2002).
2. Duffy MJ: The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clin Exp Metast* 10, 145-155(1992).
3. Friedrich R, et al: Catalytic domain structures of MT-SP1/matriptase, a matrix-degrading transmembrane serine proteinase. *J Biol Chem* 277, 2160-2168(2002).
4. Goyal J, et al: The role for NES-1 serine protease as a novel tumor suppressor. *Cancer Res* 58, 4782-4786(1998).
5. Hooper JD, et al: Type II transmembrane serine proteases. *J Biol Chem* 276, 857-860(2001).
6. Kim MG, et al: Cloning and chromosomal mapping of a gene isolated from thymic stromal cells encoding a new mouse type II membrane serine protease, epithin, containing four LDL receptor modules and two CUB domains. *Immunogenetics* 49: 420-428(1999).
7. Lee SL, et al: Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *J Biol Chem* 275, 36720-36725(2000).
8. Lin CY, et al: Molecular cloning of cDNA for matriptase, a matrix-degrading serine protease with trypsin-like activity. *J Biol Chem* 274, 18231-18236(1999).
9. Liotta LA, et al: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64, 327-336(1991).
10. Mignatti P, et al: Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. *Cell* 47, 487-498(1986).

11. Neurath H: The diversity of proteolytic enzymes. In *Proteolytic enzymes*, Beynon RJ, Bond JS (eds) pp 1 13(1989). Oxford, UK: IRL press
12. Oberst M, et al: Matriptase and HAI-1 are expressed by normal and malignant epithelial cells in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 158, 1301 1311(2001).
13. Oberst MD, et al: Expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAI-1 in epithelial ovarian cancer: correlation with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters. *Clin Cancer Res* 8, 1101 1107(2002).
14. Shi YE, et al: Identification and characterization of a novel matrix-degrading protease from hormone-dependent human breast cancer cells. *Cancer Res* 53, 1409 1415(1993).
15. Shigemasa K, et al: p21: a monitor of p53 dysfunction in ovarian neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 7, 296 303(1997).
16. Takeuchi T, et al: Reverse biochemistry: use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 11054 11061(1999).
17. Takeuchi T, et al: Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J Biol Chem* 275: 26333 26342(2000).
18. Tanimoto H, et al: Hepsin, a cell surface serine protease identified in hepatoma cells, is overexpressed in ovarian cancer. *Cancer Res* 57, 2884 2887(1997).
19. Tanimoto H, et al: Cloning and expression of TADG-15, a novel serine protease expressed in ovarian cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res* 39, 648(1998).
20. Tanimoto H, et al: The stratum corneum chymotryptic enzyme that mediates shedding and desquamation of skin cells is highly overexpressed in ovarian tumor cells. *Cancer* 86, 2074 2082(1999).
21. Tanimoto H, et al: Increased expression of protease M in ovarian tumors. *Tumor Biol* 22, 11 18(2001a).
22. Tanimoto H, et al: Ovarian tumor cells express a transmembrane serine protease: a potential candidate for early diagnosis and therapeutic intervention. *Tumor Biol* 22, 104 114(2001b).
23. Tryggvason K, et al: Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochem Biophys Acta* 907, 191 217(1987).
24. Underwood LJ, et al: Cloning of tumor-associated differentially expressed gene-14, a novel serine protease overexpressed by ovarian carcinoma. *Cancer Res* 59, 4435 4439(1999).
25. Underwood LJ, et al: Ovarian tumor cells express a novel multi-domain cell surface serine protease. *Biochim Biophys Acta* 1502, 337 350(2000).
26. Yousef GM, et al: Cloning of a new member of the human kallikrein gene family, KLK14, which is down-regulated in different malignancies. *Cancer Res* 61, 3425 3431(2001).
27. Zhang Y, et al: Assignment of human putative tumor suppressor genes ST13 (alias SNC6) and ST14 (alias SNC19) to human chromosome bands 22q13 and 11q24-q25 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 83, 56 57(1998).

注：本研究は、2004年7月16日「第36回日本婦人科腫瘍学会 学術集会」にて口演発表、「Br J Cancer」(2005年1月92巻)に掲載。

作成日： 2005年2月22日