

学位論文

「Bifunctional roles of survivin- Δ Ex3 and surviving-2B for
susceptibility to apoptosis in endometrial carcinomas」

(子宮内膜癌におけるアポトーシス誘導機構に対する survivin-
 Δ Ex3 および survivin-2B の 2 つの機能)

DM12016 田雑 有紀

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
臨床医科学群 産婦人科学
指導教授 海野 信也

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要 旨

【目的】近年、生活習慣の欧米化により若年子宮内膜癌の罹患率増加が指摘されており、これは少子化問題等の社会問題に直結する。現在、挙児希望の若年子宮内膜癌患者に対しては、子宮温存を目的として大量プロゲステロン療法が施行されるが、その副作用の観点から新たな非観血的治療法が望まれる。

Survivin は inhibitor of apoptosis (IAP) ファミリーに属する抗アポトーシス低分子量蛋白(16.5 kDa)で、ミトコンドリア依存性アポトーシス抑制や細胞分裂時の紡錘糸形成調節を介して細胞動態を制御する。また、alternative splice により生じる複数の variant forms は、anti-apoptotic あるいは pro-apoptotic などのユニークな機能を示すとされているが、子宮内膜癌細胞における Survivin 遺伝子ファミリーの機能解析は殆ど手付かずのまま残されている。本研究は、Survivin とその variants である Survivin- Δ Ex3 と Survivin-2B の機能を、子宮内膜癌細胞の細胞死・増殖制御の観点から分子・細胞レベルで解明することを目的とする。

【結果】子宮内膜癌および正常子宮内膜の臨床検体で、Survivin とその variant である Survivin- Δ Ex3 および Survivin-2B の発現とその意義について、免疫組織学的に検索した。その結果、①子宮内膜組織で、Survivin と Survivin- Δ Ex3 は核に、Survivin-2B は細胞質に局在した。②Survivin と Survivin-2B は非腫瘍および腫瘍組織の両方で、Survivin- Δ Ex3 は腫瘍組織を中心に発現した。③Survivin- Δ Ex3 は、正常子宮内膜より子宮内膜癌で発現が高かった。④子宮内膜癌では、Survivin- Δ Ex3 は、Survivin および Survivin-2B に比べて相対的に発現が高かった。⑤Survivin の発現は細胞増殖能と、Survivin- Δ Ex3 の発現はアポトーシスと密な関連性を示した。

培養細胞を用いた実験では、Ishikawa 細胞に遺伝子導入した GFP-Survivin- Δ Ex3 は核に、GFP-Survivin-2B は細胞質を中心に局在し、共に G2/M 期の核内集積増加と増殖能抑制を示した。さらに、TNF- α による extrinsic pathway アポトーシス誘導課程において、mRNA レベルで Survivin- Δ Ex3/Survivin-wild 及び Survivin- Δ Ex3/Survivin-2B の相対比が増加した。Doxorubicin による intrinsic pathway アポトーシス誘導課程においては、mRNA レベルで Survivin- Δ Ex3/Survivin-wild 及び Survivin- Δ Ex3/Survivin-2B の相対比が減少した。Survivin およびその variants 遺伝子を培養細胞に導入し、子宮内膜癌細胞で、恒常的 Survivin- Δ Ex3 および Survivin-2B 遺伝子過剰発現系を作製した stabel line において、TNF- α 依存性アポトーシス誘導は、bcl-2/bax 比に変

化を認めず、ミトコンドリア非依存性に Survivin- Δ Ex3 により促進され、Survivin-2B により抑制された。Doxorubicin 依存性アポトーシス誘導は、bcl-2/bax 比が減少を認め、ミトコンドリア依存性に Survivin-2B により促進されたが、Survivin- Δ Ex3 により抑制された。

【結語】 Survivin- Δ Ex3 および Survivin-2B は互いに antagonist として働き、外因性アポトーシス経路あるいは内因性アポトーシス経路をそれぞれ促進あるいは抑制する機能を有する (図 8)。子宮内膜癌において、Survivin-wt および Survivin- Δ Ex3 が細胞増殖あるいはアポトーシスを制御する重要な因子で、今後の治療への応用が期待される。

1. 序論	1
2. 材料と方法	
2-1. プラスミドと細胞	2
2-2. 抗体と試薬	2
2-3. トランスフェクション	2
2-4. RT-PCR	2
2-5. ウェスタンブロット法	3
2-6. 免疫蛍光染色	3
2-7. TUNEL 法	3
2-8. フローサイトメトリー	3
2-9. 臨床検体	3
2-10. HE 染色・免疫組織学的染色・TUNEL 染色による組織学的評価	3
2-11. 統計処理	4
3. 結果	
3-1. Survivin variant と子宮内膜癌細胞内局在と細胞増殖能の関係	5
3-2. 子宮内膜癌細胞における Survivin variant のアポトーシスへの機能	5
3-3. 臨床検体における Survivin variant の発現	5
4. 考察	7
5. 総括	9
6. 謝辞	10
7. 引用文献	11
8. 業績目録	15
(9. 図表	16

1. 序論

近年、生活習慣の欧米化などにより若年子宮内膜癌の罹患率の増加が指摘されており、これは少子化問題等の社会問題に直結する。現在、挙児希望の早期若年子宮内膜癌患者に対しては、子宮温存を目的として大量プロゲステロン療法が施行されるが、その副作用や再発の観点から新たな非観血的治療法が望まれる。

Survivin は、アポトーシスを制御する inhibitor of apoptosis (IAP) ファミリーに属し、染色体 17q25 に存在する 3 つのイントロンと 4 つのエクソンからなる一つの遺伝子にコード化された 16.5kDa の低分子量タンパクである。正常な臓器においてはほとんど発現が見られず、細胞分裂が激しい癌細胞に多く発現し、予後不良因子である。Survivin は、N 末端に IAP ファミリー共通の約 70 のアミノ酸からなる繰り返し構造(baculoviral IAP repeat: BIR)と、C 末端に α -ヘリカルコイル構造からなるユニークな分子構造を有する。

Survivin は、アポトーシスの抑制と細胞分裂を制御する 2 つの機能を有するタンパク質である。Survivin-wild type(wt)は G2/M 期に多く発現し、Aurora-B, Borealin 及び INCEPT と Chromosome Passenger Complex(CPC)を形成し、細胞分裂を制御することが報告されている。CPC は染色体凝縮、紡錘体形成、適切な動原体微小管結合や細胞質分裂などの重要な細胞分裂現象を調節する。さらに、カスパーゼ 9 の活性化を阻害することによって、ミトコンドリア依存性アポトーシスの抑制されることから、がん治療のターゲットとして注目されている。

Survivin 遺伝子の mRNA には複数のスプライシングバリエーションが存在し、複数のアイソフォーム(survivin-2 α 、survivin-2B、survivin-deleted exon(Δ Ex)3、survivin-3B)が産生される。これらのバリエーションは、多くの癌で発現が報告されているが、癌の種類の違いによって、機能が異なり、不明な点が多い。

これまで、子宮内膜癌において Survivin-wt の発現の増加が報告されているが、survivin 遺伝子の alternative splice により生じる複数の variant forms の子宮内膜癌における機能解析はいまだ手つかずのままである。

本研究は、子宮内膜癌における surv variants である surv-deleted exon(Δ Ex3)、surv-2B の機能を明らかにするため、細胞死・増殖制御の観点から分子・細胞レベルで解明することを目的とする。

2. 材料と方法

2-1. プラスミドと細胞

Survivin-wt、survivin- Δ Ex3、survivin-2B(GeneBank accession number NM001168)の完全長 cDNA は、Mahotka らにより PCR で精製され、それらの cDNA をそれぞれプラスミドにサブクローニングした。プラスミドとして、pEGFP(enhanced green fluorescent protein)(BD Biosciences Clontech, Mountainview, CA, USA)を用いた。転写開始部位から-1,472bp と+13bp の間にあるプロモーター領域に設定したプライマーを用いて PCR を行い、得られた PCR 産物を pGL3-basic vector(Promega, Madison WI, USA)に導入した。プライマーとして、

Forward: 5'-CTGGGTGAAGGTATATGAG-3'

Reverse: 5'-TTCAAATCTGGCGGTTAATGG-3' を用いた。

子宮内膜癌細胞株(Ishikawa 細胞株、Hec251 細胞株)は、10%FCS を添加した Eagle's MEM 培地中で維持した。GFP-survivin variants を発現させたプラスミドと空のプラスミドをそれぞれ Ishikawa 細胞にトランスフェクトし、GFP-survivin variants の過剰発現細胞株を樹立した。

2-2. 抗体と試薬

抗体として、Survivin-wt(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、survivin- Δ Ex3(Abcam, Cambridge, MA, USA)、survivin-2B(Abcam)、bcl-2(Daki, Glostrup, Denmark)、bax(BD Transduction Lab, Franklin Lakes, NJ, USA)、p21waf1(Calbiochem, Cambridge, MA, USA)、p27kip1(BD Transduction Lab)、Aurora-B kinase(Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、cleaved caspase 3(Cell Signaling)、cleaved caspase 9(Cell Signaling)、Ki-67(Dako)、 γ -tubulin(Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, USA)、cyclin A(Novocastra, Newcastle, UK)、cyclin E(Dako)、 β -actin(Sigma)を用いた。TNF- α 、nocodazole および doxotubicin は Sigma より、rapamycin および aphidicolin は Calbiochem よりそれぞれ購入した。

2-3. トランスフェクション

LipofectAMINE PLUS(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて説明書に従って行い、ルシフェラーゼ活性を分析した。

2-4. RT-PCR

Zhu et al(2004)の論文に従って、Survivin-wt、survivin- Δ Ex3、survivin-2B それぞれのプライマーの配列を設定し、cDNA を鋳型として、mRNA の発現量の検出を行った。Survivin variants mRNA の発現量は、NIH ImageJ

software を用いて画像解析し、GAPDH 発現量と割ることで定量化した。

2-5. ウェスタンブロット

培養細胞から取り出した全体のタンパク抽出液あるいは細胞内タンパク抽出液とした。それらのタンパク (1-10 μ g) は SDS-PAGE 電気泳動を行った後、メンブレンにブロッティングし、一次抗体と反応させた。発色には ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Tokyo, Japan) を使用し検出した。

2-6. 免疫蛍光染色法

Ishikawa 細胞に GFP-survivin variants のそれぞれの cDNA をトランスフェクションした細胞を、抗 γ -tubulin 抗体、抗 Aurora-B kinase 抗体と培養した。2 次抗体として、Rhodamine-labeled anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を用いた。

2-7. TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 法

In situ Cell Death Detection Kit (Roche, Tokyo, Japan) を用いて、アポトーシス細胞を検出した。TUNEL 陽性細胞数をカウントした。

2-8. フローサイトメトリー

培養細胞を 70% アルコールで固定し、propidium iodide (Sigma) で染色し、BD FACS Calibur (BD Bioscience) と CellQuest Pro software (BD Bioscience) によって、解析した。

2-9. 臨床検体

2003 年から 2012 年に北里大学病院で診断された 94 例の子宮体部類内膜癌 (G1 : 39 例、G2 : 30 例、G3 : 25 例)、21 例の複雑型異型子宮内膜増殖症 (CAH) および、30 例の正常子宮内膜 (増殖期 : 10 例、分泌早期 : 10 例、分泌後期 : 10 例) のホルマリン固定パラフィン包埋検体を染色に用いた。

20 例の増殖期子宮内膜および 24 例の子宮内膜癌の凍結検体を用いて、mRNA を抽出し、逆転写により cDNA を作製した。Surv-wt, - Δ Ex3, -2B に対するプライマーを用いて、定量的 RT-PCR 法により variants の発現量を解析した。

2-10. HE 染色・免疫組織学染色・TUNEL 染色による組織学的評価

パラフィン検体を厚さ 4 μ m で薄切し、hematoxylin and eosin 染色 (HE 染色) を行った。光学顕微鏡で観察し、Kerr らによるアポトーシス細胞像の基準

を参考にし、ネクロシスや繊維化の部位を除き、少なくとも 500 個の細胞のうちのアポトーシス細胞の割合をアポトーシスインデックスとして数値化した。また、同様にマイトーシス細胞も数値化した。

免疫染色は、1 次抗体として Survivin-wt, Survivin- Δ Ex3, Survivin-2B, Ki-67 をそれぞれ用い、マイクロウェーブ熱処理とポリマー法 (Envision, Dako) により行った。免疫染色の評価は、核染色に関しては陽性細胞の割合でスコア化し、細胞質の染色に関しては、陽性像の割合と染色濃度を掛け合わせたものをラベリングインデックス (LI) とし、全て数値化した。30 例の子宮内膜癌検体で TUNEL 染色によるアポトーシス細胞の検出を行い、同様にスコア化した。

2-1-1. 統計処理

Mann-Whitney U test および Spearman's の順位相関検定を用いて解析した。すべての検定は、 $p < 0.05$ をもって有意と判定した。

3. 結果

3-1. Survivin variant と子宮内膜癌細胞内局在と細胞増殖能の関係

Ishikawa 細胞に GFP-survivin variants をトランスフェクトさせると GFP-Survivin- Δ Ex3 は核に、GFP-Survivin-wt と GFP-Survivin-2B は細胞質に局在し、variants による細胞内局在の違いが観察された(図 1A)。GFP-Survivin-wt, GFP-Survivin- Δ Ex3 は G1 期 S 期と比較して、G2/M 期で細胞質と核のいずれにも発現の増加を示した。GFP-Survivin-2B は、すべての細胞周期で細胞質に高い発現を認め、G2/M 期で一時的に核内発現が増加した(図 1B)。GFP-Survivin-wt, GFP-Survivin- Δ Ex3, GFP-Survivin-2B はいずれも細胞分裂時に Aurora-B と同様の核内局在を示した(図 1C)。Ling らによると Survivin-2B は微小管の重要な構成因子である γ -tubulin と結合し作用することが報告されていたが、Survivin-2B と γ -tubulin の同様の関係は観察されなかった(図 S1A)。Ishikawa 細胞に GFP-Survivin- Δ Ex3 および GFP-Survivin-2B を恒常的に過剰発現させた細胞株では、いずれも細胞増殖能が抑制され(図 S1B)、p21waf1 および bcl-2 のタンパク発現の増加が見られた(図 S1C)。

3-2. 子宮内膜癌細胞における Survivin variant のアポトーシスへの機能

Ishikawa 細胞に GFP-survivin variants をそれぞれトランスフェクトすると、他の内因性 variants の mRNA 発現が抑制された(図 2B)。

TNF- α 処理による外因性アポトーシス誘導により、Survivin- Δ Ex3 恒常的過剰発現細胞株ではアポトーシスが増加し、Survivin-2B 恒常的過剰発現細胞株ではアポトーシスが抑制された(図 3A)。このアポトーシスは caspase 3 および 9 のタンパク発現量の違いを認めたが、bcl-2/bax 比に変化は見られなかった(図 3B)。

Doxorubicin による内因性アポトーシス誘導をさせると、Survivin- Δ Ex3 恒常的過剰発現細胞株ではアポトーシスが抑制され、Survivin-2B 恒常的過剰発現細胞株ではアポトーシスが増加した(図 4B)。Bcl-2/bax 比は、Survivin- Δ Ex3 恒常的過剰発現細胞に対し、Survivin-2B 恒常的過剰発現細胞ではより低下が見られた(図 4B)。

Ishikawa 細胞を TNF- α で外因性アポトーシスを誘導すると、Survivin-wt と Survivin-2B の mRNA の発現が時間とともに有意に減少し、 Δ Ex3/wt 比および Δ Ex3/wt 比が増加した(図 5A)。Doxorubicin で内因性アポトーシスを誘導すると、Survivin- Δ Ex3 の mRNA の発現が時間とともに有意に減少し、 Δ Ex3/wt 比および Δ Ex3/wt 比が減少した(図 5B)。

3-3. 臨床検体における Survivin variant の発現

Survivin-wt と Survivin- Δ Ex3 は核に染色され、Survivin-2B は細胞質に染色された(図 6A)。正常子宮内膜では、Survivin-wt は月経周期で変化が見られ、増殖期、分泌早期、分泌後期で次第に発現が低下した。Survivin- Δ Ex3 および Survivin-2B の発現は月経周期で変化は認められなかった(図 6B 上)。増殖期子宮内膜での Survivin variants の mRNA 発現は、Survivin-wt と Survivin-2B の mRNA 発現が Survivin- Δ Ex3 より相対的に増加していた(図 6B 下)。子宮内膜癌検体において、Survivin variant の局在は正常子宮内膜と同様の染色を示した(図 7A 上)。Survivin-wt と Survivin- Δ Ex3 は子宮内膜癌で多く発現し、Survivin-wt は子宮内膜癌の分化度が悪くなるほど発現の増加が認められたが、Survivin- Δ Ex3 は分化度による相違はなかった(図 7A 下)。Survivin-2B は、正常子宮内膜・CAH・子宮内膜癌で発現の変化は認められなかった。Survivin- Δ Ex3 は、子宮内膜癌において Survivin-wt および Survivin-2B に対して相対的に発現増加が見られた(図 7B)。子宮内膜癌における Survivin variants の mRNA 発現は、Survivin-2B に対して、Survivin-wt と Survivin- Δ Ex3 で相対的に増加を認めた(図 7C)。AI, MI, Ki-67 は正常子宮内膜から G3 子宮内膜癌に段階的に増加していた(図 7D)。Survivin- Δ Ex3 は AI と、Survivin-wt は Ki-67 および MI との正の相関関係を示したが、variant 間での相関は認められなかった(表 1)。また、子宮内膜癌の臨床病理学的因子と variants の発現の相関関係は認められなかった(図 S2)。

4. 考察

Survivin variants はそれぞれ細胞内局在に相違を認めた。Ishikawa 細胞に GFP-survivin-wt を過剰発現させると細胞質に局在を認めたが、臨床検体では核に発現を認め、培養細胞と臨床検体で相違があった。これは、Survivin-wt は細胞周期で発現が異なり、臨床検体での Survivin-wt の細胞質への発現は、G2/M 期を除いて相対的に低下しているため発現が認められなかった、と推察される。

Survivin-wt は Aurora-B などの分子に結合し、細胞分裂を促進することが報告されている。Survivin- Δ Ex3 及び Survivin-2B は、Survivin-wt と同様に、細胞分裂中期で Aurora-B と同様の核内局在を示した。いずれの variants も G2/M 期に核内発現増加を示すことから、過剰発現により細胞分裂の調節を介して細胞増殖を増加させる可能性が考えられた。しかし、過剰発現細胞において細胞分裂は抑制され、臨床検体においても 2 つの Survivin variants は細胞増殖と関係性を認められなかった。以前の報告でも、Survivin-wt を抑制し細胞増殖を減少させた実験では、Survivin variants は細胞増殖に影響しない、と報告されている。これは、variants の細胞増殖調節機能が弱いため、細胞増殖の変化に影響しないと考察した。

アポトーシスの主要経路として、TNF- α などのデスリガンド/デスレセプターの活性化により引き起こされる外因性経路と、放射線や化学療法などの DNA 障害により bcl-2 ファミリーがミトコンドリアの機能調節によりアポトーシスを制御する内因性(ミトコンドリア)経路の 2 つがある。Survivin - Δ Ex3/ Survivin-2B は、外因性アポトーシスをそれぞれ促進/抑制、内因性アポトーシスを抑制/促進する相反する機能を有した。また外因性アポトーシスを誘導すると、Survivin- Δ Ex3 の発現が相対的に増加し、内因性アポトーシスを誘導すると Survivin- Δ Ex3 の発現が相対的に減少した。Variants はそれぞれ直接あるいは間接的に互いに作用し、ヘテロダイマーを形成し作用することが報告されており、Survivin- Δ Ex3 は他の variants の機能を抑制する可能性が示唆された。Survivin- Δ Ex3 は、内因性アポトーシスを抑制する bcl-2 と結合する BH2 ドメインを有する唯一の variant であることが報告されており、Survivin- Δ Ex3 は、bcl-2 の発現を維持することで内因性アポトーシスを抑制する、と推察された。

子宮内膜癌臨床検体において、Survivin variants の発現と幾つかの臨床病理学的因子との関連は認められなかったが、Survivin-wt は細胞増殖と Survivin- Δ Ex3 はアポトーシスに関連を示した。子宮内膜癌では、Survivin-wt と Survivin- Δ Ex3 のタンパク発現が増加しており、この 2 つが細胞増殖とアポトーシスを調節している重要な因子であることが推察された。さらに、mRNA レベルでも同様に Survivin-wt と Survivin- Δ Ex3 は、Survivin-2B と比較して

発現の増加が認めることから、腫瘍部と非腫瘍部で Survivin 遺伝子の alternative splice のパターンが異なり、Survivin variants の相互作用により子宮内膜癌の細胞増殖あるいはアポトーシスが制御されている、と考察された。

5. 総括

Survivin- Δ Ex3 および Survivin-2B は互いに antagonist として働き、外因性アポトーシス経路あるいは内因性アポトーシス経路をそれぞれ促進あるいは抑制する機能を有する(図 8)。子宮内膜癌において、Survivin-wt および Survivin- Δ Ex3 が細胞増殖あるいはアポトーシスを制御する重要な因子で、今後の治療への応用が期待される。

6. 謝辞

本稿を終えるにあたり、ご指導・ご鞭撻いただきました海野信也教授北里大学産婦人科学教室主任教授、恩田貴志教授北里大学婦人科学教室教授、三枝信教授北里大学病理学教室教授に深く感謝いたします。また、多大なご助言をいただきました原敦子北里大学病理学教室講師に感謝いたします。その他、本研究にご協力いただきました皆様方に感謝いたします。

7. 引用文献

Ai Z, Yin L, Zhou X, Zhu Y, Zhu D, Yu Y, et al.:Inhibition of survivin reduces cell proliferation and induces apoptosis in human endometrial cancer. *Cancer* 2006;107:746-756

Altieri DC :Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: the survivin paradigm. *J Cell Biochem* 2004;92:656-663

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC :A novel ant-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphomas. *Nat Med* 1997;3:917-921

Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T, et al.:Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:902-907

Caldas H, Jiang Y, Holloway MP, Fangusaro J, Mahotka C, Conway EM, et al. :Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene* 2005;24:1994-2007

Chantalat L, Skoufias DA, Kleman JP, Jung B, Dideberg O, Margolis RL:Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. *Mol Cell* 2000;6:183-189

Chaopotong P, Kajita S, Hashimura M, Saegusa M:Nuclear surviving is associated with cell proliferative advantage in uterine cervical carcinomas during radiation therapy. *J Clin Pathol* 2012;65:424-430

Chen J, Jin S, Tahir SK, Zhang H, Liu X, Sarthy AV, et al.:Survivin enhances Aurora-B kinase activity and localizes Aurora-B in human cells. *J Biol Chem* 2003;278:486-490

Chen X, Zhang Z, Feng Y, Fadare O, Wang J, Ai Z, et al.:Aberrant survivin expression in endometrial hyperplasia: another mechanism of progestin resistance. *Mod Pathol* 2009;22:699-708

Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia, Altieri DC:Mitochondrial surviving inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* 2004;114:1117-1127

Fujino K, Ueda M, Takehara M, Futakuchi H, Kaneda K, Yamashita Y, et al.:Transcriptional expression of survivin and its splice variants in endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2006;12:383-388

Gassmann R, Carvalho A, Henzing AJ, Ruchaud S, Hudson DF, Honda R, et al.:Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol* 2004;166:179-191

Jacob NK, Cooley JV, Shirai K et al (2012) Survivin splice variants are not essential for mitotic progression or inhibition of apoptosis

induced by doxorubicin and radiation. *Onco Targets Ther* 5:7-20

Kappler M, Kohler T, Kampf C et al (2001) Increased survivin transcript levels: an independent negative predictor of survival in soft tissue sarcoma patients. *Int J Cancer* 95:360-363

Kelly RJ, Lopez-Chavez A, Citrin D et al (2011) Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Mol cancer* 10:35

Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV (1994) Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73:2013-2026

Komacker M, Verneris MR, Komacker B et al (2001) Survivin expression correlates with apoptosis resistance after lymphocyte activation and is found preferentially in memory T cells. *Immunol Lett* 76:169-173

Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H et al (2000) Expression of survivin and bcl-2 in the normal human endometrium. *Mol Hum Reprod* 6:529-534

Krieg A, Mahotka C, Krieg T et al (2002) Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumor progression. *Br J Cancer* 86:737-743

Li F (2003) Survivin study: what is the next wave? *J Cell Physiol* 197:8-29

Li F (2005) Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer* 92:212-216

Li F, Altieri DC (1999) The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer Res* 59:3143-3151

Li F, Ambrosini G, Chu EY et al (1998) Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396:580-584

Li F, Ackermann EJ, Bennett CF et al (1999) Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol* 1:461-466

Ling X, Cheng Q, Black JD et al (2007) Forced expression of survivin-2B abrogates mitotic cells and induces mitochondria-dependent apoptosis by blockade of tubulin polymerization and modulation of bcl-2, bax, and survivin. *J Biol Chem* 282:27204-27214

Mahotka C, Wenzel M, Springer E et al (1999) Survivin- Δ Ex3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res* 59:6097-6102

Mahotka C, Krieg T, Krieg A et al (2002a) Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 100:30-36

Mahotka C, Liebmann J, Wenzel M et al (2002b) Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death Differ* 9:1334-1342

Mesri M, Morales-Ruiz M, Ackermann EJ et al (2001) Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting. *Am J Pathol* 158:1757-1765

Miura K, Fujibuchi W, Unno M (2012) Splice variants in apoptotic pathway. *Exp On col* 34:212-217

Nabils NH, Broaddus RR, McCampbell AS et al (2010) Sex hormone regulation of survivin gene expression. *J Endocrinol* 207:237-243

Noton EA, Colnaghi R, Tate S et al (2006) Molecular analysis of survivin isoforms: evidence that alternatively spliced variants do not play a role in mitosis. *J Biol Chem* 281:1286-1295

Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T et al (2009) Requirement of the Akt/ β -catenin pathway for uterine carcinosarcoma genesis, modulating E-cadherin expression through the transactivation of slug. *Am J Pathol* 174:2107-2115

Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T (2012a) Sox4 functions as a positive regulator of β -catenin signaling through upregulation of TCF4 during morular differentiation of endometrial carcinomas. *Lab Invest* 92:511-521

Saegusa M, Hashimura M, Suzuki E et al (2012b) Transcriptional up-regulation of Sox9 by NF- κ B in endometrial carcinoma cells, modulating cell proliferation through alteration in the p14ARF/p53/p21WAF1 pathway. *Am J Pathol* 181:684-692

Silverberg SG, Mutter GL, Kurman RJ et al (2003) Tumours of the uterine corpus. Epithelial tumours and related lesions. World Health Organization Classification of Tumours. In: Tavassoli FA, Devilee P (eds) Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. IARC Press, Lyon, pp 221-232

Sun C, Nettesheim D, Liu Z et al (2005) Solution structure of human survivin and its binding interface with Smac/Diablo. *Biochemistry* 44:11-17

Verdecia MA, Huang H, Dutil E et al (2000) Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* 7:602-608

Wheatley SP, Carvalho A, Vagnarelli P et al (2001) INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr Biol* 11:886-890

Wheatley SP, Henzing AJ, Dodson H et al (2004) Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) in vivo. *J Biol Chem* 279:5655-5660

Yang D, Welm A, Bishop JM (2004) Cell division and cell survival in the absence of survivin. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15100-15105

Zhao J, Tenev T, Martins LM et al (2000) The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci* 113:4363-4371

Zheng W, Ma X, Wei D et al (2005) Molecular cloning and bioinformatics analysis of a novel spliced variant of survivin from human breast cancer cells. *DNA Seq* 16:321-328

Zhu N, Gu L, Findley HW et al (2004) An alternatively spliced survivin variant is positively regulated by p53 and sensitize leukemia cells to chemotherapy. *Oncogene* 23:7545-755

8. 業績目録

主学術論文

1. Tazo Y, Hara A, Onda T, Saegusa M. : Bifunctional roles of survivin- Δ Ex3 and survivin-2B for susceptibility to apoptosis in endometrial carcinomas. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 140(12):2027-2037, 2014

原著

1. Yoshida T, Hashimura M, Mastumoto T, Tazo Y, Inoue H, Kuwata T, Saegusa M. : Transcriptional upregulation of HIF-1 α by NF- κ B/p65 and its associations with β -catenin/p300 complexes in endometrial carcinoma cells. Lab Invest, 93(11):1184-93, 2013

2. Takahashi H, Yoshida T, Matsumoto T, Kameda Y, Takano Y, Tazo Y, Inoue H, Saegusa M. : Frequent β -catenin gene mutations in atypical polypoid adenomyoma of the uterus. Human Pathology, 45(1):33-40, 2014

3. Yoshida T, Hashimura M, Kuwata T, Matsumoto T, Suzuki E, Tazo Y, Nakajima H, Inukai M, Saegusa M : Transcriptional regulation of the alpha-1 type II collagen gene by nuclear factor B/p65 and Sox9 in the chondrocytic phenotype of uterine carcinosarcomas. Human Pathology, 44(9):1780-8, 2013

9. 図表

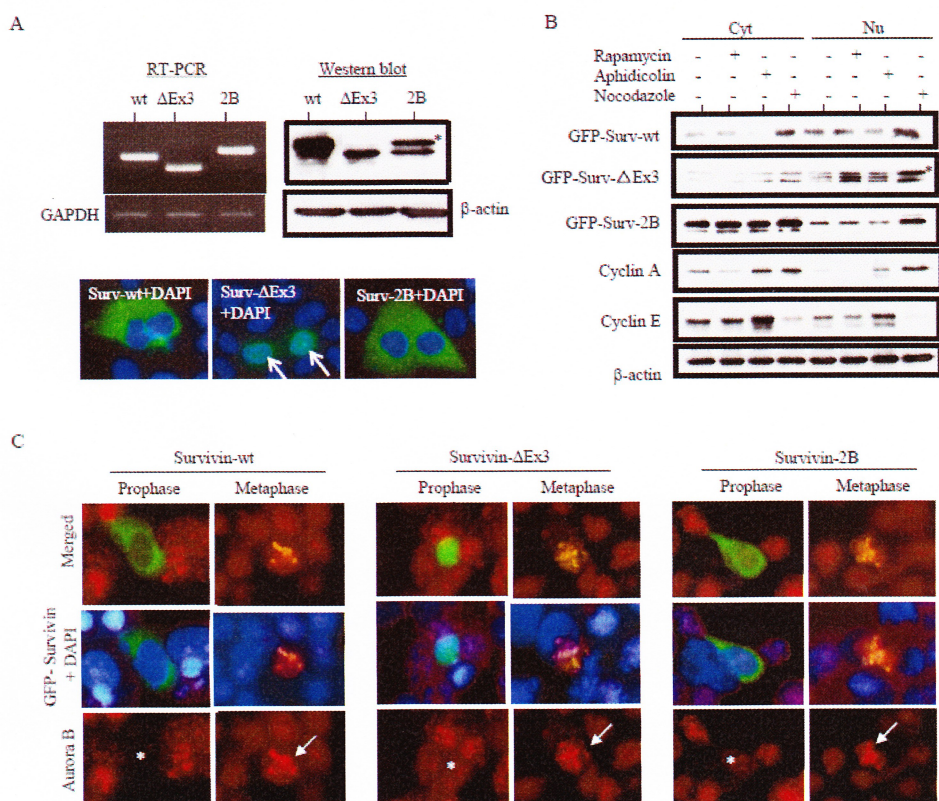


図 1

- (A) 上 : Ishikawa 細胞に GFP-Survivin variant をそれぞれトランスフェクトし、mRNA およびタンパクレベルでの発現が見られた。下 : GFP-Survivin variant の細胞内局在
- (B) Ishikawa 細胞に GFP-Survivin variant をそれぞれトランスフェクトさせた細胞を、rapamycin(50nM)、aphidicolin(2 μ g/ml)、nocodazole(0.25 μ g/ml)をそれぞれ 24h 処理し、G1 期、S 期、G2/M 期同期細胞を作製し、細胞質と核に分け、ウェスタンブロット法を行った。
- (C) 細胞分裂中期で Aurora-B キナーゼと Survivin-variant は同様の局在を示す。

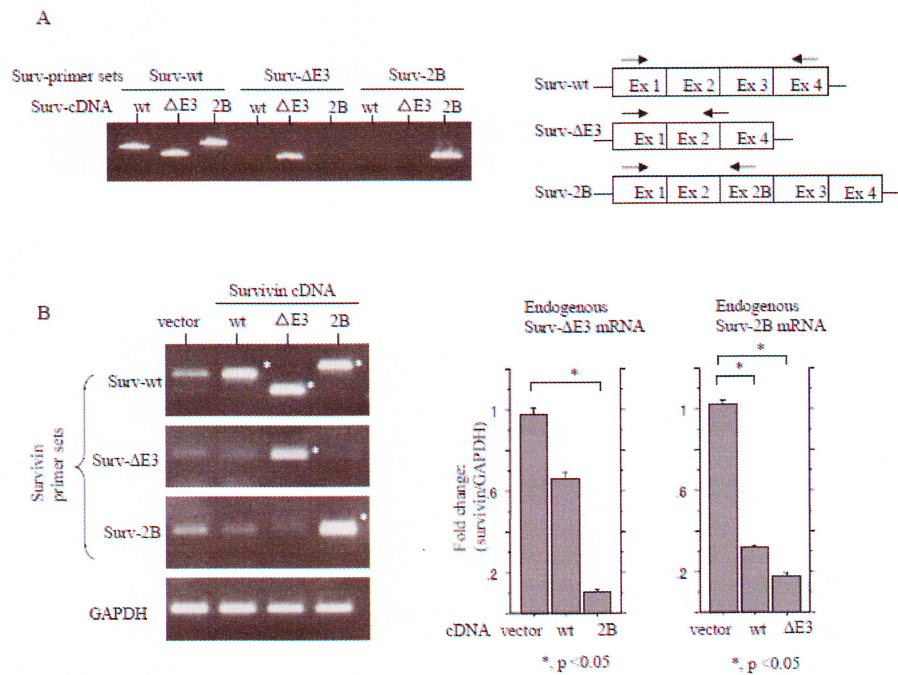


図 2

- (A) 左 : Survivin-variant のそれぞれのプライマーの確認、右 : Miura らによって報告された Survivin-variant のプライマーデザインの模式図
- (B) 左 : Ishikawa 細胞に GFP-Survivin-variant をトランスフェクトした細胞の RT-PCR により内因性 variant の mRNA 発現を検討、右 : NIH Image program で数値化し、GAPDH で標準化した。他の variant を発現させることにより、内因性 Survivin-ΔEx3 と Survivin-2B の mRNA 発現量は低下する。

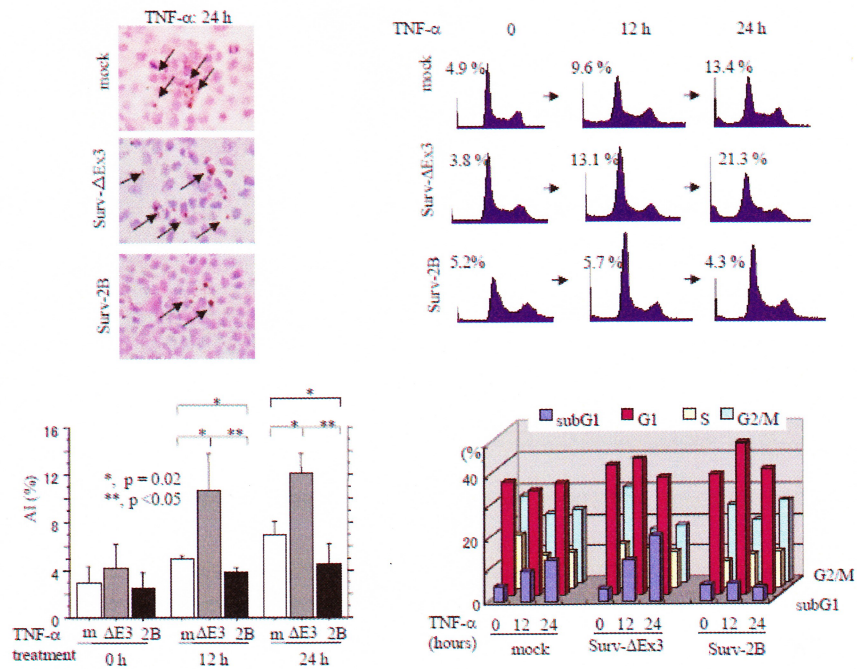


図 3 (A) Survivin-ΔEx3 および Survivin-2B を恒常的過剰発現させた細胞株を TNF- α (20ng/ml) で処理した (左上: TUNEL アッセイ、左下: アポトーシスインデックス、右: フローサイトメトリー)。Survivin-ΔEx3 でアポトーシスが誘導された。

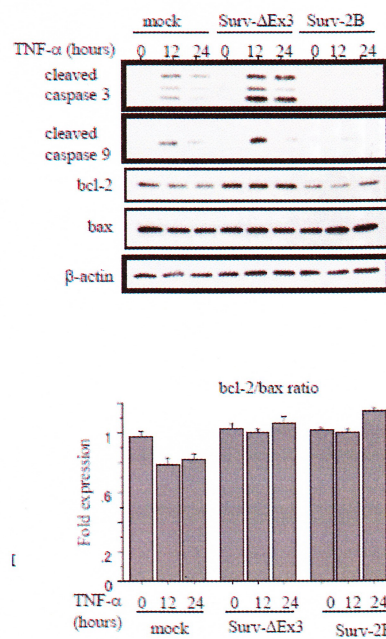


図 3 (B)上 : TNF- α 処理した Survivin-variant 恒常的過剰発現細胞のウェスタンブロット法による蛋白発現量の検討、下 : NIH Image program を用い β アクチンで定量化した bcl-2/bax 比は変化が見られなかった

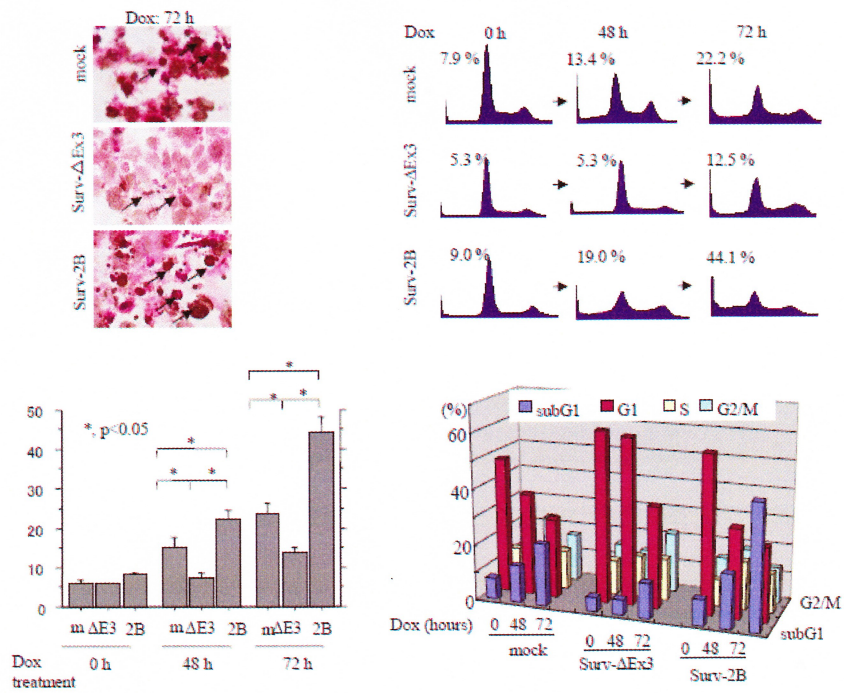


図 4 (A)Survivin- Δ Ex3 および Survivin-2B を恒常的過剰発現させた細胞株を Doxorubicin(1 μ g/ml)で処理した (左上: TUNEL アッセイ、左下: アポトーシスインデックス、右: フローサイトメトリー)。Survivin-2B でアポトーシスが誘導された。

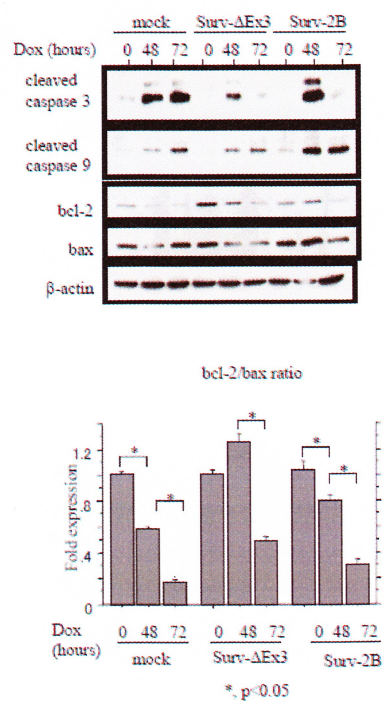


図 4 (B)上 : Doxorubicin 処理した Survivin-variant 恒常的過剰発現細胞のウェスタンブロット法による蛋白発現量の検討、下 : NIH Image program を用い β アクチンで定量化した bcl-2/bax 比は 48h 後に Survivin- Δ Ex3 で増加した

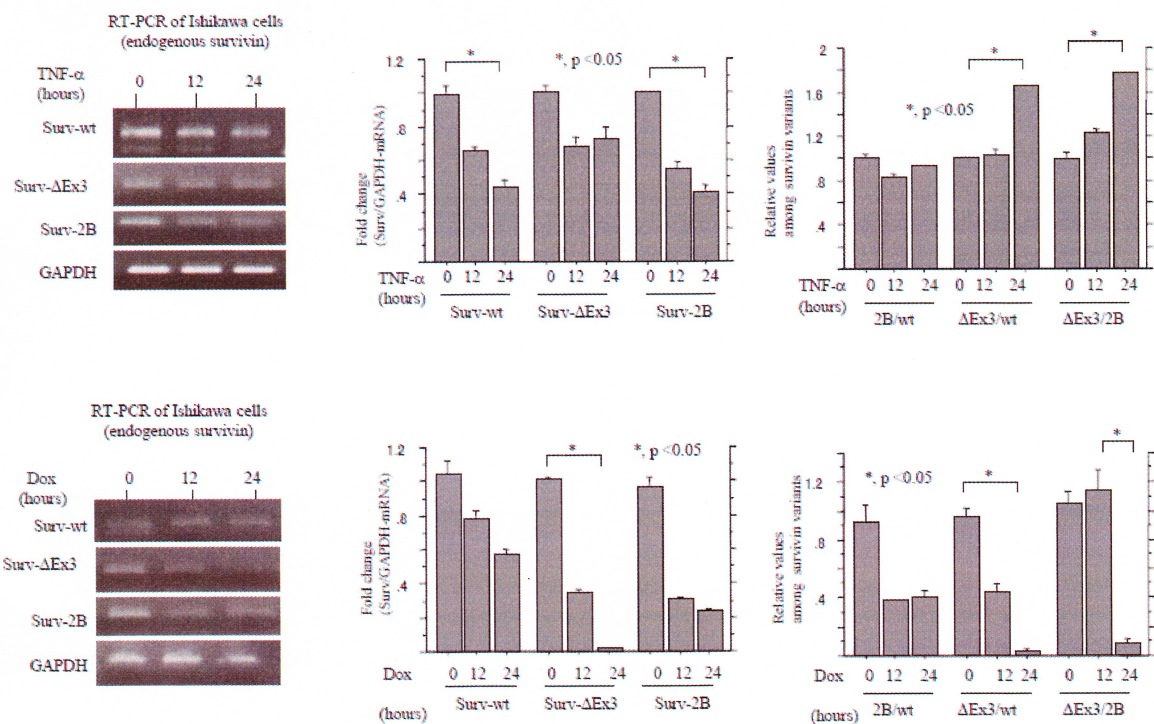


図 5

上 : Ishikawa 細胞を TNF- α で処理すると、内因性 Survivin- Δ Ex3 の mRNA 発現量が相対的に増加する。

下 : Ishikawa 細胞を doxorubicin で処理すると、内因性 Survivin- Δ Ex3 の mRNA 発現量が相対的に低下する。

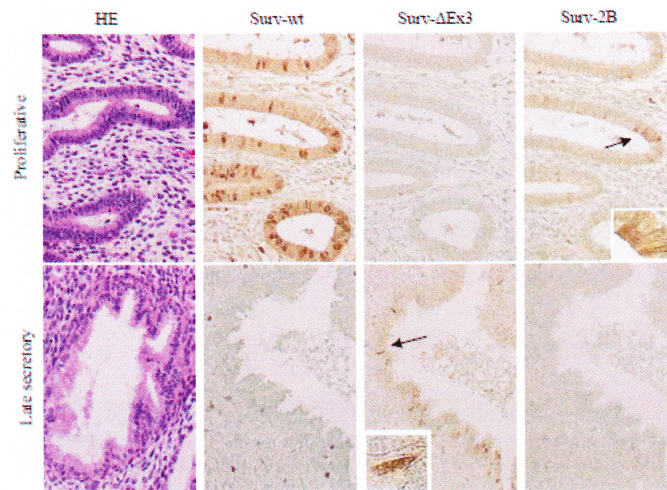


図 6 (A)正常子宮内膜臨床検体の HE 染色および Survivin-variant の免疫染色

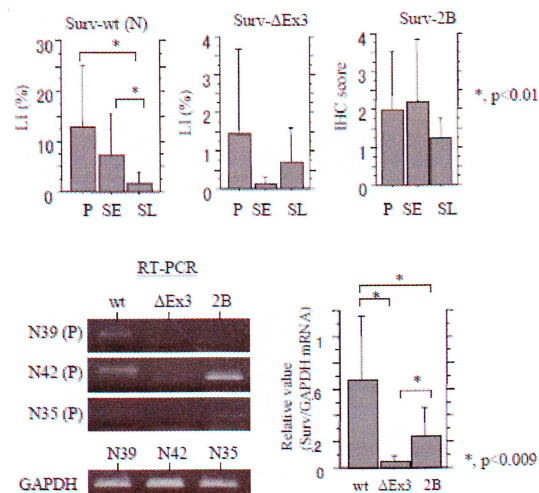


図 6 (B)

上：免疫染色から求めた LI および IHC スコアは、Survivin-wt が増殖期で増加。

下：増殖期子宮内膜検体の Survivin-variant の RT-PCR では、Survivin-ΔEx3 の mRNA 発現が低かった。

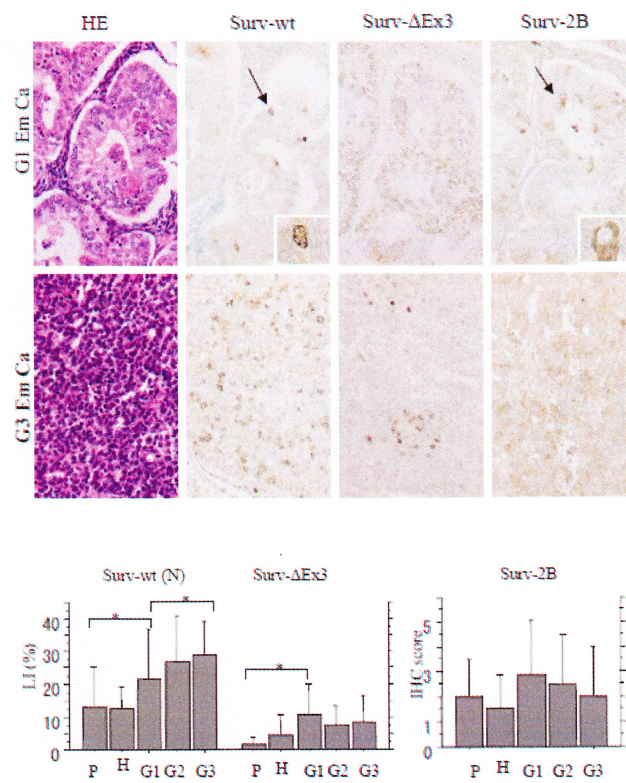


図 7 (A)上 : 子宮内膜癌 G1 および G3 の HE 染色、免疫染色、下 : Survivin-wt および Survivin-ΔEx3 は正常組織と比較し、癌で発現が増加する。

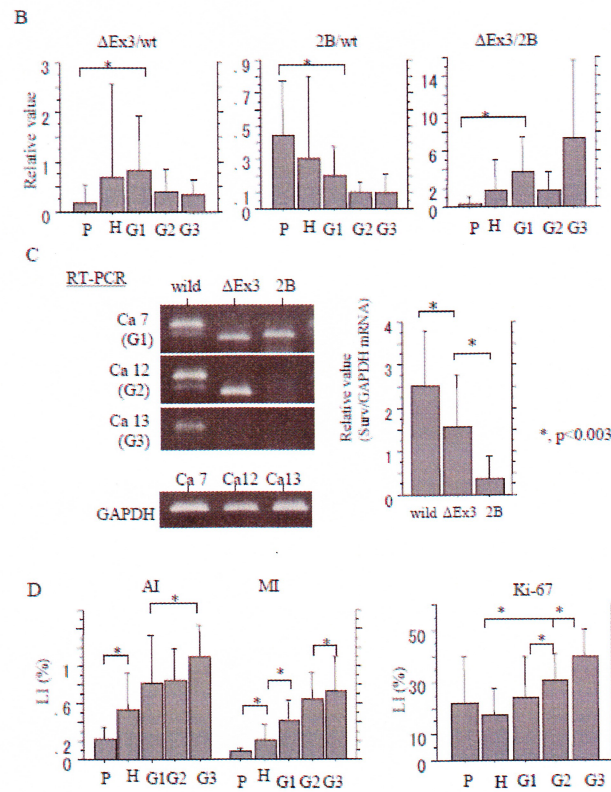


図 7

(B) : Survivin- Δ Ex3 は Survivin-wt より相対的に増加する

(C) : 子宮内膜癌臨床検体の RT-PCR では、Survivin-wt>Survivin- Δ Ex3>Survivin-2B の mRNA 発現量を認めた。

(D) : 臨床検体におけるアポトーシスインデックス(AI)、マイトーシスインデックス(MI)、Ki-67 発現

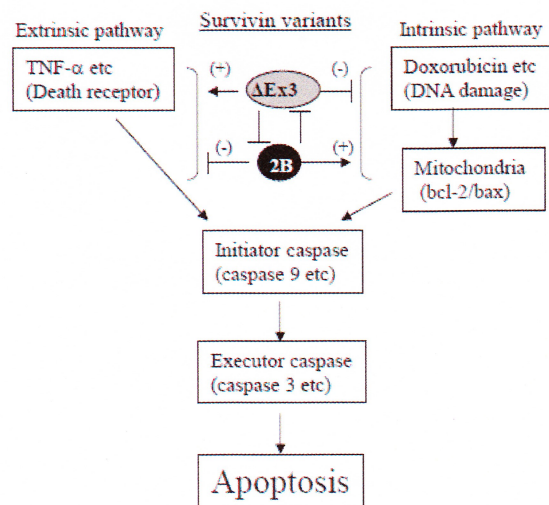


図 8 : Survivin- Δ Ex3 および Survivin-2B の外因性および内因性アポトーシスに対する仮説

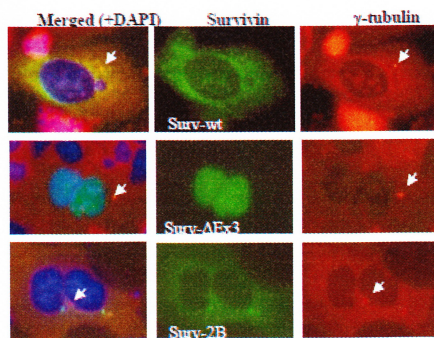


図 S1(A) : Ishikawa 細胞に GFP-Survivin-wt(上段)、GFP-Survivin- Δ Ex3(中段)、GFP-Survivin-2B(下段)をトランスフェクトし nocodazole 処理により G2/M 期同期細胞と γ -tubulin の関係

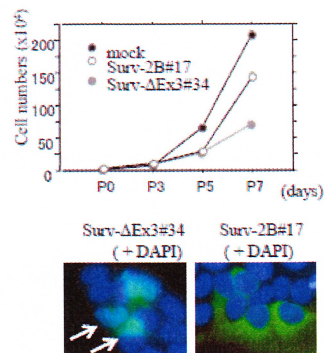


図 S1(B) : Survivin- Δ Ex3 および Survivin-2B 恒常的過剰発現細胞では、細胞増殖能が低下する。

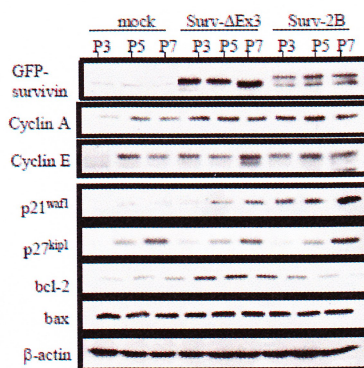


図 S1(C) : Survivin- Δ Ex3 および Survivin-2B 恒常的過剰発現細胞株のウェスタンブロット法による細胞増殖因子、アポトーシス因子タンパクの発現の変化

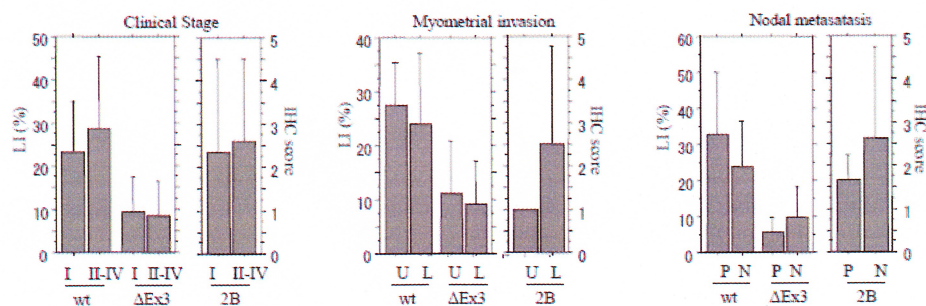


図 S2 : 臨床病理学的因子の違いによる Survivin variant の違いは認められない。

	Surv-wild ρ (p)	Surv- Δ E3 ρ (p)	Surv-2B ρ (p)	AI ρ (p)	Ki-67 LI ρ (p)
Surv- Δ E3	0.07 (0.45)	*	*	*	*
Surv-2B	0.09 (0.6)	0.31 (0.08)	*	*	*
AI	0.22 (0.014)	0.67 (<0.0001)	0.2 (0.25)	*	*
Ki-67 LI	0.87 (<0.0001)	-0.03 (0.73)	-0.29 (0.1)	0.11 (0.06)	*
MI	0.61 (<0.0001)	0.26 (0.003)	-0.13 (0.45)	0.44 (<0.0001)	0.59 (<0.0001)

ρ , Spearman's correlation coefficient; Surv, survivin; AI, apoptotic index; MI, mitotic index
LI, labeling index

表 1 : 臨床検体における Survivin-variant と AI,MI、Ki-67 のそれぞれの相関完成