

令和元年6月12日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20151

研究課題名(和文) EpCAM陽性の癌幹細胞を標的とした分子標的薬による難治性卵巣癌の新たな治療戦略

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy targeting EpCAM-positive ovarian cancer stem cells

研究代表者

本原 剛志 (Motohara, Takeshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師

研究者番号：10457591

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)：有望な新規分子標的薬の開発は、現在の卵巣癌治療に課せられた焦眉の命題である。近年、様々な固形癌において、EpCAM陽性の腫瘍細胞に対する分子標的薬であるアデカツム(Adecatumumab)の抗腫瘍効果が注目されている。われわれはこれまでに、EpCAM陽性の卵巣癌細胞が癌幹細胞としての機能を有し、特に抗癌剤治療抵抗性に関与していることを証明した。そこで、今回の研究では、このAdecatumumabの抗腫瘍効果について、in vitroならびにin vivoでの治療実験を行った。その結果、Adecatumumabを投与することで、EpCAM陽性の卵巣癌細胞に対する著明な抗腫瘍効果が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では、卵巣癌におけるEpCAMの分子生物学的な役割として、特に抗癌剤治療抵抗性に密接に関わっていることを明らかにした。さらにわれわれは、EpCAM陽性の腫瘍細胞に対する新規分子標的薬が、EpCAM陽性の卵巣癌細胞に対する著明な抗腫瘍効果を有することを実験的に証明した。これらの結果は、EpCAMを標的とした有望な分子標的薬というツールを通じて、卵巣癌幹細胞を標的とした新たな治療戦略の開発に繋がっていくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Epithelial ovarian cancer is a highly lethal malignancy and overcoming chemoresistance is the major challenging in treating ovarian cancer patients. Even though ovarian cancer stem cells have not been completely elucidated, these cells are believed to play crucial roles in chemoresistance and relapse of ovarian cancer. Previous studies have supported the premise that EpCAM is one of the cell surface markers associated with cancer stem cells in many solid cancers, including ovarian cancer.

In this study, we demonstrated the functional role of EpCAM in the resistance to platinum-based chemotherapy. We also found that EpCAM-targeted therapies using adecatumumab showed a significant inhibition of ovarian cancer cell proliferation and tumor growth in in vitro assays and in vivo mouse models.

EpCAM expression may represent a promising therapeutic target to effectively extirpate the cancer stem cells as the root of ovarian cancer.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 癌幹細胞 抗癌剤治療抵抗性 EpCAM

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は早期診断が困難であり、すでに腹腔内に多発性の播種病巣を形成した進行癌で診断されることが多い。プラチナ製剤やタキサン系薬剤の登場によって、卵巣癌の5年生存率の向上が示されてきたが、長期生存率は依然として不良であることが知られている。また、手術療法および抗癌化学療法が奏効し寛解が得られた場合においても、しばしば転移部位において抗癌剤耐性の腫瘍細胞が出現し、再発を繰り返すことになる。近年、このような悪性腫瘍の治療抵抗性や再発・転移において、一群の細胞集団である“癌幹細胞 cancer stem cell”の関与が指摘されている。すなわち、腫瘍組織の階層性の頂点に位置する癌幹細胞のみが腫瘍形成能を有し、腫瘍組織の発生や増殖に関わることが報告されている。従来の細胞障害性の抗癌剤や放射線治療は細胞分裂、増殖が活発な癌前駆細胞あるいはより分化した癌細胞を標的としており、腫瘍組織の階層性の頂点に位置する癌幹細胞の根絶には至っていないことが窺われる。

上皮細胞接着分子 epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) は細胞接着に関与するI型膜蛋白であり、正常の組織幹細胞および癌幹細胞との関連性が指摘されている。われわれはこれまでに、マウス卵巣に存在する幹細胞様の特性を有する細胞に特定の遺伝子操作を加えることにより、自己複製能と多分化能に加え、免疫能が正常のマウスに対して腫瘍形成能を示すマウス卵巣癌細胞 (induced mouse ovarian tumor-initiating cell: iMOT) の樹立に成功した。さらに、*in vivo* で形成された卵巣腫瘍において、EpCAM陽性の腫瘍細胞が卵巣癌幹細胞としての特性を有しており、特に、これらの卵巣癌幹細胞は抗癌剤治療抵抗性に関与している可能性が示されている。

## 2. 研究の目的

従来の古典的な細胞障害性の抗癌剤は、“total kill theory”として強力な殺腫瘍効果をもって癌の制圧を目指すものであった。しかし、われわれが日常の卵巣癌診療においてしばしば経験する治療抵抗性あるいは寛解後の再発・転移など、既存の抗癌剤治療に対して限界を感じることも少なくない。卵巣癌の再発症例、特に従来の抗癌剤治療に抵抗性を示す腫瘍においては、分子標的薬の重要性が今後さらに高まっていくことが予想される。

近年、悪性腫瘍の治療抵抗性において、癌幹細胞が重要な役割を担っていることが報告されている。今回、われわれは抗癌剤抵抗性を示す EpCAM 陽性の卵巣癌幹細胞を標的とした分子標的薬による新たな治療戦略の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

これまでにわれわれが行った解析の結果、EpCAM陽性の腫瘍細胞は従来の抗癌剤に対して抵抗性を有することが示されている。近年、乳癌や大腸癌を含む様々な固形癌において、EpCAM陽性の腫瘍細胞に対する分子標的薬であるアデカツム (adecatumumab) の抗腫瘍効果が注目されている。adecatumumab は、EpCAM に対して中程度の親和性を示す完全ヒトモノクローナル IgG1 抗体として開発された分子標的薬であり、癌細胞表面の EpCAM に結合することで、補体依存性細胞障害活性 (CDC 活性) あるいは抗体依存性細胞障害活性 (ADCC 活性) を惹起し殺腫瘍効果を示す。したがって、これらの adecatumumab は、卵巣癌幹細胞を標的とした新たな治療戦略として有望である可能性が考えられる。われわれが樹立した卵巣癌マウスモデルやヒト卵巣癌細胞株に加え、卵巣癌の臨床検体を用いることで、各種 *in vitro* ならびに *in vivo* の実験系を駆使して、卵巣癌幹細胞に対する adecatumumab の有効性について多角的な検証を行った。

## 4. 研究成果

今回われわれは、卵巣癌における EpCAM の分子生物学的な役割を明らかにすることで、有望な分子標的薬というツールを通じて、卵巣癌幹細胞を標的とした新たな治療戦略の開発を試みた。一連の解析の結果、卵巣癌細胞株を用いた *in vitro* での解析において、抗癌剤を添加することで EpCAM 陽性細胞の割合が増加することが明らかにされた。さらに、樹立した卵巣癌マウスモデルを用いた *in vivo* での解析では、抗癌剤をマウスの腹腔内に投与することで、腫瘍の縮小効果がみられる一方で、縮小した腫瘍組織においては、EpCAM 陽性細胞の割合が著しく増加するといった現象が見出された。つまり、EpCAM 陽性の卵巣癌幹細胞は抗癌剤治療抵抗性に関与していることが明らかとなった (図 1)。

さらに、われわれは抗癌剤治療抵抗性のメカニズムを明らかにするために、抗癌剤誘導性のアポトーシスに関する検討を行った。Western blottingにて、アポトーシス関連蛋白を網羅的に解析した結果、EpCAM陽性の卵巣癌細胞が抗アポトーシス作用を有し、それらのメカニズムを介することで、抗癌剤に対して耐性を示すことを証明した(図2)。

加えてわれわれは、卵巣癌におけるEpCAM発現の臨床的意義を明らかにするために、卵巣漿液性癌の症例に対して、EpCAMの免疫染色を行い予後との関連性について検討した。その結果、EpCAM高発現の症例群において統計学的な有意差をもってその生存率が低いという結果が明らかにされた(図3)。つまり、EpCAM陽性の卵巣癌幹細胞の存在あるいはその程度が予後と相関している可能性が示された。

また、adecatumumabを用いた治療実験では、*in vitro*にて卵巣癌細胞株に対してadecatumumabを添加することで、EpCAM陽性の卵巣癌細胞に対する抗腫瘍効果が示された。加えて、われわれが樹立したマウスモデルを用いた*in vivo*での解析を行った結果、adecatumumabを投与することで、著明な腫瘍の縮小効果が証明された。今回われわれが行った一連の研究結果から、EpCAMを標的とした分子標的治療は、卵巣癌幹細胞を標的とした新たな治療戦略として有望である可能性が示された。

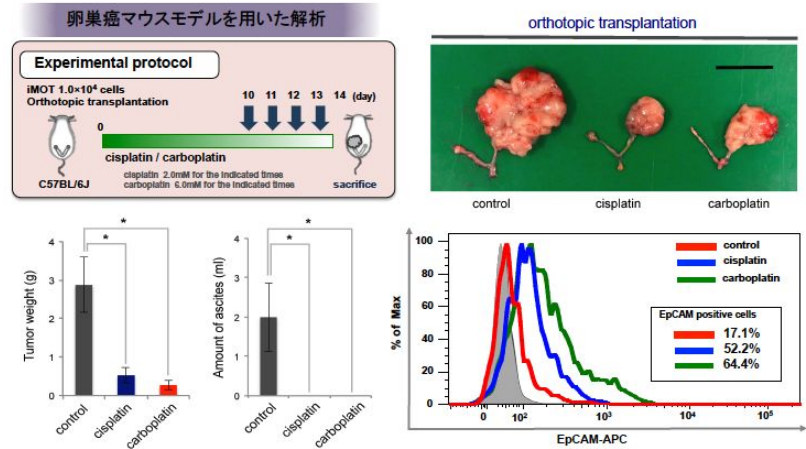


図1. EpCAM陽性の腫瘍細胞は抗癌剤治療抵抗性に関与していることが見出された。抗癌剤治療後の残存病巣において、EpCAM陽性細胞が将来的な再発に関与している可能性がある。

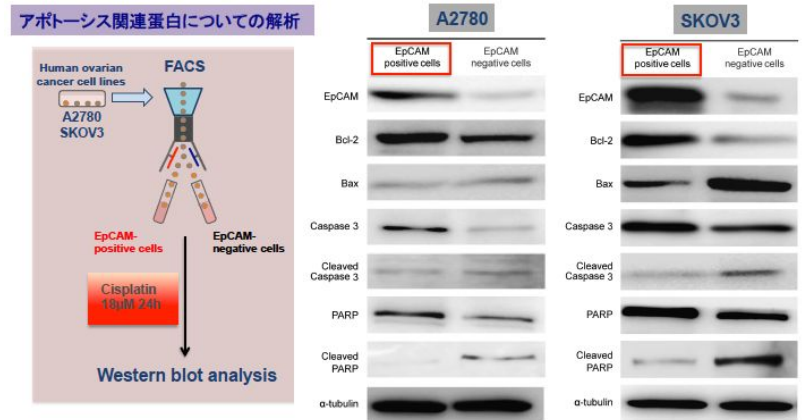


図2. アポトーシス関連蛋白について網羅的な解析を行った結果、EpCAM陽性の腫瘍細胞は抗アポトーシス作用を示すことが明らかになった。

進行期I-IV期の卵巣癌181症例を対象として、原発巣におけるEpCAM発現と予後との関連性についてKaplan-Meier法を用いて解析を行った。

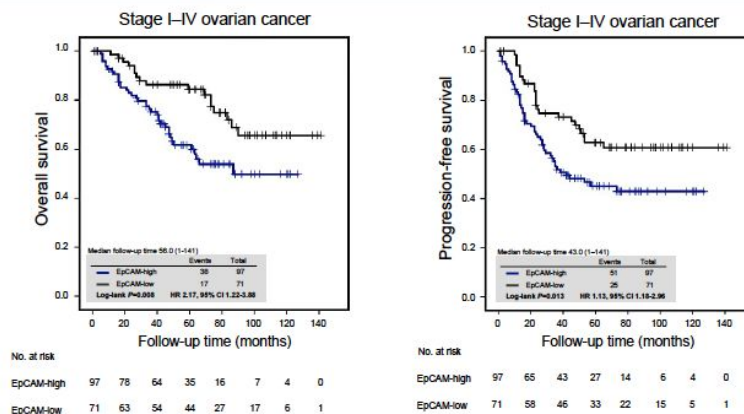


図3. Kaplan-Meier法による解析の結果、EpCAM高発現群は低発現群と比較して、予後不良であることが示された。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 5 件)

1. Motohara T, Masuda K, Morotti M, Zheng Y, El-Sahhar S, Chong KY, Wietek N, Alsaadi A, Karaminejadranjbar M, Hu Z, Artibani M, Gonzalez LS, Katabuchi H, Saya H, Ahmed AA. An evolving story of the metastatic voyage of ovarian cancer cells: cellular and molecular orchestration of the adipose-rich metastatic microenvironment. **Oncogene**. 38:2885-2898, 2018 査読あり
2. Motoooka Y, Motohara T, Honda R, Tashiro H, Mikami Y, Katabuchi H. Radical resection of an endometrioid carcinoma arising from endometriosis in the round ligament within the right canal of Nuck: a case report and literature review. **Gynecol Oncol Rep**. 24:61-64,2018 査読あり
3. Tayama S, Motohara T, Fujimoto K, Narantuya D, Li C, Sakaguchi I, Tashiro H, Saya H, Nagano O, Katabuchi H. The impact of EpCAM expression on response to chemotherapy and clinical outcomes in patients with epithelial ovarian cancer. **Oncotarget**. 8:44312-44325,2017 査読あり
4. Miranda F, Mannion D, Liu S, Zheng Y, Mangala LS, Redondo C, Herrero-Gonzalez S, Xu R, Taylor C, Chedom DF, Karaminejadranjbar M, Albukhari A, Jiang D, Pradeep S, Rodriguez-Aguayo C, Lopez-Berestein G, Salah E, Abdul Azeed KR, Elkins JM, Campo L, Myers KA, Klotz D, Bivona S, Dhar S, Bast RC Jr, Saya H, Choi HG, Gray NS, Fischer R, Kessler BM, Yau C, Sood AK, Motohara T, Knapp S, Ahmed AA. Salt-Inducible kinase 2 couples ovarian cancer cell metabolism with survival at the adipocyte-rich metastatic niche. **Cancer Cell**. 30:273-289,2016 査読あり
5. Motohara T, Fujimoto K, Tayama S, Narantuya D, Sakaguchi I, Tashiro H, Katabuchi H. CD44 variant 6 as a predictive biomarker for distant metastasis in patients with epithelial ovarian cancer. **Obstet Gynecol**. 127:1003-1011,2016 査読あり

(学会発表) (計 3 件)

1. 16th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS 2016) (Oct. 29-31, 2016, Lisbon, Portugal) CD44 Variant 6 as a Biomarker for Distant Metastasis in Epithelial Ovarian Cancer Patients. Takeshi Motohara, Koichi Fujimoto, Isao Sakaguchi, Hironori Tashiro, Hidetaka Katabuchi.
2. The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (October 6-8, 2016, Yokohama, Japan) The effect of EpCAM on response to chemotherapy and clinical outcomes in epithelial ovarian cancer patients. Takeshi Motohara, Shingo Tayama, Dashdemberel Narantuya, Yuko Takeshita, Isao Sakaguchi, Hironori Tashiro, Hidetaka Katabuchi.
3. The 29th Euro-Global Summit on Cancer Therapy & Radiation Oncology (July. 23-25, 2018, Rome, Italy) Cancer stem cell marker EpCAM is involved in resistance to chemotherapy and poor prognosis in ovarian cancer patients. Takeshi Motohara.

(図書) (計 3 件)

1. Tashiro H, Imamura Y, Motohara T, Sakaguchi I, Katabuchi H. Morphological and molecular pathogenesis of epithelial ovarian tumors. Comprehensive Gynecology and Obstetrics. Frontiers in ovarian cancer science. pp.37-56. 2017 (Springer) (全 314 ページ)
2. Motohara T, Katabuchi H. Genomics in Gynecological Cancer: Future Perspective. Comprehensive Gynecology and Obstetrics. Precision Medicine in Gynecology and Obstetrics. pp.9-21. 2017 (Springer) (全 250 ページ)
3. Motohara T, Katabuchi H. Emerging role of CD44 variant 6 in driving the metastatic journey of ovarian cancer stem cells. Cell Biology of the Ovary. pp.73-88. 2018 (Springer) (全 166 ページ)

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名:片淵 秀隆

ローマ字氏名: Katabuchi Hidetaka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。