

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11130

研究課題名(和文) 卵巣癌におけるレチノイン酸シグナル伝達の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of retinoic acid signaling in ovarian cancer

研究代表者

平川 隆史(hirakawa, Takashi)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80375534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣腫瘍組織におけるPin1の高発現は組織型(漿液性癌)、臨床進行期(II-IV期)と相関していた。非漿液性癌45例を対象とした無増悪生存期間に影響を与える因子の多変量解析において、臨床進行期、Pin1高発現が独立した予後不良因子として抽出された。Pin1阻害剤の抗腫瘍効果を培養細胞株で検証したところ、SKOV3とEGCG、OVSAHOとJugloneの組み合わせにおいて低濃度のPin1阻害剤での抗腫瘍効果が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮性卵巣癌においてPin1の高発現は予後不良因子となること、特に非漿液性癌においては独立した予後不良因子となることが示された。卵巣漿液性癌培養細胞系において低濃度でのPin1阻害剤で殺細胞効果が確認された。Pin1は卵巣癌治療の標的分子の1つになりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：High expression of Pin1 in ovarian tumor tissues was correlated with histological type (serous cancer) and clinically advanced stage (II to IV stage). In a multivariate analysis of factors affecting progression-free survival in 45 non-serous cancers, clinical stage and high Pin expression were extracted as independent poor prognosis factors. The antitumor effect of Pin1 inhibitors was verified in cultured cell lines. The antitumor effect at low concentration was confirmed in SKOV3 and EGCG, OVSAHO and Juglone, respectively. These results suggest that Pin1 may be one of the target molecules for ovarian cancer treatment.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 シグナル伝達 治療標的

1. 研究開始当初の背景

本邦における卵巣癌の罹患率は増加傾向にある。卵巣癌は早期発見が困難であり、診断時には進行していることが多く、治療困難な癌腫として認識されている。一方で化学療法に対する感受性が高く、進行していても長期生存、あるいは治癒に至る症例が散見される。進行症例の多くは再発し、薬物療法を供することになるが、最終的には薬剤抵抗性腫瘍となり死の転帰を迎える。再発卵巣癌に対して現在使用される化学療法薬の効果は限定的であり、新規薬剤の導入が望まれている。

レチノイドはビタミン A の類縁化合物の総称であり、体内での代謝過程においてレチノール、レチナール、レチノイン酸(RA)、およびそれらの誘導体として存在する。そのなかで天然生理活性物質である all trans retinoic acid(ATRA)や 9-cis retinoic acid などの RA は、核内受容体である RA 酸受容体(RAR)やレチノイド X 受容体(RXR)のリガンドとして働き、RA 酸応答配列(RARE)を介し、遺伝子の転写調節に関わることが知られ、このシグナル伝達経路は RA シグナル経路と呼ばれている。

RA は RA シグナル伝達経路を介して腫瘍細胞の増殖・転移の抑制、アポトーシス誘導を誘起し、抗腫瘍効果を発揮する。急性前骨髄性白血病細胞や乳癌細胞における RA シグナル伝達経路の詳細は報告されているが、上皮性悪性卵巣腫瘍に関する検討は十分になされていなかった。

RA の作用は RAR を介する古典的な RA シグナル伝達経路の活性化によって発揮されると考えられてきたが、近年急性全骨髄性白血病細胞及びトリプルネガティブ乳がん細胞において RA が Pin1 と呼ばれるプロリルイソメラーゼに直接結合し、抗腫瘍効果を発揮することが報告された。

細胞内シグナル伝達の制御に最も重要となる因子はカスケードを構成するタンパクのリン酸化であるが、タンパクの立体構造の変化もカスケードの制御に寄与することが知られている。Pin1 は pSer/pThr-Pro motif を認識し、プロリンの cis/trans 構造を異性化することでタンパクの立体構造を変化させる酵素である。Pin1 は p53, cyclinD1 など発癌に関与する種々のタンパクの異性化に関与することが示されており、種々の癌種において Pin1 の高発現が予後不良因子となることや腫瘍細胞における Pin1 の機能抑制が治療標的になることが報告されている。癌増殖のシグナル伝達を制御する因子として、今後の臨床応用の可能性を含めて注目されている因子である。

2. 研究の目的

本研究は卵巣癌における RA シグナル伝達経路と Pin1 との関連を評価し、卵巣癌の新規治療戦略の確立を目指すことを目指し、以下 2 点を研究目的とした。

- (1) RA/Pin1 が卵巣癌治療の標的候補となりうるかを検証するため培養細胞における RA/Pin1 機能阻害による抗腫瘍効果を検証する。
- (2) Pin1 発現強度と臨床病理学的因子の相関性を検討する。

3. 研究の方法

- (1) ヒト卵巣癌培養細胞株を用いた RA シグナル伝達の賦活/Pin1 機能抑制による抗腫瘍効果の検討

ヒト卵巣癌細胞株 6 種(SKOV3, OVCAR3, KURAMOCHI, OVSAHO, MCAS, Tov21G)を RA 関連物質(ATRA, 4-HPR, CD437, Bexarotene, Tamibarotene)と 48 時間共培養し、殺細胞効果を MTT アッセイで評価した。

Pin1 阻害剤である Juglone・EGCG・PiB についても同様の評価を行った。卵巣癌細胞株 6 種における内因性の Pin1 発現強度を、抗 Pin1 抗体を用いた Western blot で評価した。

- (2) 卵巣癌臨床検体における Pin1 発現と臨床病理学的因子との相関の評価

群馬大学医学部附属病院で卵巣癌のため 2008 年から 2012 年に手術治療を行った 90 例についてパラフィン包埋組織における RAR、RXR、Pin1 の発現強度を免疫組織化学染色法で評価した。予備実験の結果、Pin1 発現について臨床病理学的検討を行うこととした。組織型、臨床進行期、術前化学療法の有無、患者年齢などの臨床情報との関連性をフィッシャー法で検定した。

- (3) Pin1 発現強度と臨床予後の相関性の検討

Pin1 発現強度を低発現群、高発現群の 2 群にわけ、無増悪生存期間、全生存期間について Kaplan-Meier 法で評価した。2 群間の有意差検定には Log-rank 検定を用いた。組織型、年齢、臨床進行期、Pin1 発現について Cox 比例ハザードモデルに基づく単変量解析を行った。単変量解析で有意であった因子を共変量に組み込み、Cox 比例ハザードモデルに基づく多変量解析を行った。サブグループとして漿液性癌群と非漿液性癌群を個別に解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト卵巣癌細胞株における RA 関連物質の抗腫瘍効果

細胞株 6 種と RA 関連物質 5 種の共添加による IC50 を表 1 に示す。既知の報告通り、SKOV3 に対する CD437 の抗腫瘍効果が検出され、他の組み合わせと比較しても低濃度での効果を有することが確認された (表 1)。

	IC50 (μM)					
	SKOV3	OVCAR3	KURAMOCHI	OVSAHO	MCAS	TOV-21G
ATRA	NE	NE	NE	56.0	NE	73.7
CD437	0.5	10.2	40.3	8.7	6.0	31.2
Bexarotene	68.3	63.7	47.9	42.7	NE	33.0
Tamibarotene	NE	NE	NE	46.5	NE	NE
4-HPR	17.3	20.7	15.1	7.0	37.1	4.6

表 1 RA 関連物質の卵巣癌培養細胞株に対する抗腫瘍効果

(2) ヒト卵巣癌細胞株における Pin1 阻害剤の抗腫瘍効果

細胞株 6 種と Pin1 阻害剤 3 種の共添加による IC50 を算出した。PiB の添加による抗腫瘍効果は確認されなかった。漿液性癌由来の OVSAHO, SKOV3 はそれぞれ Juglone, EGCG との組み合わせで低い IC50 が観察された (表 2)。

	IC 50 (μM)					
	SKOV3	OVCAR3	KURAMOCHI	OVSAHO	MCAS	TOV-21G
Juglone	33.5	40	50.6	7.26	54.1	28.2
EGCG	5.93	18.9	25.4	27.6	36.6	30.8

表 2 Pin1 阻害剤の卵巣癌培養細胞株に対する抗腫瘍効果

(3) ヒト卵巣癌細胞株における内因性 Pin1 発現の検証

ヒト卵巣癌細胞株における内因性 Pin1 は全ての漿液性癌由来の細胞株と明細胞癌由来の Tov-21G に検出された。発現強度は OVSAHO で最も強く、SKOV3, Tov-21G には強発現していた。粘液性癌由来の MCAS には内因性 Pin1 の発現を認めなかった (図 1)。

Pin1 阻害剤で低い IC50 が観察された SKOV3 と OVSAHO において Pin1 阻害剤の抗腫瘍効果が観察されたことから、以下の実験では Pin1 発現と臨床病理学的因子との関連性を評価することとした。

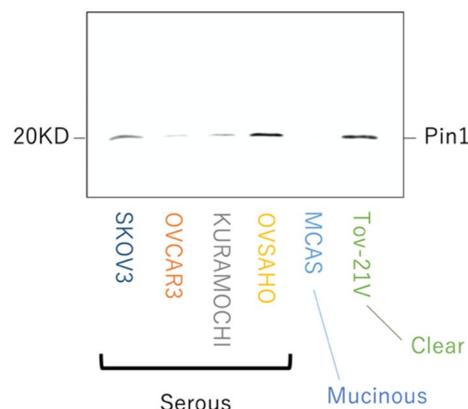


図 1 卵巣癌細胞株における内因性 Pin1 発現

(4) 卵巣癌腫瘍組織における Pin1 発現

Pin1 発現を低発現群 (n=49) と高発現群 (n=41) の 2 群にわけ、年齢、組織型 (漿液性癌群、非漿液性癌群)、原発巣、FIGO 進行期、NAC の有無との関連性を評価したところ、組織型、FIGO 進行期との間に統計学的な有意差を確認した (表 3)。すなわち漿液性癌及び卵巣外病変を有する腫瘍において Pin1 発現が増強する可能性が示唆された。

	n	(%)	Pin-1				P
			Low (n=49)		High (n=41)		
Age			56.3±9.9		55.8±9.3		0.781
Average±SD							
Histologic type							0.001
Serous	45	50	16	33	29	71	
Other	45	50	33	67	12	29	
Primary lesion							0.307
Ovarian	79	88	42	86	37	90	
Tubal	5	6	2	4	3	7	
Peritoneal	6	7	5	10	1	3	
FIGO Stage							0.011
I	47	52	32	65	15	37	
II + III + IV	43	48	17	35	26	63	
NAC							0.698
No	83	92	43	88	37	90	
Yes	7	8	3	12	4	10	

表 3 Pin1 発現と臨床病理学因子の相関

(5) Pin1 発現強度と臨床的予後との相関

Pin1 低発現群の 5 年生存率は 87%であったのに対し、高発現群では 69%であった。無増悪生存期間、全生存期間について Kaplan-Miere 法、Log-rank 検定で評価したところ、無増悪生存、全生存期間ともに統計学的な有意差を持って高発現群で期間が短縮することが示された (図 2)。

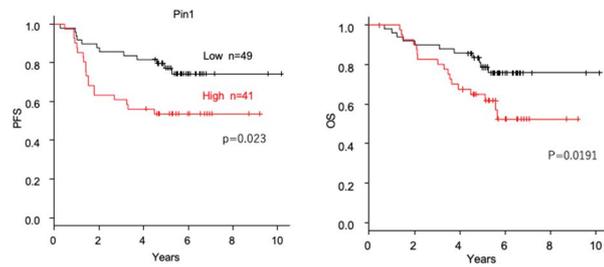


図 2 Pin1 発現強度別にみた予後

単変量解析、多変量解析結果を表 4 に示す。単変量解析で有意であった因子は臨床進行期と Pin1 発現強度であった。多変量解析で有意差が検出されたのは臨床進行期のみであった。

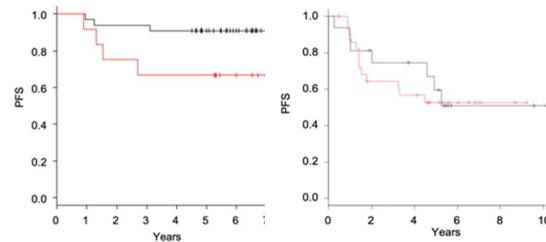
PFS	HR	Univariate		Multivariate	
		(95% CI)	P	HR	P
Age	1.011	0.9734-1.049	0.582		
Pin1 expressin (high vs low)	2.322	1.125-4.794	0.023		
Pathology (Serous vs others)	4.315	1.855-10.04	0.001		
Stage (I vs II + III +IV)	10.330	3.601-29.63	0.00001	11.240	2.678-47.16 0.0009
Primary lesion (ovary vs others)	1.829	0.75-4.46	0.185		

OS	HR	Univariate		Multivariate	
		(95% CI)	P	HR	P
Age	1.018	0.978-1.059	0.387		
Pin1 expressin (high vs low)	2.301	1.059-4.543	0.044		
Pathology (Serous vs others)	3.308	1.452-7.539	0.004		
Stage (I vs II + III +IV)	7.124	2.7-18.8	0.00007	7.124	2.7-18.8 0.0001
Primary lesion (ovary vs others)	1.828	0.693-4.825	0.223		

表 4 無再発期間、全生存期間に関係する因子

(6) 漿液性癌群と非漿液性癌群によるサブグループ解析

サブグループ解析として行った漿液性癌群と非漿液性癌群を分けて解析した。漿液性癌群での無増悪生存期間は Pin1 高発現、低発現群で有意差が検出されなかった。一方非漿液性癌群における無増悪生存期間は Pin1 高発現群において統計学的な有意差を持って期間が短縮することが示された。



漿液性癌群 非漿液性癌群
図 3 サブグループ別にみた無増悪生存期間

非漿液性癌群について単変量・多変量解析を行ったところ、単変量解析で有意であった因子は臨床進行期と Pin1 発現強度であり、多変量解析でも臨床進行期と Pin1 発現強度の 2 因子に有意差を認めた (表 5)。

PFS	HR	Univariate		Multivariate	
		(95% CI)	P	HR	P
Age	1.463	0.2916-7.337	0.644		
Pin1 expressin (high vs low)	4.280	1.054-20.2	0.048	4.667	1.02-21.35 0.047
Stage (I vs II + III +IV)	7.077	1.246-40.19	0.027	8.066	1.541-42.23 0.014

表 5 非漿液性癌群の無増悪期間に関連する因子

以上の結果より Pin1 の機能阻害が上皮性卵巣癌の治療標的になりうること、特に非漿液性卵巣癌において Pin1 が予後不良のマーカーになりうる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Darwis NDM, Nachankar A, Sasaki Y, Matsui T, Noda SE, Murata K, Tamaki T, Ando K, Okonogi N, Shiba S, Irie D, Kaminuma T, Kumazawa T, Anakura M, Yamashita S, Hirakawa T, Kakoti S, Hirota Y, Tokino T, Iwase A, Ohno T, Shibata A, Oike T, Nakano T.	4. 巻 20
2. 論文標題 FGFR Signaling as a Candidate Therapeutic Target for Cancers Resistant to Carbon Ion Radiotherapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4563 ~ 4563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20184563	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohno T, Noda SE, Murata K, Yoshimoto Y, Okonogi N, Ando K, Tamaki T, Kato S, Hirakawa T, Kanuma T, Minegishi T, Nakano T	4. 巻 10
2. 論文標題 Phase I Study of Carbon Ion Radiotherapy and Image-Guided Brachytherapy for Locally Advanced Cervical Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 338-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers10090338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakao K, Hirakawa T, Suwa H, Kogure K, Ikeda S, Yamashita S, Minegishi T, Kishi H.	4. 巻 28
2. 論文標題 High Expression of Ubiquitin C-terminal Hydrolase L1 Is Associated With Poor Prognosis in Endometrial Cancer Patients.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Gynecol Cancer.	6. 最初と最後の頁 675-683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IGC.0000000000001201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiroto Suwa , Hiroshi Kishi , Fumiharu Imai , Kohshiro Nakao , Takashi Hirakawa , Takashi Minegishi	4. 巻 8
2. 論文標題 Retinoic acid enhances progesterone production via the cAMP/PKA signaling pathway in immature rat granulosa cells	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 62 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2016.08.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hirakawa T, Ikeda S, Kobayashi A, Inoue N, Nishimura T, Kogure K, Iwase A
2. 発表標題 Expression of Pin1 is a predictive biomarker of prognosis in epithelial ovarian cancer.
3. 学会等名 17TH BIENNIAL MEETING OF THE INTERNATIONAL GYNECOLOGIC CANCER SOCIETY (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平川隆史、池田禎智、小林梓、井上直紀、西村俊夫、小暮佳代子、岩瀬明
2. 発表標題 上皮性卵巣癌におけるPin1阻害剤による抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----