

令和元年6月16日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16832

研究課題名(和文) 卵巣癌におけるBH3模倣薬による細胞死誘導をもとにした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment based on induction of cell death by BH3 mimetics in ovarian cancer

研究代表者

櫻山 智子 (Kashiyama, Tomoko)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：70755719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：婦人科腫瘍におけるアポトーシスに関連する分子標的薬の抗腫瘍効果を検討した。子宮体癌と卵巣癌細胞株に対しBH3模倣薬を添加すると細胞増殖を抑制し、細胞周期解析ではアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。また分子標的薬のPI3K/mTOR同時阻害薬との併用では相乗効果が示された。卵巣明細胞癌細胞株に対しMDM2阻害剤とEverolimusの併用も新規治療の選択肢となり得ると考え、細胞株を用いて細胞増殖抑制効果を確認した。ヌードマウス皮下移植モデルを作成し両材の経口投与を行ったところ細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導効果を認め、併用ではそれぞれの単剤と比較して有意な細胞増殖抑制効果の増強を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌は抗癌剤耐性を獲得し再発を繰り返す難治性の悪性腫瘍であり、子宮体癌は再発時の抗癌剤の選択肢が限られていることから、新規の治療戦略が求められている。これらの婦人科悪性腫瘍ではBcl-2 familyやMDM2、p53、PI3K/mTORをはじめとするアポトーシスに関連する経路の異常が知られており、この経路をターゲットとした分子標的治療は新規治療法の選択肢となりうる。我々は本研究を通してBH3模倣薬、MDM2阻害剤、mTOR阻害剤の抗腫瘍薬としての可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated the antitumor effects of molecular targeting drugs related to apoptosis in gynecologic tumors. Addition of BH3 mimics BT 737 to endometrial and ovarian cancer cell lines inhibited cell proliferation and cell cycle analysis revealed the induction of apoptosis. In addition, the combination with the molecularly targeted drug PI3K / mTOR co-inhibitor showed a synergistic effect. We considered that the combination of MDM2 inhibitor and mTOR inhibitor could be another novel therapeutic option for ovarian clear cell carcinoma and we confirmed cell proliferation inhibitory effects using cell lines. We also confirmed cell growth suppression and apoptosis induction in subcutaneous tumor models of nude mice. The combination of MDM2 inhibitor and mTOR inhibitor showed significant cell growth suppression effects compared to each single agent.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：分子標的薬 卵巣癌 子宮体癌 アポトーシス 婦人科悪性腫瘍 Bcl-2 family PI3K/mTOR阻害薬 MDM2阻害薬

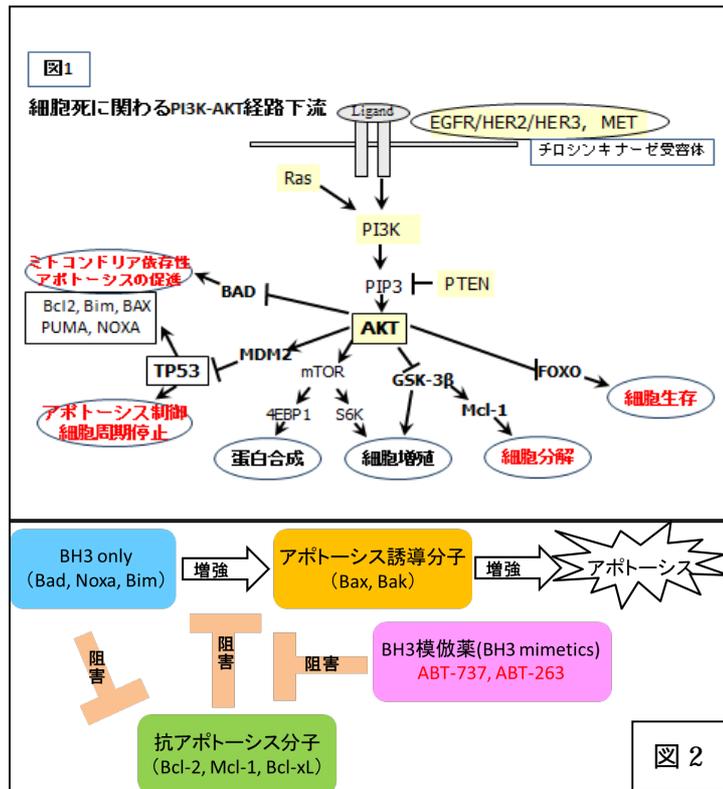
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は女性の癌として 8 番目に罹患率が高く、7 番目に致死率が高い。初回治療では抗癌剤感受性を示すことが多いものの次第に抗癌剤耐性を獲得し再発を繰り返す症例が多いことから、腫瘍増殖抑制をもたらす分子標的治療の開発とともに細胞死を誘導できるような新規治療法の開発が急務とされている。

申請者らはこれまで卵巣癌における RAS-PI3K/MAPK 経路の重要性を明らかとし、本経路を阻害することで腫瘍増殖抑制のみならずアポトーシスを誘導することを明らかにしてきた (図 1)(Kashiyama et al. PLoS One 2014, Inaba et al. Oncotarget 2016)。しかし単剤でのアポトーシス誘導率は 10%台に留まり、癌病変の制御という観点からはより効率的にアポトーシス誘導を引き起こす他剤との併用療法について研究をすすめる必要がある。

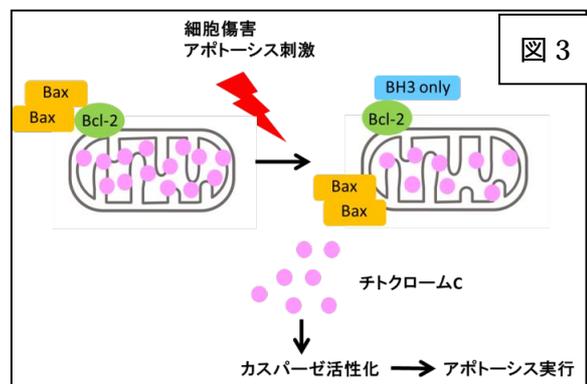
アポトーシス誘導には Bcl-2 family が重要な役割を担う。Bcl-2 family はミトコンドリアからのアポトーシスシグナルを制御している蛋白質群の総称であり、癌の進行、治療耐性獲得に寄与している。Bcl-2 family は抗アポトーシス分子(Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL)、アポトーシス誘導分子(Bax, Bak)、「BH3 only」蛋白と呼ばれる上記アポトーシス誘導分子群の作用を増強するもの(Bad, Noxa, Bim, And, Bid)の 3 種類に分類される(図 2)。細胞傷害などのアポトーシス刺激が加わると、



BH3 only 蛋白が活性化し、抗アポトーシス分子に結合し不活化することで活性化しアポトーシスを促進する(図 3)。卵巣癌では、正常細胞と比べて抗アポトーシス分子の発現上昇が高頻度でみられており、Bcl-2 family が治療標的の 1 つとして期待される。

近年 BH3 only 蛋白を模倣した薬剤(BH3 模倣薬)が開発され、種々の悪性腫瘍にアポトーシスシグナルを誘導する作用が知られている。BH3 模倣薬の 1 つである ABT-737 は、抗アポトーシス蛋白質の Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-w の低分子阻害剤であり、直接的にアポトーシス過程を引き起こすのではなく、アポトーシスのシグナルの効果を増強して化学療法剤や放射線と相乗的な細胞毒性を示す(図 2)。

同剤を経口投与可能となるよう改変した ABT-263 は第 1 相臨床試験の後、リンパ性白血病において第 2 相臨床試験が開始されている。また、ABT-737 を細胞株に添加した実験において他の Bcl-2 family 分子阻害



剤を併用することで相乗効果を示し、より効率的にアポトーシスを誘導できることが報告されている。

前述の通り申請者らは、TP53 変異陰性の卵巣癌において、RAS-PI3K/MAPK 経路の阻害によりアポトーシスを誘導しうることを明らかとしたが、そのアポトーシス細胞の比率は20%未満であった。合わせて申請者らはアポトーシス効率の低下に、Bcl-2 family 蛋白が寄与していることを示す知見を得ている。上記から、申請者らがこれまで証明してきた RAS-PI3K/MAPK 経路の阻害薬と BH3 模倣薬を併用することで細胞死効率を高める治療法とそのバイオマーカーを開発するという着想に至った。

2. 研究の目的

卵巣癌は抗癌剤耐性を獲得し再発を繰り返す難治性悪性腫瘍であり、殺細胞効果を高める治療法の開発が求められている。本研究の目的は、卵巣癌において細胞死を効率的に誘導する新規治療法を確立することである。具体的には、

- ・細胞株を用いた BH3 模倣薬及び MDM2 阻害薬の抗腫瘍効果の検討
- ・抗癌剤または他の分子標的薬と BH3 模倣薬、MDM2 阻害剤の併用によるアポトーシス誘導能の検討
- ・治療効果を予測するバイオマーカーの同定

を行う。卵巣癌の治療抵抗性の克服、抗アポトーシス機序に応じた治療の個別化への展開が可能になると考える。

3. 研究の方法

本研究は、主に臨床試験でヒトに投与されている低分子化合物を用いた前臨床試験である。卵巣癌に対して、以下の4つについて、実験を進める計画を立てた。

- (1) 卵巣癌および子宮体癌細胞株を用いた BH3 模倣薬の抗腫瘍効果の検討
- (2) 抗癌剤または他の分子標的薬と BH3 模倣薬の併用によるアポトーシス誘導能の検討

続いて、MDM2 阻害剤 (DS-3032b)、mTOR 阻害剤 (Everolimus) の卵巣明細胞癌への効果を検証するために、

- (3) 卵巣明細胞癌株および淡明細胞型腎細胞癌株に対する MDM2 阻害剤 (DS-3032b)、mTOR 阻害剤 (Everolimus) の細胞増殖抑制効果の検討
- (4) 上記2剤のヌードマウス皮下移植モデルへの薬剤経口投与による in vivo での抗腫瘍効果の検討を行った。

4. 研究成果

- (1) 細胞株を用いた BH3 模倣薬の抗腫瘍効果の検討

子宮体癌細胞株と卵巣癌細胞株を用い、BH3 模倣薬である ABT737、ABT199 を添加した際の細胞増殖抑制効果について検討するため Cell proliferation assay を行った。子宮体癌細胞株では、ABT737、ABT199 共に 50 μ M の添加でコントロールと比較して7割以上細胞増殖を抑制した。卵巣癌細胞株では、10 μ M で7割以上の細胞増殖抑制を示した。

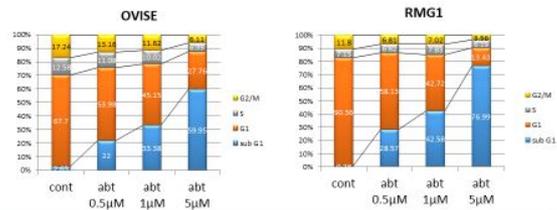
- (2) 抗癌剤または他の分子標的薬と BH3 模倣薬の併用によるアポトーシス誘導能の検討

卵巣癌細胞株2種類を用いて、ABT737 を添加した際の細胞周期に与える影響を検討した。ABT737 は濃度依存的に sub-G1 期細胞の割合を減少させ、アポトーシスを誘導する

可能性が示唆された。(図4)

細胞株を用いて BH3 模倣薬と他の薬剤を併用することでこのアポトーシスをより効率的に誘導できるかについて検討するため、抗癌剤としてパクリタキセル、分子標的薬として PI3K/mTOR 同時阻害薬を候補とし、ABT737 との併用が細胞増殖抑制に与える影響を検討した。パクリタキセルとの併用では、併用による相乗効果は

Cell cycle analysis



ABT737 caused dose-dependent increase of sub-G1 population among ovarian cancer cell lines.
⇒ Apoptosis is induced by ABT737.

図 4

認められなかったが、PI3K/mTOR 同時阻害剤である DS7423 との併用では、相乗効果が示された。(図5)

(3) 卵巣明細胞癌株および淡明細胞型腎細胞癌株に対する MDM2 阻害剤 (DS-3032b) mTOR 阻害剤 (Everolimus) の細胞増殖抑制効果の検討

(1) 卵巣明細胞腺癌株および淡明細胞型腎細胞癌株に対する MDM2 阻害剤 (DS-3032b) mTOR 阻害剤 (Everolimus) の細胞増殖抑制効果を MTT assay および Flow cytometry を用いて解析し、Western blotting により

Combination with PI3K/mTOR dual inhibitor

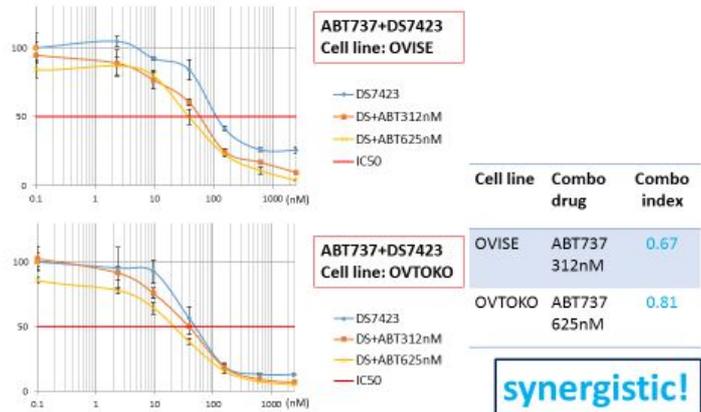


図 5

タンパク発現の変化を確認した。Everolimus は TP53 非依存的に静細胞性の細胞増殖抑制効果を認めたが (図6)、DS-3032b は野生型 TP53 細胞株においてのみ濃度依存性に細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導効果を認めた。(図7) Western blotting では、DS-3032b によるアポトーシス関連蛋白の誘導、Everolimus による mTOR 下流蛋白の抑制を確認した。

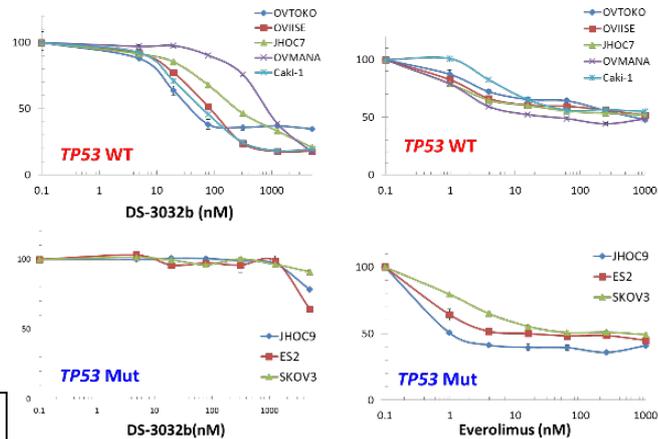
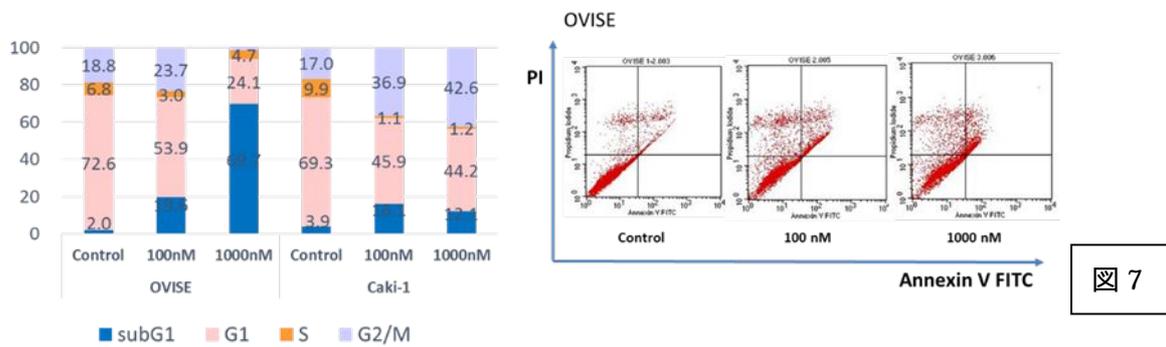


図 6



上記2剤のヌードマウス皮下移植モデルへの薬剤経口投与による in vivo での抗腫瘍効果の検討 DS-3032b と Evelolimus 併用によりヌードマウス皮下移植モデルでは、単剤と比較して有意な細胞増殖抑制効果の増強を認めた。(図 8)

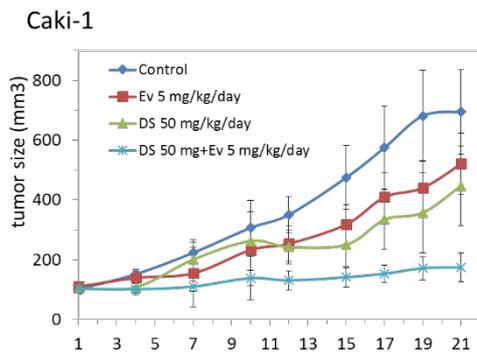


図 8

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Yoshino Yasunori, Taguchi Ayumi, Takao Maki, Kashiyama Tomoko, Furusawa Akiko, Uno Masaya, Okada Satoshi, Kino Nao, Yasugi Toshiharu. Lymphopenia after induction chemotherapy correlates with incomplete surgical resection in patients with advanced ovarian cancer. *Int J Clin Oncol*. 2019 Apr;24(4):428-436

Yoshino Yasunori, Taguchi Ayumi, Shimizuguchi Takuya, Nakajima Yujiro, Takao Maki, Kashiyama Tomoko, Furusawa Akiko, Kino Nao, Yasugi Toshiharu. A low albumin to globulin ratio with a high serum globulin level is a prognostic marker for poor survival in cervical cancer patients treated with radiation based therapy. *Int J Gynecol Cancer*. 2019 Jan;29(1):17-22

Chuwa Agapiti, Sone Kenbun, Oda Katsutoshi, Tanikawa Michihiro, Kukita Asako, Kojima Machiko, Oki Shinya, Fukuda Tomohiko, Takeuchi Makoto, Miyasaka Aki, Kashiyama Tomoko, Ikeda Yuji, Nagasaka Kazunori, Mori-Uchino Mayuyo, Matsumoto Yoko, Wada-Hiraike Osamu, Kuramoto Hiroyuki, Kawana Kei, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki. Kaempferol, a natural dietary flavonoid, suppresses 17 β -estradiol-induced survivin expression and causes apoptotic cell death in endometrial cancer. *Oncol Lett*. 2018 Nov;16(5):6195-6201

Sato Marie, Taguchi Ayumi, Kashiyama Tomoko, Oda Katsutoshi, Fukayama Masashi, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki et al. Blood Vessel Invasion Is a Strong Predictor of Postoperative Recurrence in Endometrial Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2018

Jun;28(5):875-881

〔学会発表〕(計1件)

水野祥、櫻山智子

ベバシズマブ時代の卵巣がん再発 そのプラチナ感受性の判断は妥当か 2018/6/17
第135回 関東連合産科婦人科学会 総会・学術集会

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。