

平成 21年 4月 30日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591947  
 研究課題名（和文） 卵巣癌標的分子 HB-EGF の発現亢進に関わるシグナル伝達機構の解明  
 研究課題名（英文） Molecular mechanism for the regulation of HB-EGF transcription in ovarian cancer,  
 研究代表者  
 宮本 新吾（MIYAMOTO SHINGO）  
 福岡大学・医学部・准教授  
 研究者番号：40209945

研究成果の概要：本研究によって、卵巣癌標的分子である HB-EGF は動脈硬化をきたすアテローム形成に重要な酸化 LDL とその受容体である CD36 を介した経路や上皮性悪性腫瘍が間葉系細胞に形態学的に変化することにより転移・浸潤能を獲得する現象である EMT に伴って発現亢進することが明らかとなり、これらの分子群は卵巣癌における新たな標的分子となり得ることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

EGF ファミリーは、癌の増殖・浸潤・転移の中心的役割を担い、受容体である EGFR を標的とした治療薬の開発が現在も引き続いて行われている。しかしながら、これらの標的治療薬が有効な悪性腫瘍は一部で、新たな治療の開発が切望されている。最近では野生型および変異型 EGFR や EGFR シグナル上流の遺伝子異常などによる癌増殖は、EGFR に結合する特異的な EGFR リガンドの発現亢進による EGFR 活性化が原因となっていることが明らかとなり、EGFR リガンドは EGFR と同様に標的となると考えられるようになってきた。我々は、これまでの研究成果により EGFR リガンドの一つである HB-EGF が卵巣癌を含めた多くの悪性腫瘍で特異的に高発現し腫瘍

形成能を制御する癌標的分子であること、さらに HB-EGF 特異的抑制剤である CRM197 は卵巣癌などの上皮系腺癌の標的治療薬となることを示してきた。したがって、CRM197 を用いた標的治療を有効に臨床活用する上で、HB-EGF 発現亢進に関わる分子機構を解明することは、HB-EGF を標的とする治療の有効例の選定や新たな標的分子の検索につながる情報を提供する重要な研究となると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は卵巣癌標的分子である HB-EGF が発現亢進する分子機構の解明することである。卵巣癌は腹水を著明に貯留する疾患であり、腹水中の脂質が癌活性化因子の

一つであることが報告されている。そこで、我々の研究成果から腹水中に HB-EGF と脂質として酸化 LDL が高濃度で存在することが分かっており、酸化 LDL とその受容体である CD36 を介した脂質代謝のシグナルによって HB-EGF の発現が上昇してくるかを検討する。一方で、HB-EGF の発現亢進と卵巣癌の腹膜播種は密接に関わり、その腹膜播種機構には Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) と EMT をコントロールする遺伝子として Snail が重要である。したがって、Snail と HB-EGF の発現変化についても検討する。以上の研究成果より、HB-EGF の発現亢進に関わる分子機構が明らかとなり、卵巣癌における新規標的分子が同定される。

### 3. 研究の方法

#### (1) HB-EGF 発現と酸化 LDL-CD36 経路の関連

- ①卵巣癌、正常卵巣、卵巣囊腫患者の腹水中酸化 LDL 量を ELISA 法、腹膜における CD36 発現を Real-Time PCR 法で解析する。
- ②酸化 LDL 添加による卵巣癌細胞株 RMG1、SKOV3 の細胞膜上に存在する膜型 HB-EGF 発現量の変化を Diphtheria Toxin Binding Assay、EGFR 及び ERK の活性化を Western Blot で解析する。
- ③RMG1、SKOV3 細胞に siRNA 法を用いて CD36 発現抑制後に酸化 LDL を添加し、②と同様の解析を行う。

#### (2) HB-EGF 発現と Snail の関連

- ①RMG1、SKOV3 細胞に siRNA 法を用いて Snail 発現抑制後の細胞膜上に存在する膜型 HB-EGF 発現量の変化を Diphtheria Toxin Binding Assay、細胞接着能を Spreading Assay、細胞浸潤能を Invasion Assay で解析する。
- ②HB-EGF に対する siRNA を導入した RMG1 細胞と野生型 RMG1 細胞をヌードマウスの腹腔内に播種に播種させ、形成させた腫瘍量と Snail の発現量を比較する。

### 4. 研究成果

- (1) 卵巣癌 (17 例)、良性卵巣腫瘍 (5 例) 及び正常卵巣症例 (8 例) の腹水中酸化 LDL の濃度及び腹膜における CD36 の発現は卵巣癌症例で有意に高値を示した (p 値 < 0.05)。卵巣癌細胞株 RMG1・SKOV3 に酸化 LDL を添加すると、培養上清中の HB-EGF 量は増加し、EGFR 及び ERK の活性化を認めた。RMG1・SKOV3 細胞における CD36 の発現を siRNA 法を用いて抑制すると、酸化 LDL による HB-EGF 発現誘導効果は抑制された。
- (2) RMG1 細胞において Snail の発現を抑制すると HB-EGF 発現量や細胞の接着能・浸潤能の低下を認め、HB-EGF を添加する

と Snail の mRNA 発現量の増加や EMT のマーカーである E-cadherin の発現低下も認めた。RMG1 細胞と RMG1 細胞の HB-EGF を発現抑制した細胞 (R-181) をヌードマウスの腹腔内に播種させたモデルでは、RMG1 細胞の腫瘍形成能は R-181 細胞と比較し有意に高く、HB-EGF 特異的抑制剤 CRM197 を腹腔内投与すると RMG1 細胞の腫瘍形成能を著明に抑制した。

以上の結果より、酸化 LDL-CD36 の経路及び Snail を介した EMT は HB-EGF を発現亢進させ、CD36 や snail1 は卵巣癌において新たな標的分子になり得ることが見出された。

我々は、EGFR リガンドの一つである HB-EGF が卵巣癌、膀胱癌、胃癌、乳癌、神経膠芽腫などの多くの悪性腫瘍の標的分子となることや、HB-EGF の特異的抑制剤 CRM197 が上記の悪性腫瘍の治療薬として有効であることを世界で初めて実証した。現在、HB-EGF 特異的抑制剤 CRM197 を用いて、卵巣癌に対する標的治療の確立を目指し、医師主導型治験を平成 19 年度より開始している。現在までの癌分子標的治療の開発において、増殖因子のリガンド (HB-EGF を含めた) を標的とした治療薬は世界的に報告がなく、本治療薬は新たな概念に基づいた画期的な治療法となると位置づけできます。したがって、本研究は、EGFR リガンドを標的とする新たな概念に基づいた研究であり、今回の研究成果は治療の有効例の選定や新たな標的分子の検索に多大な情報を提供することが期待できる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Yotsumoto F, Yagi H, Suzuki SO, Oki E, Tsujioka H, Hachisuga T, Sonoda K, Kawarabayashi T, Mekada E, Miyamoto S. / Validation of HB-EGF and amphiregulin as targets for human cancer therapy / Biochemical and Biophysical Research Communications 査読有【2008, 365(3), 555-561】
2. Yagi H\*, Yotsumoto F\*, Miyamoto S. / HB-EGF promotes transcoelomic metastasis in ovarian cancer through epithelial mesenchymal transition / Molecular Cancer Therapeutics 査読有【2008, 7(10):3441-3451】 \*Equally contributed.
3. Miyamoto S., Yagi H, Yotsumoto F, Kawarabayashi T, Mekada E. / Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a new

target molecule for cancer therapy / Advance Experimental Medical Biology 査読無【2008, 622, 281-295】

4. 四元 房典、**宮本 新吾**、目加田 英輔。 / 細胞増殖因子 HB-EGF を分子標的とした卵巣癌治療薬の開発 / BIO Clinica 査読無【2008, 23(7), 586-592】
5. Sonoda K, **Miyamoto S**, Yotsumoto F, Yagi H, Nakashima M, Watanabe T, Nakano H. / Clinical significance of RCAS1 as a biomarker of ovarian cancer / Oncology Reports 査読有【2007, 17(3), 623-628】
6. Sonoda K, **Miyamoto S**, Yamazaki A, Kobayashi H, Nakashima M, Mekada E, Wake N. / Biologic significance of receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1) as a pivotal regulator of tumor growth through angiogenesis in human uterine cancer / Cancer 査読有【2007, 110(9), 1979-1990】
7. Kageyama T, Ohishi M, **Miyamoto S**, Mizushima H, Iwamoto R, Mekada E. / Diphtheria toxin mutant CRM197 possesses weak EF2-ADP-ribosyl activity that potentiates its anti-tumorigenic activity / Journal of Chemistry 査読有【2007, 142(1), 95-104】
8. **Miyamoto S**, Yagi H, Yotsumoto F, Horiuchi S, Yoshizato T, Kawarabayashi T, Kuroki M, Mekada E. / New approach to cancer therapy: heparin binding-epidermal growth factor-like growth factor as a novel targeting molecule / Anticancer Research 査読有【2007, 27(6A), 3713-3721】
9. 四元 房典、八木 裕史、深見 達弥、目加田 英輔、**宮本 新吾**。 / HB-EGF を標的とした癌標的治療 / 細胞 査読無【2007, 39(7), 292-295】

[学会発表] (計 22 件)

1. 四元 房典 / Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB) 特異的抑制剤 CRM197(CRM)を用いた乳癌標的治療 / 第 12 回バイオ治療法研究会学術集会 / 2008 年 12 月 6 日 / 福岡
2. 園田 顕三 / RCAS1 induces apoptosis in putative receptor expressing cells via ectodomain shedding mediated by ADAM9 / 第 67 回日本癌学会学術総会 / 2008 年 10 月 28 日 / 名古屋
3. 深見 達弥 / The validation of molecularly targeted therapy against amphiregulin in pancreatic cancer / 第 67 回日本癌学会学術総会 / 2008 年 10 月 28 日 / 名古屋
4. 四元 房典 / The validation of CRM197, a specific inhibitor for HB-EGF, for molecularly targeted therapy in breast cancer patients / 第 67 回日本癌学会学術総会 / 2008 年 10 月 28 日 / 名古屋
5. 四元 房典 / HB-EGF と Amphiregulin を標的とした癌治療 / 第 28 回日本分子腫瘍マーカー研究会 / 2008 年 10 月 27 日 / 名古屋
6. Fukami T / The inhibition of amphiregulin blocks AKT as well as ERK activation in pancreatic cancer / 36<sup>th</sup> Congress of the International Society of Oncology and BioMarkers / 2008 年 10 月 7 日 / 東京
7. Yotsumoto F / Efficacy of cross-reacting material 197 (CRM197), a specific inhibitor for heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB), in breast cancer patients / 36<sup>th</sup> Congress of the International Society of Oncology and BioMarkers / 2008 年 10 月 7 日 / 東京
8. **Miyamoto S** / Phase I study of BK-UM (CRM197) in patients with ovarian cancer / 36<sup>th</sup> Congress of the International Society of Oncology and BioMarkers / 2008 年 10 月 6 日 / 東京
9. **宮本 新吾** / 再発卵巣癌を対象とした HB-EGF 特異的抑制剤 BK-UM の第 I 相臨床試験 / 第 7 回日本婦人科がん分子標的の研究会学術集会 / 2008 年 7 月 18 日 / 名古屋
10. Fukami T / Synergistic anti-tumor effects in combination of Gemcitabine with inhibitors for amphiregulin / American Association for Cancer Research 99<sup>th</sup> Annual Meeting / 2008 年 4 月 16 日 / San Diego, CA
11. Yotsumoto F / Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor (HB) regulates mammary tumorigenesis through EGFR as well as Her2 signal / American Association for Cancer Research 99<sup>th</sup> Annual Meeting / 2008 年 4 月 16 日 / San Diego, CA
12. 深見 達弥 / ヒト臍臓癌標的分子 amphiregulin の妥当性と amphiregulin 抑制剤の治療への応用性の可能性 / 第 11 回バイオ治療法研究会学術集会 / 2007 年 12 月 1 日 / 東京
13. 園田 顕三 / ADAM9 plays a pivotal role in ectodomain shedding of RCAS1, which induces apoptosis in peripheral lymphocytes / 第 66 回日本癌学会学術総会 / 2007 年 10 月 5 日 / 横浜
14. 深見 達弥 / Amphiregulin enhances drug resistance for pancreatic and colon cancers / 第 66 回日本癌学会学術総会 /

- 2007年10月5日／横浜
15. 四元 房典／HB-EGF or amphiregulin is a promising target for human cancer therapy／第66回日本癌学会学術総会／2007年10月5日／横浜
  16. **宮本 新吾**／Synergistic anti-tumor effects of CRM197 and paclitaxel in patients with advanced gastric cancer／第66回日本癌学会学術総会／2007年10月5日／横浜
  17. **宮本 新吾**／HB-EGF (HB) を標的とした卵巣癌治療の医師主導型治験／第6回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会／2007年7月21日／熊本
  18. 深見 達弥／卵巣癌における HB-EGF とタキソールとの関連／第6回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会／2007年7月21日／熊本
  19. 八木 裕史／卵巣癌腹膜における Heparin binding epidermal growth factor-like growth factor (HB) の役割／第6回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会／2007年7月21日／熊本
  20. 四元 房典／Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor (HB) と amphiregulin (AR) を標的とした癌治療／第6回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会／2007年7月21日／熊本
  21. 八木 裕史／Heparin binding epidermal growth factor-like growth factor (HB) に対する特異的抑制剤 CRM197 の卵巣癌腹膜播種に対する効果／第59回日本産科婦人科学会学術講演会／2007年4月16日／京都
  22. 四元 房典／酸化LDLとCD36による卵巣癌標的分子 Heparin Binding Epidermal Growth Factor Like Growth Factor (HB) 発現制御機構／第59回日本産科婦人科学会学術講演会／2007年4月16日／京都

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

1. 名称：抗癌剤の効果増強剤  
発明者：**宮本 新吾**、目加田 英輔  
権利者：阪大微生物病研究会  
番号：PCT/2008/050727 (特願 2007-011939)  
出願年月日：2008年1月21日  
国内外の別：国外
2. 名称：ヘパリン結合上皮細胞増殖因子様増殖因子に結合するモノクローナル抗体  
発明者：**宮本 新吾**、目加田 英輔、協和発酵(株)  
権利者：**宮本 新吾**、目加田 英輔、協和発酵(株)

- 番号：PCT/JP2007/6148 (特願 2007-315068)  
出願年月日：2007年12月5日  
国内外の別：国外
3. 名称：Gefinitib 感受性及び抵抗性肺癌に対する制癌効果  
発明者：**宮本 新吾**、目加田 英輔  
権利者：**宮本 新吾**、目加田 英輔  
番号：2007-167529  
出願年月日：2007年6月26日  
国内外の別：国内
  4. 名称：アンフィレギュリンを用いた腸管上皮細胞増殖方法  
発明者：**宮本 新吾**  
権利者：**宮本 新吾**  
番号：2007-114362  
出願年月日：2007年4月24日  
国内外の別：国内
  5. 名称：amphiregulin 阻害剤と抗癌剤の併用療法  
発明者：**宮本 新吾**  
権利者：**宮本 新吾**  
番号：2007-011939  
出願年月日：2007年1月22日  
国内外の別：国内

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 新吾 (MIYAMOTO SHINGO)  
福岡大学・医学部・准教授  
研究者番号：40209945

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし