

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18644

研究課題名（和文）卵巣粘液性癌に対するバイオマーカーとしての CDX2 の発現動態の解明

研究課題名（英文）Elucidation of expression dynamics of CDX2 as a biomarker for ovarian mucinous carcinoma

研究代表者

古宇 家正（Koh, Iemasa）

広島大学・医系科学研究科（医）・講師

研究者番号：10794779

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）：卵巣粘液性癌は化学療法に抵抗性で予後不良である。CDX2 をバイオマーカーとした個別化医療の可能性について検討した。細胞増殖やアポトーシスの抑制に関与している REG4 遺伝子に注目した。卵巣粘液性癌の臨床検体を使用し、免疫組織化学染色法によって、CDX2 と Reg IV の発現に相関関係を認めた。卵巣粘液性癌細胞株において、Reg IV の発現が CDX2 の遺伝子導入により増強した。それに伴い、アポトーシスが亢進し、5-FU に対する感受性も増強した。以上より、卵巣粘液性癌では、CDX2 を介して REG4 の発現を調節している可能性が示唆され、5-FU を中心とした新しい化学療法が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌の治療には化学療法が不可欠であり、その奏効率は予後に大きく影響を与える。卵巣癌の標準レジメンであるパクリタキセルとカルボプラチンの併用療法が開発され、大きく予後が改善された。しかし、卵巣粘液性癌は、以前として他の組織型より明らかに予後不良である。本研究の結果から、卵巣粘液性癌では、CDX2 を介して REG4 の発現を調節している可能性が示唆され、5-FU を中心とした新しい化学療法が期待された。CDX2 をバイオマーカーとした卵巣粘液性癌に対する新規治療法の開発は、個別化医療につながり、非常に意義のある研究と考える。

研究成果の概要（英文）：Ovarian mucinous carcinoma is resistant to chemotherapy and has a poor prognosis; we investigated the possibility of personalized medicine using CDX2 as a biomarker. We focused on the REG4 gene, which is involved in suppression of cell proliferation and apoptosis. Using clinical specimens of ovarian mucinous carcinoma, we found a correlation between CDX2 and Reg IV expression by immunohistochemical staining. In ovarian mucinous carcinoma cell lines, Reg IV expression was enhanced by gene transfer of CDX2. As a result, apoptosis was enhanced and sensitivity to 5-FU was also enhanced. These results suggest that the expression of REG4 may be regulated via CDX2 in ovarian mucinous carcinoma, and a new chemotherapy based on 5-FU is expected.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣粘液性癌 CDX2 Reg IV 5-FU

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は、婦人科悪性腫瘍の中で予後が悪い疾患である。上皮性卵巣癌の治療は、手術療法と化学療法の併用療法が基本だが、初回治療中や再発時に抗がん剤に対する抵抗性の獲得をしばしば認める。卵巣粘液性癌は、上皮性卵巣癌のうち3番目に多い組織型で、約10%程度を占めている。上皮性卵巣癌に対する化学療法では、カルボプラチンとパクリタキセルの併用療法が標準レジメンだが、卵巣粘液性癌はこの化学療法に対して抵抗性を示すことが知られている(文献1-3)。そのため、しばしば初期で診断されるにもかかわらず、他の組織型より明らかに予後が不良であり(文献1-3)、新規治療戦略の開発が求められている。

薬剤抵抗性に関して、ABCファミリーの一つであり、薬剤耐性遺伝子として知られている *multidrug resistance 1 (MDR1/ABCB1)* (文献4) に注目した。MDR1は癌細胞の細胞膜に発現して、ピンカアルカロイド系、アントラサイクリン系、タキサン系などの抗がん剤を細胞外へ排出することにより、薬剤耐性を獲得すると考えられている(文献4)。また、大腸癌においては、腸上皮特異的ホメオボックス転写因子 CDX2 の標的遺伝子として知られている。CDX2は、腸の発生、分化、および腸の表現型の維持に重要であり(文献5)、大腸癌・胃癌の発癌過程、分化度、生物学的悪性度に関与していることも示されている(文献5, 6, 7)。すでに大腸癌領域では CDX2 の発現動態による個別化治療(文献8)が行われている。原発性卵巣粘液性癌において、これまで大腸癌からの転移性卵巣癌と鑑別するために CDX2 の発現を確認してきた(文献9)が、CDX2 と MDR1 の関連については知られていなかった。そこで私は2016年に、卵巣粘液性癌において CDX2 と MDR1 の発現に相関関係を認め、高分化なものほど発現が強く、CDX2 が MDR1 の発現を調節することでパクリタキセルへの感受性の低下に関与していることを報告した(文献10)。また、胃癌において CDX2 の標的遺伝子として確認された *regenerating islet-derived family member 4 (REG4)* 遺伝子(文献11)は5-FUによって誘発されるアポトーシスを妨げることが示されている(文献12)。この結果を踏まえ、CDX2 の標的遺伝子や発現動態をさらに明らかにし、薬剤耐性の獲得機序を解明することで、CDX2 をバイオマーカーとした新規化学療法レジメンを確立したい。

2. 研究の目的

本研究の目的は、卵巣粘液性癌において CDX2 をバイオマーカーとした新たな化学療法レジメンの可能性を提示することである。卵巣粘液性癌に対する新規治療法の開発は重要な課題であり、近年開発が進んでいる分子標的薬やコンパニオン診断だけではなく、殺細胞性の抗がん剤の開発や新たな適応拡大も必要不可欠である。また、卵巣癌が薬剤耐性を獲得する機序に CDX2 の発現が関与しているのであれば、バイオマーカーとして期待される。そこで卵巣粘液性癌において、CDX2 が Reg IV の発現を調節していることを確認し、Reg IV が関与する EGFR/Akt/AP-1 シグナリング経路の活性とアポトーシスの抑制について解析する。そして、5-フルオロウラシル(5-FU)の有効性と抗 EGFR 抗体の効果を確認し、CDX2 をバイオマーカーとした個別化治療の確立を目指す。

3. 研究の方法

1) MDR1 以外の薬剤耐性に関する CDX2 の標的遺伝子について模索する

卵巣粘液性癌における CDX2 と Reg IV の関連

Reg IV の発現を、広島大学病院で診断・治療を行った卵巣癌の臨床検体を使用し、免疫組織化学染色法によって確認する。卵巣粘液性癌細胞株において、CDX2 を遺伝子導入することで強制発現させ、CDX2 の発現を siRNA によって抑制させることで、Reg IV の発現の変化を確認する。これらの結果から CDX2 が Reg IV の発現を調節していることを示す。

CDX2 の標的遺伝子について網羅的遺伝子解析

卵巣粘液性癌において、MDR1 や Reg IV 以外の CDX2 の標的遺伝子を網羅的遺伝子解析にて検証する。アポトーシスに関連する遺伝子や CDX2 が制御する経路を模索する。

2) EGFR/Akt/AP-1 シグナリング経路とアポトーシス

Reg IV が EGFR/Akt/AP-1 経路を介してアポトーシスに関与しているため(文献11, 12)、卵巣粘液性癌細胞株において CDX2 の遺伝子導入による Reg IV を介した EGFR/Akt/AP-1 シグナリング経路の発現変化を western blot 法で確認する。さらに Bcl-2、Bcl-xl、survivin の発現

とアポトーシスへの影響を確認し、5-FU の効果との関連を検討する。アポトーシスの分析・評価は apoptosis assay にて検討する。

3) 5-フルオロウラシル (5-FU) の有効性の確認

CDX2 をバイオマーカーとした新たな化学療法レジメンとして、大腸癌の標準レジメンである 5-フルオロウラシル (5-FU) を中心とした化学療法が有効である可能性がある。レトロウイルス感染によって卵巣粘液性癌細胞株に CDX2 を遺伝子導入することで、5-FU の効果の変化を MTS assay を使用し確認する。

4) 抗 EGFR 抗体の有効性の確認

CDX2 の発現を介して EGFR/Akt/AP-1 シグナリング経路が活性化するのであれば、抗 EGFR 抗体である分子標的治療薬 (セツキシマブ) の効果を MTS assay によって確認する。

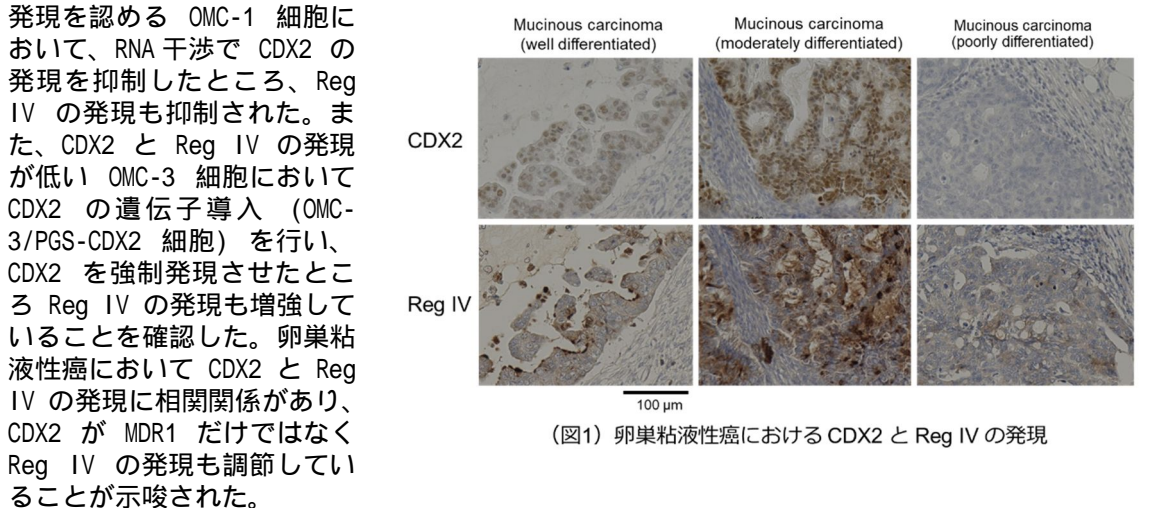
5) 再発時や薬剤耐性獲得時の CDX2 の発現変化

薬剤感受性のある卵巣粘液性癌の臨床検体を使用し、再発時や薬剤耐性獲得時の CDX2 の発現の変化を確認する。

4. 研究成果

CDX2 の標的遺伝子には、MDR1 以外に細胞増殖やアポトーシスの抑制に関与している *regenerating islet-derived family member 4 (REG4)* 遺伝子が胃癌の領域で報告されている。分泌タンパク質である Reg IV は、EGFR/Akt/AP-1 pathway を活性化させ、5-フルオロウラシル (5-FU) によって誘発されるアポトーシスを抑制することで 5-FU への抵抗性を示す。

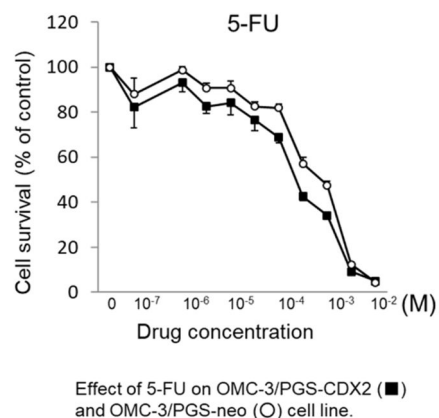
我々は、卵巣粘液性癌の臨床検体を使用し、免疫組織化学染色法によって、卵巣粘液性癌の高分化型と中分化型で CDX2 と Reg IV がともに発現していることを確認した (図 1)。次に卵巣粘液性癌細胞株を使用し、CDX2 による Reg IV の発現制御について検討した。CDX2 と Reg IV の発現を認める OMC-1 細胞において、RNA 干渉で CDX2 の発現を抑制したところ、Reg IV の発現も抑制された。また、CDX2 と Reg IV の発現が低い OMC-3 細胞において CDX2 の遺伝子導入 (OMC-3/PGS-CDX2 細胞) を行い、CDX2 を強制発現させたところ Reg IV の発現も増強していることを確認した。卵巣粘液性癌において CDX2 と Reg IV の発現に相関関係があり、CDX2 が MDR1 だけではなく Reg IV の発現も調節していることが示唆された。



(図1) 卵巣粘液性癌における CDX2 と Reg IV の発現

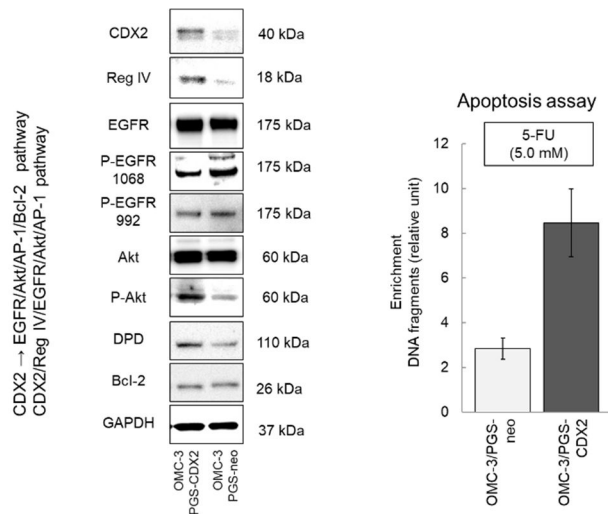
次に、Reg IV の発現が関連する EGFR/Akt/AP-1 pathway の活性化や 5-FU に対する感受性の低下について OMC-3/PGS-CDX2 細胞を用いて検討した。結果は予想と異なり、CDX2 が高発現している粘液性癌は発現のないものに比べてアポトーシスが亢進し、5-FU に対する感受性が高いことを明らかにした (図 2)。また、CDX2 発現のある卵巣粘液性癌に対する新規化学療法レジメンとして、5-FU と抗 EGFR 抗体である Cetuximab の併用療法を期待したが、Cetuximab の上乘せ効果は乏しかった。OMC-3/PGS-CDX2 細胞では、EGFR の発現やリン酸化に差がなく、アポトーシスの抑制に関連する Bcl-2 の発現の増強も認めなかった。一方で、Akt のリン酸化や 5-FU の分解における律速酵素である dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) の発現が CDX2 発現のないものより亢進していた (図 3)。これは、EGFR/Akt/AP-1 pathway とは別の経路が CDX2 により誘導もしくは抑制され、最終的にはアポトーシスの亢進と 5-FU の感受性に関連している可能性が考えられる。

次に、Reg IV の発現が関連する EGFR/Akt/AP-1 pathway の活性化や 5-FU に対する感受性の低下について OMC-3/PGS-CDX2 細胞を用いて検討した。結果は予想と異なり、CDX2 が高発現している粘液性癌は発現のないものに比べてアポトーシスが亢進し、5-FU に対する感受性が高いことを明らかにした (図 2)。また、CDX2 発現のある卵巣粘液性癌に対する新規化学療法レジメンとして、5-FU と抗 EGFR 抗体である Cetuximab の併用療法を期待したが、Cetuximab の上乘せ効果は乏しかった。OMC-3/PGS-CDX2 細胞では、EGFR の発現やリン酸化に差がなく、アポトーシスの抑制に関連する Bcl-2 の発現の増強も認めなかった。一方で、Akt のリン酸化や 5-FU の分解における律速酵素である dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) の発現が CDX2 発現のないものより亢進していた (図 3)。これは、EGFR/Akt/AP-1 pathway とは別の経路が CDX2 により誘導もしくは抑制され、最終的にはアポトーシスの亢進と 5-FU の感受性に関連している可能性が考えられる。



Effect of 5-FU on OMC-3/PGS-CDX2 (■) and OMC-3/PGS-neo (○) cell line.

(図2) CDX2 発現による 5-FU 単剤の効果



(図3) EGFR/Akt/AP-1 経路とアポトーシスへの影響

模索している。CDX2 を介してアポトーシスが誘導される経路を解析するとともに、新規レジメンとして大腸癌レジメンでもある 5-FU とオキサリプラチンの併用や 5-FU とベバシズマブの併用などを検討している。卵巣粘液性癌において、CDX2 をバイオマーカーとした新規治療戦略を確立し、個別化医療につなげていく。

(文献)

- Hess V, A'Hern R et al. J Clin Oncol 2004;22:1040-4.
- Cannistra SA. N Engl J Med 2004;351:2519-29.
- Winter WE 3rd, Maxwell GL et al. J Clin Oncol 2007;25:3621-7.
- Kimura Y, Morita S et al. Cancer Sci 2007;98:1303-10.
- Hinoi T, Fearon ER et al. Am J Pathol 2001;159:2239-48.
- Hinoi T, Loda M, Fearon ER et al. J Biol Chem 2003;278:44608-16.
- Hinoi T, Fearon ER et al. Gastroenterology 2002;123:1565-77.
- Piero D, Debashis S et al. N Engl J Med 2016;374:211-22.
- Seidman JD, Kurman RJ et al. Am J Surg Pathol 2003;27:985-93.
- Koh I, Hinoi T et al. Cancer Medicine 2016;5:1546-1555.
- Bishnupuri KS, Luo Q et al. Gastroenterology 2006;130:137-49.
- Mitani Y, Oue N et al. Oncogene 2007;26:4383-93.
- Koh I, Nosaka S et al. Cancer Genomics & Proteomics 2019;16(6):481-490.

卵巣粘液性癌に対する標準レジメンである TC 療法 (Paclitaxel + Carboplatin) の奏効率の低さは、CDX2 発現による MDR1 を介した Paclitaxel への感受性の低下が原因の一つであり、CDX2 の発現がある卵巣粘液性癌には大腸癌レジメンの key drug である 5-FU が新たな薬剤として期待できることを報告した (文献 13)。また、CDX2, MDR1 の発現がある臨床検体において、Reg IV の発現も認め、相関関係が示唆された。Reg IV の発現がある症例では予後が不良であり、予後予測因子としても可能性も考えられた。

現在、CDX2 の標的遺伝子を網羅的遺伝子解析にて検証し、アポトーシスに関連する遺伝子や CDX2 が制御する経路を

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 KOH IEMASA, NOSAKA SUGURU, SEKINE MASAKI, SUGIMOTO JUN, HIRATA EIJI, KUDO YOSHIKI	4. 巻 16
2. 論文標題 Regulation of REG4 Expression and Prediction of 5-Fluorouracil Sensitivity by CDX2 in Ovarian Mucinous Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Genomics - Proteomics	6. 最初と最後の頁 481 ~ 490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/cgp.20151	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Iemasa Koh
2. 発表標題 Prediction of 5-fluorouracil Sensitivity by CDX2 in Ovarian Mucinous Carcinoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------