

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18214

研究課題名（和文）ペントースリン酸経路を基軸とした卵巣がん幹細胞の治療抵抗性獲得機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of chemoresistance in ovarian cancer stem cells based on the pentose phosphate pathway.

研究代表者

山脇 芳（Yamawaki, Kaoru）

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：90650622

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：申請者らが新規確立した3次元培養系である、患者由来卵巣がんスフェロイド細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析により、グルコース-6-リン酸脱水素酵素（G6PD）が卵巣がんのプラチナ耐性に関与する分子であることを発見した。初回化学療法後にプラチナ抵抗性が生じた卵巣がん患者に対してプラチナ製剤とG6PD阻害剤を併用することにより、プラチナ製剤の効果を回復させることができる可能性を見出した。本研究で用いた解析手法を用いることで、他の薬剤での耐性機序に関与する分子を同定可能であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣がん患者の腹水より、3次元培養細胞である卵巣がんスフェロイド細胞を複数作成した。卵巣がんスフェロイド細胞の抗がん剤感受性の違いに着目した新しい解析手法により、プラチナ製剤の耐性機序に関与する分子として、グルコース-6-リン酸脱水素酵素（G6PD）とそれに関与する一群の酸化還元酵素を同定した。プラチナ製剤の一種である抗がん剤シスプラチンとG6PDの阻害剤を併用することで、プラチナ製剤への耐性を克服できることを細胞増殖実験およびマウス実験の結果より見出した。同様の手法を用いることにより、他の抗がん剤に対する耐性機序を発見することも可能と考えられた。

研究成果の概要（英文）：We identified of G6PD-mediated redox pathways as major regulators of chemoresistance through integrative analyses using a panel of patient-derived cells. Our approaches are effective for revealing the molecular basis of cancer chemoresistance, as systemic examination of gene signatures associated with chemoresistant cells enabled the identification of biological weakness that can be targeted by therapeutic agents. The same strategies will be applicable for diverse therapeutic agents, which will lead to elucidation of the molecular basis of chemoresistance.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣がん 3次元培養 プラチナ抵抗性 ペントースリン酸経路

## 1. 研究開始当初の背景

近年、がん組織を構成する細胞の多様性が種々の解析により明らかになり、がんの難治性・治療抵抗性の本質として、「がん幹細胞」の存在が証明されている。卵巣がんは寛解ののちに高率に再発をきたす難治性婦人科がんの一つであり、そのような臨床的ふるまいは卵巣がん幹細胞の存在を示唆している。申請者は、新規に開発した患者由来卵巣がん幹細胞の3次元スフェロイド細胞培養系を応用し、網羅的遺伝子発現解析と機能解析実験を併用することで、卵巣がん幹細胞の治療抵抗性獲得メカニズムの解明を目指し研究をすすめている。これまでの研究成果として、解糖系の分枝路であるペントースリン酸経路の活性化が、卵巣がん幹細胞のプラチナ抵抗性獲得に重要であることを明らかにしている。しかし、ペントースリン酸経路の活性化が、がん幹細胞のプラチナ抵抗性獲得につながるメカニズムは未だ明らかでない。本研究は、先行研究で明らかとなったペントースリン酸経路の活性化に着目し、独自の3次元スフェロイド培養系を用いて、卵巣がん幹細胞のプラチナ抵抗性獲得メカニズムを明らかにすることを目的とする。その成果により、難治性卵巣がんの新たな治療戦略の開発へ臨床的応用を目指す。

## 2. 研究の目的

これまでの研究成果から、卵巣がん幹細胞が有するプラチナ抵抗性にはペントースリン酸経路の関与が示唆されている。さらに、抵抗性を有する細胞は同経路の酵素であるG6PDの発現が上昇しており、律速酵素であるG6PDが重要であることが実験的に明らかになっている。本研究ではこの成果を元として、卵巣がん幹細胞のプラチナ抵抗性獲得メカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 卵巣がん組織別のスフェロイド細胞の新規樹立とプラチナ抵抗性の検証

上皮性卵巣がんには代表的な4つの組織型（漿液性、粘液性、類内膜、明細胞）があり、治療成績や臨床予後もそれぞれ異なっているため、4組織型ともに十分な数の卵巣がんスフェロイド細胞を樹立させる。次に、樹立したスフェロイド細胞のプラチナ製剤の感受性を *in vitro* で網羅的に解析し、プラチナ抵抗性細胞と感受性細胞の2群に層別化し、プラチナ製剤への抵抗性を特に有する細胞を同定する。同定した抵抗性を有する細胞において、ペントースリン酸経路関連酵素であるG6PDの発現の validation をリアルタイムPCR、ウェスタンブロット法を用いて行う。また、組織別の抗がん剤抵抗性（IC50値）の違い、G6PD発現との相関を検討する。

### (2) ペントースリン酸経路酵素阻害剤を用いたプラチナ抵抗性の機能的検証

G6PD阻害剤により、プラチナ抵抗性スフェロイド細胞のプラチナ抵抗性は抑制され、両者の協調的な阻害効果が認められるかを *in vitro* およびマウスPDXモデルで検討する。

### (3) 免疫組織学的染色による臨床統計学的解析

新潟大学産婦人科で手術を施行した卵巣がん症例の臨床病理組織スライドを用い、G6PDについての免疫組織学的染色を行い、染色結果と臨床情報（卵巣がん患者のプラチナ抵抗性の有無、臨床病期、病理組織分類、予後など）との相関を統計学的に解析し、治療効果予測因子や予後予測因子となりうるかの検討を行った。

#### 4. 研究成果

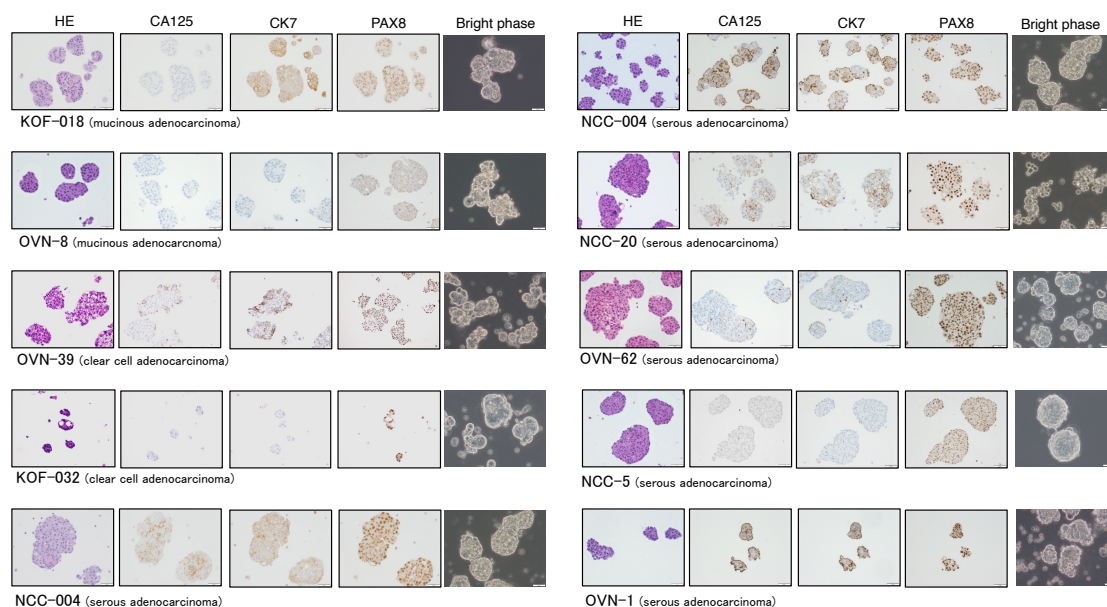
- (1) 卵巣がん患者腹水を用いて卵巣がんスフェロイド細胞の樹立をすすめ、安定培養が可能な10種類の卵巣がんスフェロイド細胞パネルを作成した（図1）。

#### 卵巣がん腹水由来の卵巣がんスフェロイド細胞の樹立

Sample ID	Patient Age	Source	Pathology	FIGO stage	NAC
NCC-4H	61	Ascites	Serous adenocarcinoma	III c	×
NCC-004	49	Ascites	Serous adenocarcinoma	III c	○
NCC-5	68	Ascites	Serous adenocarcinoma	III c	×
NCC-20	74	Tumor	Serous adenocarcinoma	III c	×
OVN-1	54	Ascites	Serous adenocarcinoma	III c	×
OVN-62	50	Ascites	Serous + Endometrioid	III c	×
KOF-32	64	Ascites	Clear cell adenocarcinoma	III c	×
OVN-39	49	Ascites	Clear cell adenocarcinoma	IC rec.	×
KOF-18	78	Ascites	Mucinous adenocarcinoma	IC3	×
OVN-8	42	Ascites	Mucinous adenocarcinoma	III c	×

安定培養が可能な10種類の患者由来卵巣がんスフェロイド細胞パネル

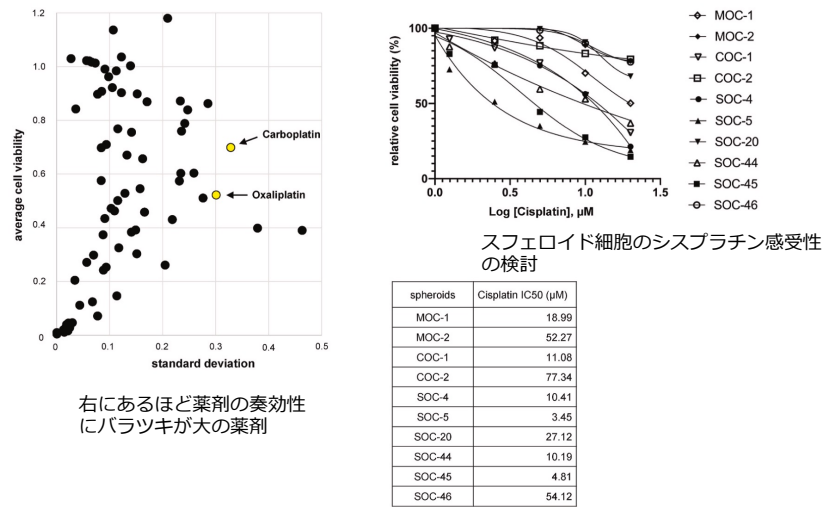
図1



- (2) 樹立した卵巣がんスフェロイド細胞を用い、多種類の抗がん剤に対する感受性試験を行った

ところ、プラチナ製剤への感受性が細胞によって異なることが明らかとなった (図2)。

## プラチナ製剤感受性はスフェロイド細胞間で大きく異なる



プラチナ製剤は症例間で奏効性が異なる

図2

そこで、プラチナ製剤に対して耐性が強い細胞群と耐性が弱い細胞群に分類し、それぞれの群の遺伝子の発現を比較検討したところ、プラチナ製剤に耐性がある細胞群では、ペントースリン酸経路の律速酵素であるグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) と、それに関与する一群の酸化還元酵素の発現が高く、それらの分子がプラチナ製剤への耐性機序に関与していることが示唆された。(図3)

## シスプラチン抵抗性細胞におけるPPP酵素の発現亢進

### シスプラチン抵抗性とPPP酵素発現の相関

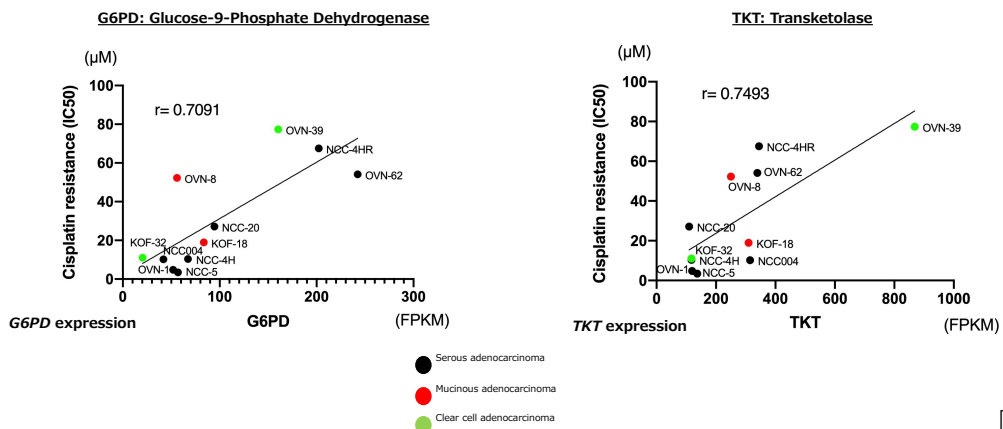


図3

(3) スフェロイド細胞の増殖抑制実験や腹膜播種モデルを用いたマウス実験において、G6PDの阻害剤とプラチナ製剤の一種である抗がん剤シスプラチンを併用投与することで、スフェロイド細胞のもつプラチナ製剤への耐性が解除されることを見出した (図4)。

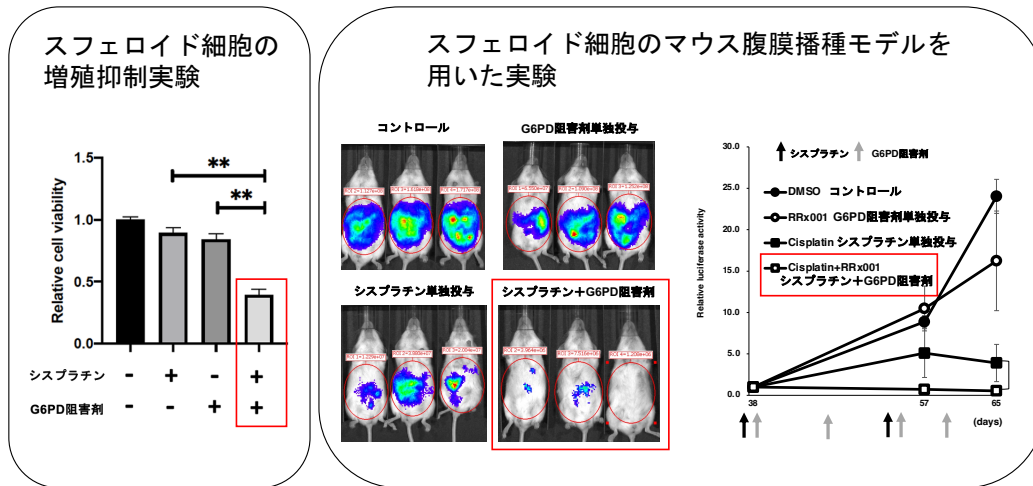
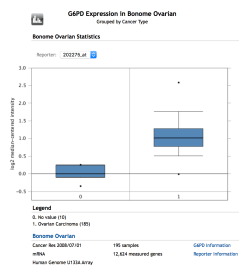


図4 シスプラチンとG6PD阻害剤を併用することにより、シスプラチンに対して耐性をもつ卵巣がんスフェロイド細胞の増殖を抑制した

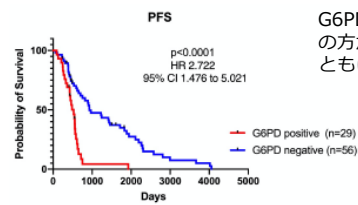
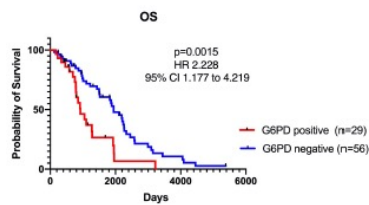
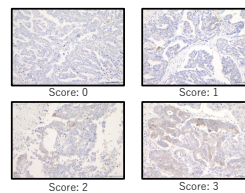
(4) 過去に新潟大学医歯学総合病院で手術を受けた卵巣がん患者のがん組織中の G6PD の発現を確認したところ、G6PD の発現の強さと患者の予後（無増悪生存期間、全生存期間）に逆相関がみられた。（図 5）

### 卵巣がんにおけるG6PD発現は臨床予後と相関がある

OncoPrintデータベース  
卵巣癌でG6PDはよく発現している



進行期卵巣がん症例に対する  
G6PD免疫染色 (n=85)



G6PD陽性群の方がOS、PFSとも不良

図5

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Murayama Takahiko, Takeuchi Yasuto, Yamawaki Kaoru, ..., Enomoto Takayuki, Tanabe Masahiko, Tada Kei, ichiro, Kanemaki Masato T., Okamoto Koji, Tojo Arinobu, Gotoh Noriko	4. 巻 112
2. 論文標題 MCM10 compensates for Myc induced DNA replication stress in breast cancer stem like cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1209 ~ 1224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14776	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 -

1. 著者名 Yamawaki Kaoru, Mori Yutaro, Sakai Hiroaki, Kanda Yusuke, Shiokawa Daisuke, Ueda Haruka, Ishiguro Tatsuya, Yoshihara Kosuke, Nagasaka Kazunori, Onda Takashi, Kato Tomoyasu, Kondo Tadashi, Enomoto Takayuki, Okamoto Koji	4. 巻 521
2. 論文標題 Integrative analyses of gene expression and chemosensitivity of patient-derived ovarian cancer spheroids link G6PD-driven redox metabolism to cisplatin chemoresistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 29 ~ 38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2021.08.018	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0件

〔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
---------	---------