

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390308

研究課題名(和文) 新たな視点での卵巣がん薬剤耐性化の解明：メタボロミクスの応用とオートファジー解析

研究課題名(英文) The identification of drug resistance in ovarian cancer : new insights form metabolomics and autophagy

研究代表者

倉智 博久 (KURACHI, HIROHISA)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：40153366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：新規抗癌剤Trabectedinが既存の抗癌剤に耐性を示す卵巣明細胞腺癌におけるKey drugであり、これを用いた二剤併用化学療法が卵巣明細胞腺癌に対する有望な化学療法レジメンである事を見出した。現在、Trabectedin併用化学療法の抗腫瘍効果とAutophagyの関係について検討を行っている。さらに我々はWilms' tumor 1 (WT1)遺伝子の発現と臨床的特性および予後との関連を検討し、WT1 mRNAの発現量が高いと悪性度が増し、さらに無病生存期間が短縮することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We identified that the anti-tumor activity of trabectedin was greater than any other existing anti-cancer agents, indicating that trabectedin is a promising agent for ovarian clear cell carcinoma (CCC). We also identified that combination treatment with trabectedin and irinotecan or topotecan displays the greatest cytotoxic effect against ovarian CCC. We believe that our studies provide the rationale for future clinical trials of trabectedin-based combination chemotherapies in patients with ovarian CCC. We are currently investigating the role of autophagy in the sensitivity of CCC cells to trabectedin-based combination chemotherapies. We also identified that high levels of WT1 expression correlated with aggressive clinical features in ovarian cancer. The median disease-free survival time in patients with high WT1 expression levels was significantly shorter ($p=0.038$) than that in patients with low WT1 expression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：卵巣がん 薬剤耐性化 Rho/ROCK経路 EGF受容体 Trabectedin 八二カム膜 mTOR メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

(1) プラチナ/タキサン耐性の卵巣がん症例の治療は困難である。これを克服するためにも、血管新生 (Folkman J. 1971; Martin L. 2007)などを標的とする分子標的治療が試みられているが、現在、その治療効果は低く、新しい治療法の開発が求められている。

(2) がん細胞は著しい低酸素・低栄養下でも生き残り、増殖することが特徴であり、この機構を標的とするがん治療が注目されている (Edinger AL. 2003)。低酸素下では、血管新生がおこるとともに、がん細胞内のエネルギー代謝特性を低酸素に適応できるように変化させ、がん細胞が生き残る機構が想定されている (Izuishi K. 2000)。薬剤感受性・耐性の卵巣がんの間での代謝特性の相違を、メタボロミクスで網羅的に解析することは、薬剤耐性化に関与する分子を特定することにつながると期待される (Review by Spratlin JL. 2009)。さらに、低栄養は、一時的にはがん細胞の増殖を抑制するが、一方で、オートファジ - を促進し、がん細胞の生き残りを助長する (Mathew R. 2007; Cuervo AM. 2004)。この機構で薬剤耐性化に関与する分子を特定することも、新たな治療法の開発に有用であると期待される。

2. 研究の目的

(1) 卵巣明細胞腺癌に対しては有効な化学療法レジメンが存在しない。そこで我々は、まず卵巣明細胞腺癌に対する有効な化学療法を開発することを目的とし、明細胞腺癌に対する有効な抗癌剤を見出し、この抗癌剤を基軸とした2剤併用化学療法を見出すべく In vitro および In vivo の研究を行う。本研究では、卵巣明細胞腺癌に対する有効な抗癌剤の候補として、DNA 結合型新規抗癌剤である Trabectedin に着目する。

(2) 上述の研究によって見出された抗癌剤および二剤併用化学療法に対する耐性化のメカニズムの解明とその克服を目的とし、Autophagy に着目した研究を行う。具体的には、研究によって見出された抗癌剤が Survival promoting autophagy を誘導するか? Autophagy を抑制するとことで抗癌剤の効果が増強されるか? について検討を行う。

(3) 転写因子である Wilms' tumor 1 (WT1) 遺伝子は卵巣癌、特に高悪性型漿液性腺癌で高頻度に発現しており、卵巣癌の悪性度と関連していると報告されている (Köbel M. PLoS Med 2008)。しかしながら WT1 の発現と予後に関しては未だ結論付けられていない。またこれらの報告は WT1 の発現を免疫組織染色で検討したものがほとんどである。そこで我々は、卵巣癌における WT1 mRNA の発現と臨床的特性および予後との関連を検討し、さらに

Autophagy の意義に関する検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 薬剤: Trabectedin は DNA 結合型の新規抗癌剤であり、Sarcoma に対する臨床試験が進行中である。Trabectedin は細胞周期が G1 期にある細胞に対して最も強い抗腫瘍効果を示すことが報告されており、G1 期の割合が高い明細胞腺癌に対する有効性が期待できると考えた。そこで開発元である PharmaMar 社 (スペイン) から研究目的での薬剤の提供を受け、これを使用した。また、既存の抗癌剤として、明細胞腺癌に対して臨床的に使用されている

Cisplatin/Paclitaxel/SN-38/Doxorubicin (SN-38 は Irinotecan の Active metabolite) を購入し、使用した。

(2) 細胞株: 4 種類の卵巣明細胞腺癌細胞株 (RMG1/RMG2/HAC2/KOC7C) および 4 種類の卵巣漿液性腺癌細胞株

(SKOV3/CAOV3/A2780/HayA8) を使用。

(3) Trabectedin の抗腫瘍効果の評価: 単剤での抗腫瘍効果は MTS assay およびヌードマウスの皮下移植モデルを用いて検討。Trabectedin と他の抗癌剤との併用効果については、各種の組み合わせの抗腫瘍効果を MTS assay にて検討し、その結果をもとに Isobologram を作成し、Combination index を算出して検討。

(4) Trabectedin-based chemotherapies の感受性と Autophagy の関係: Trabectedin が Survival promoting autophagy を誘導するかについては、Autophagy の誘導を LC3B-II の発現を指標とした検討を行い、さらに、Autophagy の誘導に必要な Beclin 1 および AGT5 を siRNA によって抑制することで Trabectedin の抗腫瘍効果が増強されるか? を検討した。

(5) WT1 mRNA の発現と臨床的特性および予後との関連: 検体採取の同意を得られた卵巣癌患者 63 名における WT1 mRNA の発現量を real-time PCR 法で算出し、臨床的特性 (進行期、リンパ節・大網転移の有無、腹水の有無) および予後 (無病生存期間、生存期間) との関連について統計ソフト EZR を用いて検討した (倫理委員会承認済)。

4. 研究成果

(1) Trabectedin は明細胞腺癌に対して特に強い抗腫瘍効果を示す (図 1)。

Trabectedin の抗腫瘍効果を組織型別に比較した実験結果を行ったところ、Trabectedin は明細胞腺癌に対してより強い抗腫瘍効果を示す (同濃度での殺細胞効果が高い) ことが明らかとなった。

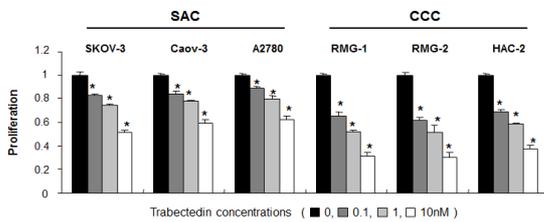


図 1. Trabectedin の抗腫瘍効果の組織型別の比較 (明細胞腺癌 CCC vs 漿液性腺癌 SAC)

(2) Trabectedin は明細胞腺癌に対し、既存の抗癌剤の中で最も強い抗腫瘍効果を示す (図 2)。

Trabectedin の抗腫瘍効果を、他の薬剤 (明細胞腺癌に対して臨床的に使用されている Cisplatin, Paclitaxel, SN-38) と比較したところ、Trabectedin の抗腫瘍効果は他の薬剤と比べて有意に高く、卵巣明細胞腺癌に対する Key drug となることを見出した。

In vitro activity of existing anti-cancer agents

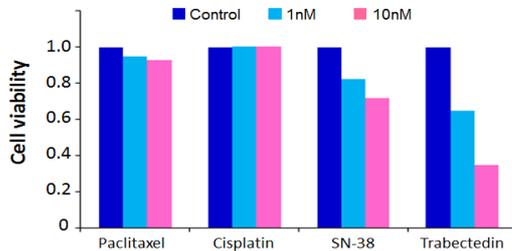


図 2. Trabectedin と他の抗癌剤の抗腫瘍効果の比較

(3) Trabectedin はプラチナ耐性・パクリタキセル耐性明細胞腺癌に対しても、強い抗腫瘍効果を示す (図 3)。

卵巣明細胞腺癌細胞株 RMG1 および RMG2 から持続暴露法によって Cisplatin 耐性株 (RMG1-CR および RMG2-CR) および Paclitaxel 耐性株 (RMG1-PR および RMG2-PR) を樹立。これらの細胞に対する Trabectedin の抗腫瘍効果を MTS assay で比較検討した。

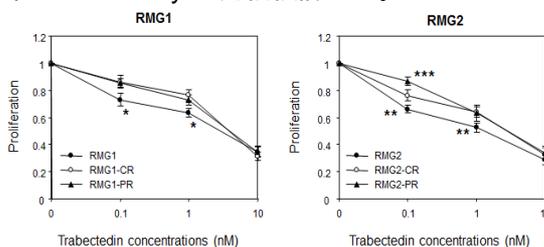


図 3. シスプラチン・パクリタキセル耐性明細胞腺癌に対する Trabectedin の抗腫瘍効果

(4) Trabectedin+Irinotecan または Trabectedin+Topotecan は明細胞腺癌に対する最も有望な化学療法レジメンである (図 4)。

Trabectedin と Irinotecan もしくは

Topotecan と併用した場合に非常に強い相乗効果が観察された。その他の薬剤と Trabectedin を併用した場合にはそのような相乗効果は観察されず、Trabectedin + Irinotecan または Trabectedin + Topotecan が明細胞腺癌に対して最も有望な治療レジメンと考えられた。

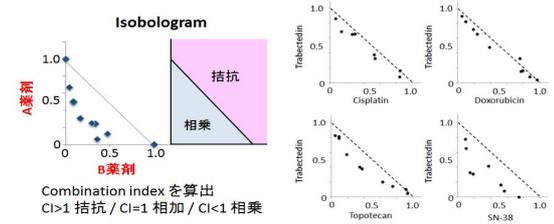


図 4. Trabectedin と他の抗癌剤との併用効果の検討

(5) Trabectedin-based chemotherapies の抗腫瘍効果と Autophagy の関係

これまでに、Irinotecan および Topotecan が癌細胞において Survival promoting autophagy を誘導し、Autophagy を抑制することで抗腫瘍効果が高まることが報告されている。我々は現在、Trabectedin が Survival promoting autophagy を誘導するか？ また Autophagy の誘導に必要な Beclin 1 および AGT5 を siRNA によって抑制することで Trabectedin の抗腫瘍効果が増強されるか？ について検討を行っている段階である。現時点では結論は出ておらず、さらなる検討が必要である。

(6) WT1 mRNA の発現と臨床的特性との関連
WT1 mRNA の発現量は進行期の進んだ患者で高く、期と期では WT1 mRNA の発現量に有意差を認めた (図 5)。

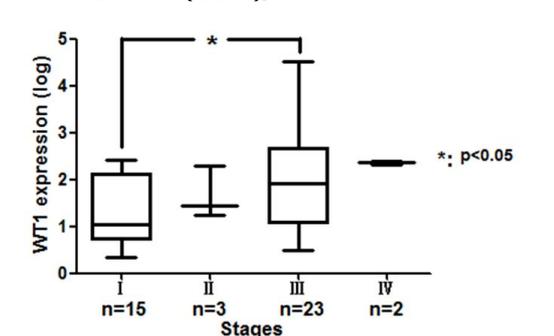


図 5. WT1 の発現と進行期

さらに WT1 mRNA の発現量は、リンパ節転移陽性 (図 6) 大網転移陽性 (図 7) 腹水陽性 (図 8) 患者でそれぞれが陰性の患者に比較して高値であった。

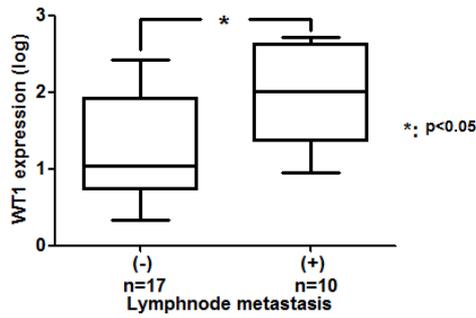


図 6. WT1 の発現とリンパ節転移の有無

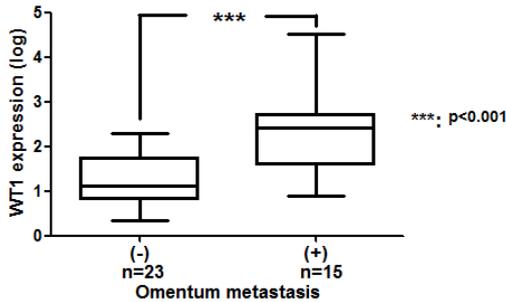


図 7. WT1 の発現と大網転移の有無

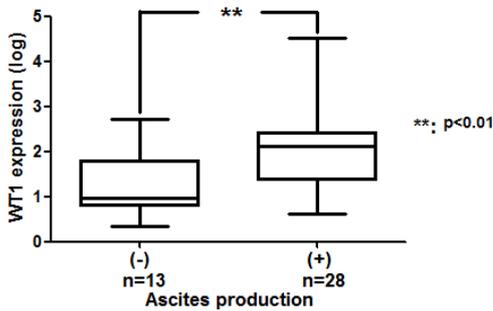


図 8. WT1 の発現と腹水の有無

(7) WT1 mRNA の発現と予後との関連
再発の有無と WT1 の発現量を検討したところ、再発患者で WT1 の発現量が高いものの、有意差は認めなかった (図 9)。

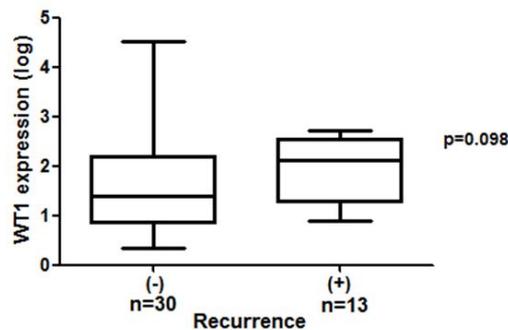


図 9. 再発の有無と WT1 の発現

さらに WT1 mRNA の発現量 (copy number) の中央値 53.94 で WT1 の発現量が高い群 (High) と低い群 (Low) に振り分け、無病生存期間 (DFS: disease free survival) と生存期間

(OS: overall survival) を Kaplan-Meier 法で算出し、log-rank test を行ったところ、WT1 の発現が高い群で PFS の短縮を認めた (図 10)。しかしながら、OS に関しては WT1 の発現量の違いにより、有意差は認めなかった (図 11)。

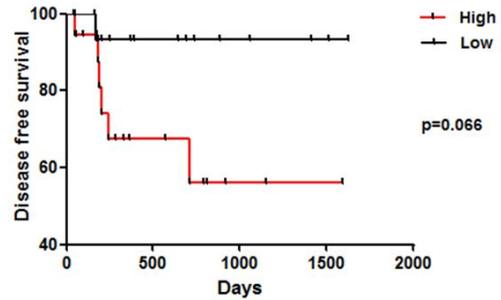


図 10. WT1 の発現と DFS

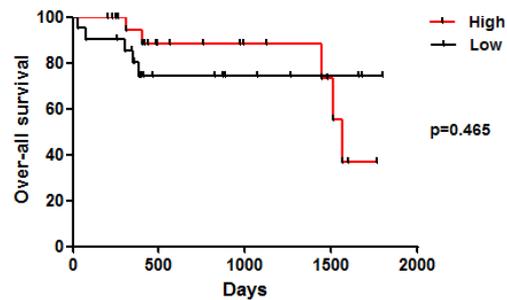


図 11. WT1 の発現と OS

上記の結果から WT1 mRNA の発現が高いと卵巣癌の悪性度が高くなることが明らかとなった。臨床検体におけるオートファジー関連遺伝子 (Atg) 産物である、Atg12-Atg5 複合体および LC3 の発現と WT1 の発現との関連については今後検討していく予定である。

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 33 件)

Yokoyama Y, Kurachi H. (他 13 名、11 番目) Redistribution of resistance and sensitivity to platinum during the observation period following treatment of epithelial ovarian cancer. *Mol clin oncol.* 2014;2:212-218

査読有 DOI: 10.3892/mco.2013.223

Ohyagi-Hara C, Sawada K, Mabuchi S, Takahashi T, Kurachi H. (他 12 名、15 番目) miR-92a inhibits peritoneal dissemination of ovarian cancer cells by inhibiting integrin 5 expression. *Am J Pathol* 2013;182(5):1876-1889 査読有

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.039>

Kato N, Hayasaka T, Takeda J, Osakabe

M, Kurachi H. (他3名、5番目) Ovarian tumors with functioning stroma: a clinicopathologic study with special reference to serum estrogen level, stromal morphology, and aromatase expression. *Int J Gynecol Pathol* 2013;32(6):556-561. 査読有
DOI:10.1097/PGP.0b013e31827c6362.

Matsumura S, Ohta T, Takahashi T, T Kurachi H. (他2名、6番目) Non-sex cord-stromal ovarian tumors frequently produce and secrete estrogen in postmenopausal women: impact on bone metabolism and abnormal endometrial histology. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(7):2775-2782 査読有
DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2013-1267>

Yokoyama Y, Kurachi H. (他12名、10番目) Investigation of the clinicopathological features of fallopian tube malignancy. *Oncol Rep* 2013;30:79-84 査読有
DOI: 10.3892/or.2013.2439. Epub 2013 Apr 30.

Ohta T, Takahashi T, Kurachi H. (他8名、9番目) Inhibition of the Rho/ROCK pathway enhances the efficacy of cisplatin through the blockage of hypoxia-inducible factor-1 in human ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2012;13(7):1-9. 査読有
DOI: 10.4161/cbt.13.1.18440.

Ohta T, Takahashi T, Kurachi H. (他4名、7番目) Gefitinib (ZD1839) increases the efficacy of cisplatin in ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2012;13(6):408-416. 査読有
DOI: 10.4161/cbt.19292. Epub 2012 Apr 1.

Yamamoto S, Kurachi H. (他10名、8番目) Histological grading of ovarian clear cell adenocarcinoma: proposal for a simple and reproducible grouping system based on tumor growth architecture. *Int J Gynecol Pathol* 2012;31(2):116-124. 査読有
DOI: 10.1097/PGP.0b013e3182285c90.

Shoji T, Kurachi H. (他13名、13番目) Phase clinical study of the combination chemotherapy regimen of irinotecan plus oral etoposide for the treatment of recurrent ovarian cancer. (Tohoku Gynecologic Cancer Unit 101 Group Study). *Int J Gynecol Cancer* 2011;21(1):44-50. 査読有

DOI: 10.1097/IGC.0b013e3181ffbe9f.

Yamamoto S, Kurachi H. (他11名、9番目) Validation of the histologic grading for ovarian clear cell adenocarcinoma: a retrospective multi-institutional study by the Japan clear cell carcinoma study group. *Int J Gynecol Pathol* 2011;30(2):129-138. 査読有
DOI: 10.1097/PGP.0b013e3181f71264.

Kojimahara T, Kurachi H. (他11名、13番目) Identifying prognostic factors in Japanese women with pseudomyxoma peritonei: a retrospective clinico-pathological study of the Tohoku Gynecologic Cancer Unit. *Tohoku J Exp Med* 2011;223(2):91-96. 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/223/2/223_2_91/_pdf

Yamamoto S, Kurachi H. (他9名、8番目) Clear cell adenocarcinoma with a component of poorly differentiated histology: a poor prognostic subgroup of ovarian clear cell adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2011;30(5):431-441. 査読有
DOI: 10.1097/PGP.0b013e3182165eba.

Mabuchi S, Sawada K, Takahashi T, Kurachi H. (他6名、9番目) The activity of trabectedin as a single agent or in combination with everolimus for clear cell carcinoma of the ovary. *Clin Cancer Res* 2011;17(13):4462-4473 査読有
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2987

Amita M, Takahashi T, Ohta T, Takata K, Kurachi H. (他5名、10番目) Molecular mechanism of the inhibition of estradiol-induced endometrial epithelial cell proliferation by clomiphene citrate. *Endocrinology* 2010;151(1):394-405. 査読有
DOI: 10.1210/en.2009-0721.

Karube Y, Kurachi H. (他8名、8番目) Histopathological prognostic factors predicting para-aortic lymph node metastasis in patients with endometrioid uterine cancer. *Gynecol Oncol* 2010;118(2):151-154 査読有
DOI: 10.1016/j.ygyno.2010.05.004.

[学会発表](計30件)

小島原敬信、高橋俊文、松尾幸城、松村創平、小幡美由紀、松川淳、倉智博久。
2年前の膀胱癌由来と思われる腹膜偽粘液腫の1例。第65回日本産科婦人科

学会 札幌市教育文化会館（札幌市）
2013.5.10-12.

横山良仁、倉智博久（他 13 名、11 番目）
卵管悪性腫瘍の臨床的解析 東北婦人科
腫瘍研究会後方視的検討. 第 50 回日本
癌治療学会 パシフィコ横浜（横浜市）
2012.10.25-27.

島田宗昭、倉智博久（他 26 名、13 番目）
再発卵巣癌に対するリポソーマルドキ
ソルピシン単剤療法における手足症候
群および口内炎予防のためのサポー
ティブケアに関する多施設共同研究. 第
63 回日本産科婦人科学会 大阪国際会議
場、リーガロイヤルホテル大阪（大阪市）
2011.8.29-31.

網田光善、高橋俊文、原周一郎、五十嵐
秀樹、倉智博久. GFP 結合 ER を用いた
子宮内膜細胞におけるエストロゲン、抗
エストロゲン作用の可視化. 第 62 回日
本産科婦人科学会 東京国際フォーラム
（東京都）2010.4.23-25.

清野 学、太田剛、高橋俊文、逸見典子、
須藤毅、本山梯一、倉智博久. 化学療法
後の卵巣癌再発巣における Akt と ERK の
活性化は予後良好因子である. 第 62 回
日本産科婦人科学会 東京国際フォー
ラム（東京都）2010.4.23-25.

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.id.yamagata-u.ac.jp/ObGyn/in
dex.html](http://www.id.yamagata-u.ac.jp/ObGyn/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉智 博久 (KURACHI Hirohisa)
山形大学・医学部・教授
研究者番号：40153366

(2) 研究分担者

高橋 俊文 (TAKAHASHI Toshifumi)
山形大学・医学部・講師
研究者番号：20302292

太田 剛 (OHTA Tsuyoshi)
山形大学・医学部・助教
研究者番号：50375341

高田 恵子 (TAKATA Keiko)
山形大学・医学部・助教
研究者番号：70375343
(平成 22 年度)

須藤 毅 (SUTOH, Takeshi)
山形大学・医学部・助教
研究者番号：70466605

馬淵 誠士 (MABUCHI Seiji)
大阪大学・医学部・助教
研究者番号：00452441

澤田 健二郎 (SAWADA Kenjiro)
大阪大学・医学部・講師
研究者番号：00452392