

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591850

研究課題名（和文） 卵巣癌に対する S100A4 を標的とした新しい治療薬の開発

研究課題名（英文） The analysis of novel molecular targeted therapy inhibiting S100A4 for ovarian cancer

研究代表者

堀内 晶子（HORIUCHI AKIKO）

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：80334895

研究成果の概要（和文）：

卵巣癌における S100A4 発現亢進は、S100A4 遺伝子の promoter から intron 領域の -4 から +248 領域に存在する Hypoxia Response Element が重要であり、低酸素環境が S100A4 発現亢進に影響していると考えられる。次に 10000 種化合物を含む化合物ライブラリーを用い、S100A4 遺伝子の転写抑制作用が強い化合物を見出すスクリーニングを行い、これまでに 6 種の化合物が有意に S100A4 転写活性を抑制することを見出した。これらは新たな分子標的薬の候補化合物と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We revealed that the Hypoxia Response Element(HRE) existing in -4 to +248 on the region from promoter to intron in S100A4 gene was important for its over-expression in ovarian carcinoma cells. Thus, low oxygen environment was considered to up-regulate the expression of S100A4. Next, we performed the screening of compounds suppressing the transcription of S100A4 gene using compounds library containing 10,000 kinds of compound. We found 6 kinds of compound significantly suppressing the transcription of its gene. These were regarded as a candidate compound for novel molecular targeted therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：婦人科腫瘍学

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：卵巣癌、分子標的薬、S100A4

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は女性性器に発生する悪性腫瘍のうちで最も予後不良の疾患である。卵巣癌患者における最大の予後不良因子は腹腔内播種性転移であり、患者の予後向上にはまず卵巣

癌細胞の播種性転移機序を解明し、これを抑制する新たな物質の探索が求められる。最近、癌細胞の増殖、生存、浸潤、転移にはその微小環境 microenvironment が大きな影響を及ぼすことが知られ、我々はこれまで微小環境

の観点からアプローチしてきた。卵巣癌播種性転移は癌細胞の原発巣からの離脱、酸素供給を欠いた状態での生存、腹膜への接着・浸潤・増殖・血管新生という過程からなることから、特に低酸素環境に注目した。実際、卵巣癌細胞を低酸素環境で培養すると HIF-1 α 、VEGF 発現を増強し (Horiuchi, et al: Anticancer Res, 2002)、低分子量 GTP 結合蛋白質 RhoA を介して (Horiuchi, et al: Lab Invest, 2003) 転移能が亢進することを明らかにしてきた。また、低酸素環境は転写抑制因子 SNAIL を介して細胞接着因子 E-cadherin 発現を抑制し、浸潤能を亢進させることを初めて見出した (Imai, Horiuchi, et al: Am J Pathol, 2003)。これらの一連の研究の中から、低酸素環境下で発現が増強し、卵巣癌細胞の浸潤・転移を促進するシグナル伝達物質として S100A4 を見出した (日本産婦人化学会総会シンポジウム：腫瘍：2008)。S100A4 はカルシウム結合蛋白である S100 蛋白ファミリーに属し、細胞骨格蛋白や細胞接着因子と結合し細胞運動に関与している。我々は上皮性卵巣腫瘍における S100A4 の発現を免疫組織学的に検討したところ、良性、境界悪性腫瘍に比べ卵巣癌では有意に発現が増強していた。さらに、S100A4 の発現は、病期および組織分化度とともに増強しており、臨床進行期と並んで独立した予後不良因子であることを見出した (Kikuchi, Horiuchi, et al: Cancer Sci, 2006)。また、in vitro での検討では、S100A4 強発現細胞では invasion assay およびヌードマウスのモデルで播種性転移能が高く、S100A4 低発現卵巣癌細胞株に対して S100A4 発現を増強すると RhoA の活性が亢進し浸潤能も亢進した。これまでの種々の検討から S100A4 発現は卵巣癌播種性転移にきわめて重要なシグナルを司ることが判明しており、S100A4 を抑制する治療法を開発する必要があると考えた。S100A4 発現の亢進は、乳癌、大腸癌、肺癌、甲状腺癌、前立腺癌、膵癌などの多くのヒト悪性腫瘍においても報告されているが、その発現制御機構は明らかにされていなかった。S100A4 の発現はプロモーター内の ErbB2 response element と、S100A4 遺伝子の第一のイントロン領域からコントロールされている可能性が示されているが、その詳細は不明である。そこでまず、卵巣癌における S100A4 発現亢進の機序を検討することとした。最近、膵臓癌において S100A4 蛋白発現と S100A4 遺伝子の第一イントロンの CpG サイトの脱メチル化が関連することが報告されたため (Rosty C et al. American J Pathol 2003, Sato N et al. Cancer Res 2003)、卵巣癌における S100A4 発現とエピジェネティックな制御機構との関連を解析した。その結果、卵巣癌細胞において S100A4

発現は S100A4 遺伝子の第 1 イントロンの 3 箇所の CpG のメチル化の有無が関与していた (日本産婦人科学会総会シンポジウム：腫瘍：2008)。さらに、S100A4 低発現卵巣癌細胞株に脱メチル化剤 (5Aza-dC) および脱アセチル化阻害剤 (TSA) を添加し、S100A4 発現の変化を検討したところ、S100A4 低発現細胞株に 5Aza-dC 添加すると、S100A4 発現が回復した。

つまり、S100A4 遺伝子の第一イントロン領域が S100A4 発現に重要であり、特に CpG サイトの脱メチル化というエピジェネティックな制御機構が関与していると考えられる。さらに、我々は低酸素環境下において卵巣癌細胞は S100A4 蛋白発現を亢進させその発現は核に移行し、同時に細胞の浸潤能が亢進することも見出し (菊地、堀内 et al. 日本癌学会総会、口演 2006)、さらに低酸素環境がエピジェネティックな制御機構にも影響を与えている可能性を報告している (日本産婦人科学会総会シンポジウム：腫瘍：2008)。本研究では、卵巣癌細胞において低酸素環境がエピジェネティックに遺伝子発現に影響を与えるか否かも検討し、S100A4 を標的とした新たな分子標的治療を確立させるための基礎研究を行う。

2. 研究の目的

①卵巣癌細胞における S100A4 発現増強および核内移行機序の解明：卵巣癌において S100A4 核発現が予後不良因子であることから (Kikuchi, Horiuchi, et al: Cancer Sci, 2006)、癌細胞の置かれた微小環境との関連で S100A4 発現や核内移行機序の解析をおこなう。

②S100A4 発現抑制物質の探索：S100A4 を標的とした分子療法確立のためには、S100A4 に対する阻害剤が必要であるが、現在、S100A4 特異的阻害剤は報告されていない。本研究では S100A4 阻害剤開発を目的として、S100A4 転写抑制物質の探索をハイスループットスクリーニング (High throughput screening) 法にて試みる。ハイスループットスクリーニング法は、膨大な種類の化合物から構成される化合物ライブラリーの中から、創薬ターゲットに対して活性を持つ化合物を選別する技術で、新たな分子標的薬の開発には必須の手法といえる。ハイスループットスクリーニングにより、大量の化合物の中から、短時間で目的とするターゲット分子に親和性を有する化合物の探索を行えるため、現在では、多くの製薬企業で採用されている。今回我々は、約 1 万種類のコンパウンド (未精製薬剤) のストックから、

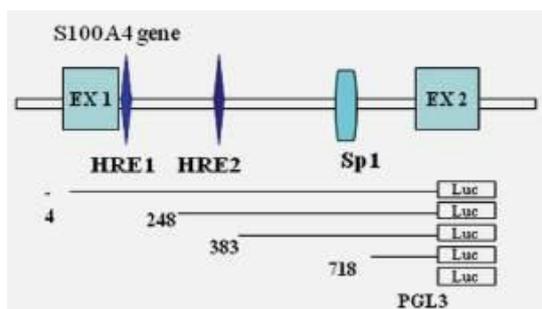
S100A4 遺伝子プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイにより S100A4 発現抑制活性のある薬剤のスクリーニングを行う。

③新規に同定した化合物の機能解析と臨床応用に向けた検討：この化合物の抗腫瘍能と抗癌剤感受性に対する作用および毒性を *in vitro* およびマウスを用いた実験系にて包括的に検討し、卵巣癌治療薬としての臨床応用の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 卵巣癌細胞における S100A4 発現増強機序の解明：S100A4 発現は低酸素環境下で増強し、卵巣癌細胞の浸潤・転移を促進する（日本産婦人化学会総会シンポジウム：腫瘍：2008）。そこで、低酸素環境における卵巣癌細胞の浸潤能亢進機序と同時に S100A4 発現増強機序を解析する。

①ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ：S100A4 遺伝子の promoter および第一イントロンを含む様々なコンストラクトを作成し PGL4 vector に組み込み、卵巣癌細胞における低酸素下での転写活性をレポーターアッセイで検討する。また、siRNA にて HIF-1 α および HIF-2 α を抑制し、低酸素での S100A4 発現変化を比較する。



(図1：ルシフェラーゼアッセイ・コンストラクト；Int J Cancer. 2012)

②CHIP assay：S100A4 の promoter～第一イントロンに存在する2個の Hypoxia Response Element (HRE) (HRE1, HRE2) が存在するため、HIF-1 α との結合を CHIP assay にて検討する。

(2) S100A4 発現抑制物質の探索：

①A2780-LS100 樹立：S100A4 プロモーター下に Luciferase を発現するレポータープラスミド pGL4/Neo/S100A4 を作成して、S100A4 強発現卵巣がん細胞株 A2780 に遺伝子導入し、安定発現クローン A2780-LS100 を樹立する。

②化合物ライブラリーによる 1st スクリーニング (ルシフェラーゼ・アッセイ)：A2780-LS100 を 96-well マルチプレート中で 24 時間培養後、各ウェルにスクリーニング薬剤を添加し 18 時間後にルシフェラーゼアッセイを施行する。スクリーニング薬剤は

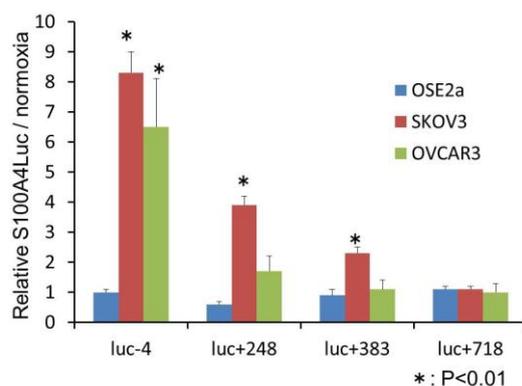
10000 種化合物を含む化合物ライブラリー (DIVERSet, Chembridge 社) を使い、初期スクリーニングは終濃度 10⁻⁵M で行い、コントロールを添加した細胞と比較し、有意な転写活性抑制作用を示す化合物に対しより低濃度 (10⁻⁶M) で追加スクリーニングを行う。

③追加スクリーニング：追加スクリーニングにて S100A4 転写抑制作用が最も強い化合物を選択する。選択された化合物を細胞に添加して、S100A4 発現抑制効果を確認するため、mRNA 発現をリアルタイム PCR にて検討する。また、遊走能に対する影響を wound healing assay で検討する。

4. 研究成果

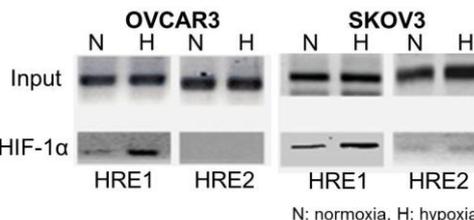
(1) 卵巣癌細胞における S100A4 発現増強機序の解明

① (ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ)：卵巣癌細胞 SKOV3 および OVCAR3 では、特に luc-4 で著明に発現が強く、luc+248 では減弱することから、この-4 から+248 の領域が S100A4 転写増強に特に重要であると考えられる。実際に、この領域には2つの HRE のうち、HRE1 が存在する。



(図2：ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ結果；Int J Cancer. 2012 より改変)

②CHIP assay：卵巣癌細胞株 OVCAR3、SKOV3 を用いて、HRE1、HRE2 と HIF-1 α との結合を CHIP assay で観察すると、予想通り、特に低酸素環境下で HRE1 と HIF-1 α は強く結合する事が証明された。

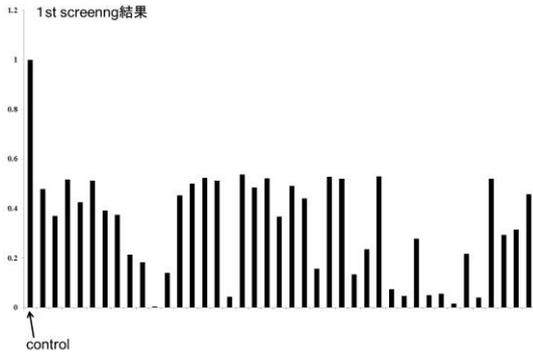


(図3：CHIP assay 結果；Int J Cancer. 2012 より改変)

(2) S100A4 発現抑制物質の探索

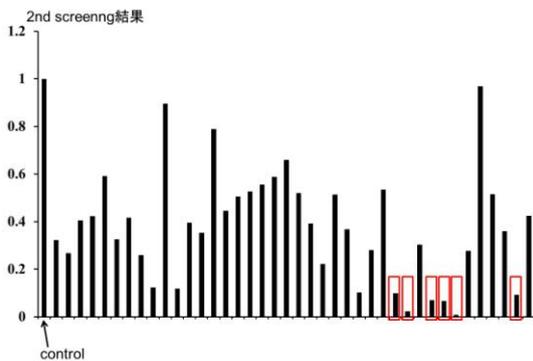
①1st スクリーニング：10,000 種類の化合物

ライブラリーから、control と比較して 50% 以上 S100A4 転写活性が低下する化合物が 40 種類見出された。



(図 4 : 1st screening 結果)

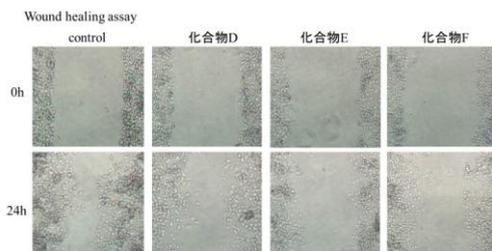
②2nd スクリーニング: 上記①で選抜された 40 種類の化合物について、さらにアッセイを 3 回繰り返し、control と比較して S100A4 転写活性が 10% 以下まで低下する薬剤 6 種類を選択した。これらを化合物 A~F とした。Real-time RT-PCR では、化合物 C, E, F が 25% 以下まで S100A4 転写を抑制した。



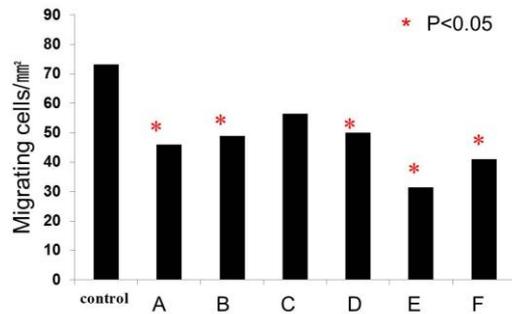
(図 5 : 2nd screening 結果)

また 5 種の化合物は有意に細胞の遊走能を抑制し、特に化合物 E でその効果が強かった。(図 6 a, b)

これらの化合物は、S100A4 を標的とした新たな分子標的治療の候補薬剤と考えられる。



(図 6 a: wound healing assay 写真)



(図 6 b: Wound healing assay 結果)

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 7 件)

1. Horiuchi A, Hayashi T, Kikuchi N, Hayashi A, Fuseya C, Shiozawa T, Konishi I. Hypoxia upregulates ovarian cancer invasiveness via the binding of HIF-1 α to a hypoxia-induced, methylation-free hypoxia response element of S100A4 gene. *Int J Cancer*. 2012; 131: 1755-67. (査読あり)
2. Mitsuhashi Y, Horiuchi A, Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A, Shiozawa T. Prognostic significance of Notch signalling molecules and their involvement in the invasiveness of endometrial carcinoma cells. *Histopathology*. 2012; 60: 826-37. (査読あり)
3. Fuseya C, Horiuchi A, Hayashi A, Suzuki A, Miyamoto T, Hayashi T, Shiozawa T. Involvement of pelvic inflammation-related mismatch repair abnormalities and microsatellite instability in the malignant transformation of ovarian endometriosis. *Hum Pathol*. 2012; 43: 1964-72. (査読あり)
4. 堀内晶子、塩沢丹里: 卵巣癌発生の自然史リスク因子. *日本臨床 2012 年増刊 婦人科がん—最近の研究動向*; 465-8. (査読なし)
5. Hayashi A, Horiuchi A, Kikuchi N, Hayashi T, Fuseya C, Suzuki A, Konishi I, Shiozawa T. Type-specific roles of histone deacetylase (HDAC) overexpression in ovarian carcinoma: HDAC1 enhances cell proliferation and HDAC3 stimulates cell migration with downregulation of E-cadherin. *Int J Cancer*. 2010; 127: 1332-46. (査読あり)
6. Suzuki A, Horiuchi A, Oka K, Miyamoto T,

Kashima H, Shiozawa T. Immunohistochemical detection of steroid receptor cofactors in ovarian endometriosis: involvement of down-regulated SRC-1 expression in the limited growth activity of the endometriotic epithelium. *Virchows Arch.* 2010; 456: 433-41. (査読あり)

7. 堀内晶子、布施谷千穂、林晶子、菊地範彦、塩沢丹里：卵巣癌腹膜播種性転移の分子機序．産婦人科の実際 59:1501-1508, 2010 (査読なし)

〔学会発表〕(計 17 件)

- ① 鈴木昭久、堀内晶子、浅香亮一、布施谷千穂、宮本 強、塩沢丹里：卵巣子宮内膜症の癌化における mismatch repair (MMR) 異常に関連する遺伝子変異の検討，第 33 回日本エンドメトリオーシス学会，2012. 1. 21, 長崎
- ② 堀内晶子：生涯研修プログラム こんな症例、手術するかしないか 4) 症例 4 22 歳 未婚未経妊女性 子宮頸部高度異形成，第 63 回日本産科婦人科学会・総会・学術講演会，2011. 8. 29, 大阪
- ③ 安藤大史、堀内晶子、宮本 強、橘 涼太、近藤沙織、鹿島大靖、塩沢丹里：卵管癌 21 例の臨床病理学的検討，第 63 回日本産科婦人科学会・総会・学術講演会，2011. 8. 29, 大阪
- ④ 布施谷千穂、堀内晶子、林 晶子、菊地範彦、鈴木昭久、岡 賢二、塩沢丹里：慢性炎症は卵巣子宮内膜症における mismatch repair (MMR) 異常に関連する，第 63 回日本産科婦人科学会・総会・学術講演会，2011. 8. 29, 大阪
- ⑤ 堀内晶子、布施谷千穂、近藤沙織、橘 涼太、鹿島大靖、宮本 強、塩沢丹里：卵巣癌の初期発生の自然史解析と早期診断の可能性，第 63 回日本産科婦人科学会・総会・学術講演会，2011. 8. 29, 大阪
- ⑥ 林 晶子、堀内晶子、布施谷千穂、菊地範彦、林 琢磨、塩沢丹里：卵巣癌細胞における Histone deacetylase (HDAC) 阻害剤と抗癌剤の併用効果，第 63 回日本産科婦人科学会・総会・学術講演会，2011. 8. 29, 大阪
- ⑦ 堀内晶子：卵巣癌発生の自然史と早期診断，第 3 回大阪産婦人科臨床フォーラム，2011. 2. 27, 大阪
- ⑧ 布施谷千穂、堀内晶子、林 晶子、岡 賢二、塩沢丹里：Dienogest は炎症性サイトカインによるミスマッチ修復機構異常を抑制する，第 32 回日本エンドメトリオーシス学会，2011. 1. 22, 東京
- ⑨ Fuseya C、Horiuchi A、Kikuchi N、

Suzuki A、Takatsu A、Osada R、Shiozawa T：Involvement of mismatch repair (MMR) abnormality in the malignant transformation of ovarian endometriosis, International Gynecologic Cancer Society (IGCS 2010), 2010. 10. 23, Praha Česká republika

- ⑩ 布施谷千穂、堀内晶子、林 晶子、菊地範彦、鈴木昭久、高津亜希子、長田亮介、塩沢丹里：卵巣子宮内膜症の癌化における mismatch repair (MMR) 異常の関与，第 69 回日本癌学会学術総会 2010. 9. 22 大阪
- ⑪ 三橋祐布子、堀内晶子、宮本 強、鈴木昭久、塩沢丹里：子宮内膜癌発生における Notch シグナリングの関与の検討，第 69 回日本癌学会学術総会，2010. 9. 22～9. 24, 大阪
- ⑫ 林 晶子、堀内晶子、布施谷千穂、菊地範彦、大平哲史、塩沢丹里：HDAC inhibitors increased the efficacy of an anticancer agent in ovarian cancer cells, 第 69 回日本癌学会学術総会，2010. 9. 22～9. 24, 大阪
- ⑬ 布施谷千穂、堀内晶子、林 晶子、高津亜希子、鈴木昭久、塩沢丹里：卵巣子宮内膜症の癌化におけるミスマッチ修復機構異常の関与，第 9 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会，2010. 9. 10, 大津
- ⑭ 堀内晶子：卵巣癌発生の Natural History と早期診断，JSAWI2010，2010. 9. 3～9. 4, 淡路
- ⑮ 布施谷千穂、堀内晶子、林 晶子、鈴木昭久、岡 賢二、塩沢丹里：慢性炎症は卵巣子宮内膜症における mismatch repair (MMR) 異常に関連する，生殖フォーラム，2010. 6. 4. ～6. 5, 佐賀
- ⑯ 布施谷千穂、堀内晶子、林 晶子、菊地範彦、鈴木昭久、高津亜希子、長田亮介、塩沢丹里：卵巣子宮内膜症における mismatch repair (MMR) 異常の関与，第 62 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会，2010. 4. 23～4. 25, 東京
- ⑰ 橘 涼太、安藤大史、島田智聡、鈴木昭久、鹿島大靖、宮本 強、芦田 敬、岡賢二、堀内晶子、塩沢丹里：膀胱壁と癒合し膀胱腫瘍と類似した形態をとった卵巣境界悪性粘液性腫瘍の一例，第 62 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会，2010. 4. 23～4. 25, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀内 晶子 (HORIUCHI AKIKO)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：80334895

(2)研究分担者

菊地 範彦 (KIKUCHI NORIHIKO)

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50447728

布施谷 千穂 (FUSEYA CHIHO)

信州大学・医学部附属病院・助教 (診療)

研究者番号：50447736

塩沢 丹里 (SHIOZAWA TANRI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：20235493

(3)連携研究者：なし