

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390375

研究課題名(和文)ハイスループットスクリーニングを利用した、婦人科がん薬剤耐性克服に向けた治療戦略

研究課題名(英文)The therapeutic strategy toward overcoming drug resistance of gynecologic cancers utilizing high throughput screening.

研究代表者

八重樫 伸生 (YAEGASHI, Nobuo)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00241597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では6650遺伝子からなるsiRNAライブラリーを利用したハイスループット・スクリーニングでCDDP投与と合成致死作用を示す分子を探索した。細胞膜タンパク質であるTIE-1を候補分子として同定したが、TIE-1と卵巣がんや薬剤耐性との関わりは今までに報告されていない。卵巣がん患者におけるTIE-1発現の意義を検討するためにin silico解析を行い、TIE-1高発現群では有意に予後不良となる事を確認した。またTIE-1過剰発現細胞はCDDP投与時のアポトーシスおよびDNA二重鎖切断のマーカーであるγ-H2AXの発現もコントロールと比較して減少する事を確認した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to search the molecules that can cancel the cisplatin resistance of cancer cells. We explore the molecules that show a synthetic lethal effect with a small amount of CDDP administration in a high-throughput screening using siRNA library consisting of 6650 genes. As a result, a strong expression of TIE-1 was found to be decrease the sensitivity toward cisplatin in several ovarian cancer cell lines. The relationship among TIE-1, ovarian cancer and/or drug resistance has not been reported. In order to examine the significance of TIE-1 expression in ovarian cancer patients, in silico analysis was carried out. We confirmed that TIE-1 high expression group has a significantly poor prognosis by examination of the overall survival in 1582 ovarian cancer patients. Furthermore, we confirmed that apoptosis and γ-H2AX expressions, a marker for DNA-double strand breaks, were significantly decreased during CDDP administration in TIE-1 over-expressed cells.

研究分野：産婦人科学

キーワード：スクリーニング 薬剤耐性 婦人科がん 化学療法 シスプラチン

1. 研究開始当初の背景

婦人科がん治療において、化学療法は卵巣がん・子宮頸部・子宮内膜がんのいずれにおいても中心的な役割を果たしている。しかし化学療法では、がん細胞が薬剤耐性を獲得し治療抵抗性となる、という大きな問題点がある。我々は今まで薬剤トランスポーターの発現解析に焦点を絞った薬剤耐性機構の研究に取り組んできた。

一方で多数の候補分子/化合物を対象として薬効・活性を示す分子を探し出すスクリーニング技術が近年発展しており、未知の分子の重要性が明らかになる例や新規バイオマーカー、分子標的薬の開発につながる例があり、特に創薬分野では重要性が増している。

2. 研究の目的

薬剤耐性の克服に向けた治療戦略構築を目的として、臨床で頻用される抗がん剤である CDDP に焦点を絞り、全ゲノムスケール siRNA および大規模化合物ライブラリーを利用したハイスループット・スクリーニングを利用する研究を行う。この研究では、現在使用可能な低分子阻害剤をマウスモデルで使用してその治療効果を検証する実験を含んでおり、創薬につながる新規治療標的の同定、および臨床応用への橋渡し研究につながる可能性が高いと考えている。

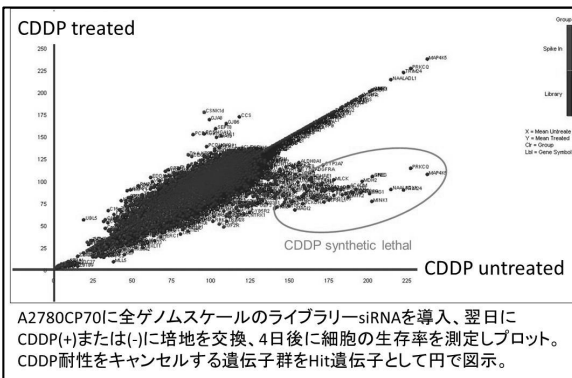
3. 研究の方法

共同研究者から譲渡、または我々が樹立した isogenic な薬剤耐性細胞株ペアを複数用意し、それぞれスクリーニングでの条件検討を行う。スクリーニングに適した細胞株を、ハイスループットな大規模 siRNA および化合物ライブラリーでのスクリーニングに使用する。スクリーニングで得られた分子に関して、スクリーニング結果 低分子阻害剤の有無 抗がん剤耐性やがん形質との既知の関連情報、の 3 基準をもとに選択して bioinformatics 解析を行う。標的分子を絞り込

み、2次スクリーニングと *in vitro* および *in vivo* での検証実験を通じて分子の有用性を調べる。最終的に translational research として臨床への応用を目指す。

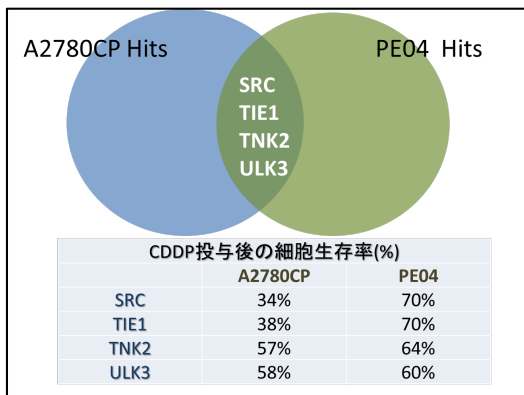
4. 研究成果

共同研究施設であるワシントン大学 Quellous HTS core にて、384well フォーマットで専用ロボットを用いて大量高速処理で siRNA スクリーニングを行った。シスプラチン耐性卵巣がん細胞株に siRNA 導入後に対象の抗がん剤処理群と無処理群に分けてそれぞれの生存率を測定した。抗がん剤処理群での比較生存率が無処理群より著明に低下した 113 遺伝子を Hit とした (下図 1)。



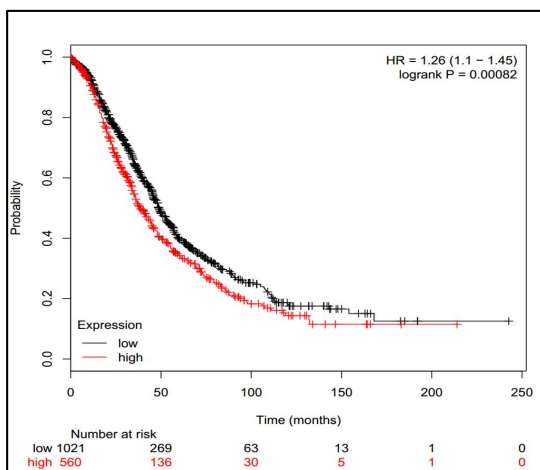
(図 1)

これらの 113 遺伝子を Bioinformatics 解析によって 33 遺伝子に絞り込みを行い、さらに異なる角度からの validation assays を行った。スクリーニング結果が遺伝子特異的な現象である事を確認するために、primary screening とは独立した 2 種類のシスプラチン耐性細胞株ペアである A2780/A2780CP70 および PE01/PE04 の 4 種の細胞株を使用、加えてスクリーニングとは異配列の siRNA を用いて合成致死作用の有無について validation assay を行った。また、シスプラチン添加前後の発現量解析を RT-PCR にて行った。これらの実験結果を検討してシスプラチン感受性を改善する標的分子として 4 分子を抽出した (下図 2)。



(図 2)

最終候補となった4遺伝子について、それぞれ蛋白発現ベクターを作成し過剰発現によりシスプラチン感受性に变化が生じるかを検討した。その結果、細胞膜タンパク質である TIE-1(Tyrosine kinase immunoglobulin-like and EGF-like domains 1)の強発現でシスプラチン感受性の低下を確認した。今までに TIE-1 の卵巣がんや薬剤耐性との関わりは報告されていないので、卵巣がん患者における TIE-1 発現の意義を検討するために *in silico* 解析を行った。データベース解析で卵巣がん患者 1582 人の全生存期間を調べたところ、TIE-1 高発現群では有意に予後不良となる事を確認した(下図3)。



(図 3)

また、TIE-1 を過剰発現させた細胞は、CDDP 投与時のアポトーシスおよび DNA 二重鎖切断のマーカーである γ -H2AX の発現もコントロールと比較して減少する事を確認した。現在は TIE-1 とアポトーシスとの関連につい

てメカニズム解析を行っている。

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 10 件)

Mashiko S, Kitatani K*, Toyoshima M* (*correspoing authors), Ichimura A, Dan T, Usui T, Ishibashi M, Shigeta S, Nagase S, Miyata T, Yaegashi N .

Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 is a potential therapeutic strategy in ovarian cancer.

Cancer Biology & Therapy 査読有 (2015) 16(2): 1-8

10.1080/15384047.2014.1001271.

Otsuki A, Otsuki T, Tokunaga H, Niikura H, Nagase S, Sugiyama T, Toyoshima M, Utsunomiya H, Yokoyama Y, Mizunuma H, Sato N, Terada Y, Shoji T, Sugiyama T, Nakahara K, Ohta T, Yamada H, Tase T, Nishiyama H, Fujimori K, Takano T, Takahashi F, Watanabe Y, Yaegashi N

Evaluation of Postoperative Chemotherapy in Patients with Uterine Carcinosarcoma: A Retrospective Survey of the Tohoku Gynecologic Cancer Unit.

International Journal of Clinical Oncology 査読有 (2014) in press

PMID:25030547

Tokunaga H, Watanabe Y, Niikura H, Nagase S, Toyoshima M, Shiro R, Yoshihito Yokoyama Y, Mizunuma H, Ohta T, Nishiyama H, Watanabe T, Sato N, Sugiyama T, Takano T, Takahashi F, Yaegashi N

Outcomes of Abdominal Radical Trachelectomy: Results of a Multicenter Pro-

spective Cohort Study in a Tohoku Gynecologic Cancer Unit.

International Journal of Clinical Oncology
査読有 (2014) in press

10.1007/s10147-014-0763-6

Tanaka S, Nagase S, Kaiho-Sakuma M, Nagai T, Kurosawa H, Toyoshima M, Tokunaga H, Otsuki T, Utsunomiya H, Takano T, Niikura H, Ito K, Yaegashi N.

Clinical outcome of pelvic exenteration in patients with advanced or recurrent uterine cervical cancer.

Int J Clin Oncol 査読有 (2014)

19(1):133-8

10.1007/s10147-013-0534-9

Takano T, Niikura H, Ito K, Nagase S, Utsunomiya H, Otsuki T, Toyoshima M, Tokunaga H, Kaiho-Sakuma M, Shiga N, Nagai T, Tanaka S, Otsuki A, Kurosawa H, Shigeta S, Tsuji K, Yamaguchi T, Yaegashi N

Feasibility study of gemcitabine plus docetaxel in advanced or recurrent uterine leiomyosarcoma and undifferentiated endometrial sarcoma in Japan.

International journal of clinical oncology
査読有 (2014) 19: 897-905

10.1007/s10147-013-0627-5

Satoru Nagase, Fumihiko Suzuki, Hideki Tokunaga, Masafumi Toyoshima, Hiroki Utsunomiya, Hitoshi Niikura, Nobuo Yaegashi

Molecular Pathogenesis of Uterine Serous Carcinoma

Curr Obstet Gynecol Rep. 査読有(2014)
3 : 33-39

10.1007/s13669-013-0069-0

Tadao Takano, Takeo Otsuki, Hideki Tokunaga, Masafumi Toyoshima, Hiroki Utsunomiya, Satoru Nagase, Hitoshi Niikura, Kiyoshi Ito, Nobuo Yaegashi, Hidekazu Yamada, Toru Tase, Masahiro Kagabu, Tadahiro Shoji, Toru Sugiyama, Naoki Sato, Junzo Kigawa, et al

Paclitaxel-carboplatin for advanced or recurrent carcinosarcoma of the uterus: the Japan Uterine Sarcoma Group and Tohoku Gynecologic Cancer Unit Study

Int J Clin Oncol. 査読有(2014)

19:1052-1058

10.1007/s10147-013-0658-y

Tanaka S, Nagase S, Kaiho-Sakuma M, Nagai T, Kurosawa H, Toyoshima M, Tokunaga H, Otsuki T, Utsunomiya H, Takano T, Niikura H, Ito K, Yaegashi N.

Clinical outcome of pelvic exenteration in patients with advanced or recurrent uterine cervical cancer.

Int J Clin Oncol 査読有(2014) 19(1) :
133-138

10.1007/s10147-013-0534-9

Hideki Tokunaga, Satoru Nagase, Kosuke Yoshinaga, Sota Tanaka, Tomyuki Nagai, Hiroki Kurosawa, Michiko Kaiho-Sakuma, Masafumi Toyoshima, Takeo Otsuki, Hiroki Utsunomiya, Tadao Takano, Hitoshi Niikura, Kiyoshi Ito and Nobuo Yaegashi

Small Cell Carcinoma of the Uterine Cervix: Clinical Outcome of concurrent Chemoradiotherapy with a Multidrug Regimen

Tohoku J. Exp. Med. 査読有(2013)

229:75-81

10.1620/tjem.229.75

Hiroki Kurosawa, Kiyoshi Ito, Hitoshi

Nikura, Tadao Takano, Satoru Nagase, Hiroki Ustunomiya, Takeo Otsuki, Masa-fumi Toyoshima, Tomoyuki Nagai, Souta Tanaka, Mika Watanabe and Nobuo Yaegashi

Hysteroscopic inspection and total curettage are insufficient for discriminating endometrial cancer from atypical endometrial hyperplasia

Tohoku J. Exp. Med. 査読有 (2012)

228:365-370

10.1620/tjem.228.365

[学会発表](計13件)

Shigeta S, Toyoshima M, Kitatani K, Ishibashi M, Usui T, Yaegashi N
Transferrin facilitates DNA-double strand breaks via transferrin receptor 1 in human fallopian tube epithelial cells: possible involvement of transferrin in carcinogenesis. Society for Reproductive Investigation 62th scientific annual meeting
San Francisco, USA 2015年3月27日

北谷和之、豊島将文、臼井利典、重田昌吾、石橋ますみ、永瀬智、八重樫伸生
セラミドによる卵巣がん播種転移制御
第3回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会 九州大学医学部百年記念講堂(博多市) 2015年2月21日

北谷和之、豊島将文、臼井利典、重田昌吾、石橋ますみ、永瀬智、八重樫伸生
スフィンゴ脂質セラミドを利用した卵巣がん播種転移薬の可能性
第2回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会 東京慈恵医大(東京都) 2014年7月4日

Satsuki Mashiko, Masafumi Toyoshima, Kazuyuki Kitatani, Shogo Shigeta, Masumi Ishibashi, Nobuo Yaegashi

Investigation of PAI-1 as a new therapeutic target for ovarian cancer.

第66回日本産科婦人科学会学術総会 東京国際フォーラム(東京都) 2014年4月19日

北谷和之、豊島将文、増子さつき、重田昌吾、石橋ますみ、永瀬智、八重樫伸生
セラミドによる細胞運動性の調節: セラミドリポソームの抗卵巣がん播種転移薬としての可能性

第66回日本産科婦人科学会学術総会 東京国際フォーラム(東京都) 2014年4月18日

石橋ますみ、豊島将文、北谷和之、増子さつき、重田昌吾、八重樫伸生
大規模 siRNA スクリーニングを用いた卵巣がんのシスプラチン抵抗性を克服する分子標的の検討
第66回日本産科婦人科学会学術総会 東京国際フォーラム(東京都) 2014年4月18日

北谷和之・豊島将文・増子さつき・重田昌吾・石橋ますみ・八重樫伸生
卵巣がん転移を標的にした創薬: スフィンゴ脂質の利用
第12回日本婦人科がん分子標的研究会 東大寺総合文化センター(奈良市) 2013年7月5日

増子さつき・豊島将文・北谷和之・重田昌吾・八重樫伸生
卵巣明細胞腺癌におけるPAI-1の発現と血栓症発症の関連についての検討
第65回日本産科婦人科学会学術総会 札幌市 2013年5月12日

重田昌吾・豊島将文・増子さつき・北谷和之・八重樫伸生
卵管上皮内腺癌におけるDNA二本鎖切断とp53発現の免疫組織学的検討
第65回日本産科婦人科学会学術総会 札幌市 2013年5月10日

Masafumi Toyoshima, Kazuyuki
Kitatani, Satsuki Mashiko, Shogo Shigeta
and Nobuo Yaegashi
Identification of Targeted Therapies for
Ovarian Cancers by Functional Genomics
第 65 回日本産科婦人科学会学術総会
札幌市 2013 年 5 月 10 日

石橋ますみ、豊島将文、北谷和之、増子
さつき、重田昌吾、八重樫伸生
大規模 siRNA スクリーニングを用いた卵巣
がんのシスプラチン抵抗性を克服する分子
標的の検討
第 1 回婦人科がんバイオマーカー研究会学術
集会 東京大学伊藤国際学術研究センター
(東京都文京区) 2013 年 2 月 16 日

豊島将文、北谷和之、増子さつき、重田
昌吾、石橋ますみ、八重樫伸生
c-Myc 高発現をバイオマーカーとした卵巣がん
における治療標的分子の同定
第 1 回婦人科がんバイオマーカー研究会学術
集会 東京大学伊藤国際学術研究センター
(東京都文京区) 2013 年 2 月 16 日

Masafumi Toyoshima
Identification of Targeted therapies for
Ovarian Cancer by Functional Genomics
Marsha Rikin the 9th Ovarian Cancer Re-
search Symposium (招待講演)
Seattle, USA 2012 年 9 月 7 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ob-gy.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八重樫 伸生 (YAEGASHI, Nobuo)
東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00241597

(2) 研究分担者

豊島 将文 (TOYOSHIMA, Masafumi)
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講
師
研究者番号：70451581

(3) 連携研究者

永瀬 智 (Nagase, Satoru)
山形大学・医学部・教授
研究者番号：00292326

鈴木 史彦 (Suzuki, Fumihiko)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20400343