

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592529

研究課題名(和文) 卵巣癌の薬物応答に関する新規バイオマーカーの特定

研究課題名(英文) Identification of novel bio-marker associated with drug response in ovarian cancer

研究代表者

山上 亘(Yamagami, Wataru)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30348718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、一塩基多型(single nucleotide polymorphism, SNP)に基づいた卵巣癌術後化学療法の効果予測、卵巣癌への分子標的治療薬効果予測マーカーの開発を目的とした。は癌症例の血中リンパ球の網羅的SNP解析により、化学療法的好中球減少の程度で有意差を認めるSNPを5種、および判別分析にて20種抽出した。これらの中に予後と相関を認めたSNPが認められた。は卵巣癌組織においてFGF3, FGF4遺伝子のコピー数増幅が7%, 12%で認められ、細胞株ではES2細胞株で増幅が認められた。ES2細胞株でソラフェニブのIC50値が他の卵巣癌細胞株に比べ、有意に低値であった。

研究成果の概要(英文)：The aims are to clarify 1) the method for predicting effect of postoperative chemotherapy by single nucleotide polymorphism(SNP) and 2) the bio-marker for predicting effect of targeted therapy for ovarian cancer.
1) Global SNP analysis using normal lymphocytes from ovarian cancer patients on the basis of a degree of neutropenia following adjuvant chemotherapy extracted five SNPs and discriminant analysis extracted twenty SNPs. Some of these SNPs correlated with the prognosis. 2) Copy number amplification of FGF3 and FGF4 was detected in 7% and 12% of ovarian cancer tissues and ES2 cell line. IC50 of sorafenib were significantly lower in ES2 cell line than that in the other ovarian cancer cell lines.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 分子標的治療薬 化学療法 バイオマーカー SNP コピー数増幅

1. 研究開始当初の背景

(1)抗癌剤治療：卵巣癌の治療成績はプラチナ製剤およびタキサン系抗癌剤の導入により改善されつつあるが、両薬剤に反応しない症例も相当数認められる。今後の術後補助療法の1つの方向性として、効果予測を行い症例ごとの特性に応じた治療を選択するのが望ましいと考える。これまで我々のグループの報告も含めて発現解析などの手法でその効果予測が試みられてきたが、未だ確立された有効な方法はない。一方で我々は、補助化学療法を施行した卵巣癌症例を対象に、補助化学療法時の好中球減少の程度と progression free survival (PFS)の相関性を検証したところ、好中球減少の重篤であった症例ではPFSの延長を認め、進行期とならぶ強力な予測因子であることが判明した。他癌でも同様の現象は報告されており、特に肺がんではプラチナ製剤について、患者リンパ球の障害と関連する一塩基多型(single nucleotide polymorphism, SNP)が、効果とも関連することが報告されている (Tan XL, et al, Clin Cancer Res 2011)。これらのことは抗癌剤の反応に關与する SNP が正常幹細胞より癌幹細胞に受け継がれ、抗癌剤の効果および副作用に關与するという仮説がたてられる。すなわち抗癌剤効果は毒性と関連しており、効果および毒性に共通に關与する SNP が存在し、それを発見することで評価可能病変のない補助化学療法の効果を予測できる可能性がある。本研究では TC 療法の効果を予測できる SNP を探索する。

(2)分子標的薬：これまで卵巣癌に対して、分子標的薬の臨床試験が行われており、現時点では VEGF に対するモノクローナル抗体である Bevacizumab やチロシンキナーゼ阻害薬である Cediranib、multi-kinase inhibitor である Sorafenib、Sunitinib、mTOR 阻害剤である temsirolimus や everolimus、BRCA pathway に關与する PARP inhibitor である olaparib などが効果の期待できる薬剤で、それぞれの病勢

制御率は 77%, 30%, 38%, 56%, 50%, 67% と報告されている。特に Sorafenib、Sunitinib は腎癌では保険承認されており、生物学的に腎癌に類似している明細胞癌に対して有望な薬剤と期待されている。分子標的治療薬はその毒性や効果は、各人が有する遺伝子情報に關与することが知られている。たとえば Gefitinib は EGFR 遺伝子変異が効果や毒性に密接に關連することが報告されている。我々はすでに肝がんにおいて FGF3/FGF4 の増幅が sorafenib の効果と相關することを確認している。本研究では卵巣癌に有効性が期待されている分子標的薬の關連経路の異常を臨床検体および細胞株で探索することで、当該薬の効果を期待できる群をスクリーニングし、また効果予測を試みる。

2. 研究の目的

卵巣癌術後治療の柱は化学療法であるが、その効果には限界がある。近年では分子標的治療薬の有効性も報告されつつあり、今後本邦でも臨床応用されることが予測される。そこで本研究ではこれら治療法の効果を予測するため、以下のことを明らかにする。

(1)評価可能病変のない術後補助化学療法の効果を治療前に予測できる方法は確立されていない。そこで SNP に基づき、卵巣癌の術後化学療法 (TC 療法) の効果を予測できるシステムを開発する。

(2)卵巣癌の臨床検体で卵巣癌に有効性が期待されている分子標的薬の關連経路の異常を探索し、適応に有用なバイオマーカーを探索する。

3. 研究の方法

(1)抗癌剤治療

初回化学療法として手術後に TC 療法を施行した上皮性卵巣癌 63 例を対象とし、末梢血より採取したリンパ球から DNA を抽出し、この DNA を用いて SNP アレイ (Illumina 社) による網羅的 SNP 解析を実施した。化学療法

時の毒性の指標としては好中球減少を、治療効果の指標としては無増悪生存期間(PFS)を用い、これらの指標の程度に基づき2群に分けた際に、統計学的に分布に差の見られたSNPを選別した。さらに、これらの薬物反応を予測可能な最適なSNPの組み合わせの抽出を行った。

(2)分子標的治療薬

卵巣癌症例123症例のパラフィン包埋切片の癌部よりDNAを抽出した。FGF3, FGF4, FGFR1, FGFR2, PIK3CA 遺伝子について Taqman® Copy Number assays Kit を用いて、コピー数の解析を行った。コピー数増幅の有無と卵巣癌症例の臨床病理学的因子(手術進行期、組織型)と予後との関係について解析を行った。

卵巣癌細胞株14種よりDNAを抽出し、FGF3, FGF4, FGFR1, FGFR2, PIK3CA 遺伝子について Taqman® Copy Number assays Kit を用いて、コピー数の解析を行った。

コピー数増幅を認められた細胞株において、ソラフェニブ、テムシロリムス、エベロリムスの薬剤耐性を調べるために、Dojindo Cell Counting Kit-8 を用いて細胞傷害性試験を行い、IC50値を測定した。

4. 研究成果

(1)抗癌剤治療

初回TC療法1サイクル目の好中球減少が高度な群と軽度な群の2群間で分布に有意差($p < 0.05$)を認められたSNPのうち、 p 値が小さいものから順に、また薬物代謝関連47遺伝子上に限定して、複数の候補SNPを抽出した。さらにこの中からPFSとの相関性を検証し治療効果にも関連しうる5つのSNPを選別した。このうち1つのSNPは良好なPFSと有意な相関を認められた($p=0.02$)。また、好中球減少を予測する最適なSNPの組み合わせを判別分析にて検討したところ、タキサン代謝関連遺伝子を中心に20個のSNPが抽出できた。

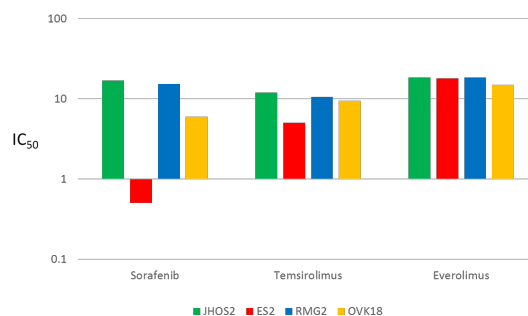
以上により、卵巣癌術後化学療法の効果を予測可能なSNPを複数個抽出された。今後は、これらのSNPを別の症例群における検証を行う。また、他癌種においても同じSNPを用いることで、TC療法の効果予測が可能かどうかについても検討予定である。

(2)分子標的治療薬

卵巣癌症例の癌組織から抽出したDNAによるコピー数の解析は85例(69%)で可能であった。以下、結果を抜粋して示す。FGF3遺伝子は6例(7%)、FGF4遺伝子は10例(12%)、PIK3CA遺伝子は12例(14%)で増幅を認めた。コピー数増幅と臨床病理学的因子(手術進行期、組織型)と予後(無増悪生存率、全生存率)との関係を統計学的に解析したが、特に有意差や傾向は認められなかった。

卵巣癌細胞株14種(漿液性腺癌2、粘液性腺癌4、類内膜腺癌1、明細胞腺癌7)を用いて、コピー数増幅を解析したところ、FGF3、FGF4遺伝子増幅はES2細胞株で、PIK3CA遺伝子増幅はJHOS2細胞株と、JHOC8細胞株で認められた。

でコピー数増幅が認められたES2細胞株、JHOS2細胞株と、コピー数増幅が認められなかった卵巣癌細胞株であるRMG2細胞株、OVK18細胞株を用いて薬剤耐性を解析したところ、下図のようになり、ES2細胞株でソラフェニブのIC50値が有意に低値であった。



上記成果より、卵巣癌において、FGF3、FGF4遺伝子コピー数増幅は、分子標的治療薬ソラフェニブの効果予測マーカーとなりうる可

能性が示唆された。

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0件)

〔学会発表〕(計6件)

(1) 山上亘、片岡史夫、坂井健良、真壁健、二宮委美、和田美智子、野村弘行、進伸幸、津田浩史、西尾和人、田中守、青木大輔、Copy number assay による sorafenib の卵巣癌への有効性の探索、第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会、平成 27 年 4 月 10 日～12 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(2) 岩佐尚美、野村弘行、片岡史夫、吉浜智子、中平直希、橋本志歩、二宮委美、山上亘、進伸幸、田中守、青木大輔、パクリタキセル+カルボプラチン併用療法(TC療法)のがん種非特異的効果予測因子としての一塩基多型の抽出、第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会、平成 27 年 4 月 10 日～12 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(3) 野村弘行、片岡史夫、岩佐尚美、中平直希、橋本志歩、有馬宏和、千代田達幸、山上亘、富永英一郎、進伸幸、青木大輔、SNP 解析を用いた卵巣癌化学療法の効果予測手法の構築、第 2 回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会、平成 26 年 7 月 2 日、東京慈恵会医科大学 1 号館 3 階講堂 (東京都港区)

(4) 野村弘行、片岡史夫、岩佐尚美、中平直希、橋本志歩、有馬宏和、千代田達幸、山上亘、富永英一郎、進伸幸、吉村泰典、青木大輔、上皮性卵巣癌に対する TC 療法の薬物反応を規定する一塩基多型の抽出、第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会、平成 26 年 4 月 18 日～20 日、東京国際フォーラム (東京都千代田区)

(5) Nomura H, Kataoka F, Chiyoda T, Tanaka H,

Hashimoto S, Arima H, Yamagami W, Tominaga E, Susumu N, Aoki D, Association between drug response and gene polymorphisms in first line chemotherapy for ovarian cancer、第 72 回日本癌学会学術集会、平成 25 年 10 月 3 日～5 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(6) 野村弘行、津田浩史、片岡史夫、千代田達幸、井口蓉子、橋本志歩、山上亘、富永英一郎、進伸幸、青木大輔、吉村泰典、上皮性卵巣癌初回化学療法における治療効果予測因子としての gene polymorphism の解析、第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会、平成 25 年 5 月 10 日～12 日、ロイトン札幌、ホテルさっぽろ芸文館、札幌プリンスホテル、札幌市教育文化会館 (北海道札幌市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕
ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山上 亘 (YAMAGAMI, Wataru)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：30348718

(2) 研究分担者

西尾 和人 (NISHIO, Kazuto)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：10208134

赤羽 智子 (AKAHANE, Tomoko)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：40398699