

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462588

研究課題名(和文) 卵巣癌における血管新生阻害薬抵抗性を克服するための治療法開発-HIF阻害剤の導入

研究課題名(英文) Development of new treatment in ovarian cancer - HIF inhibitor to overcome the anti-angiogenic drug resistance

研究代表者

鈴木 紀子 (SUZUKI, NORIKO)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・学術研究補佐員

研究者番号：40642096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ベバシツマブ投与した卵巣癌モデルマウスでは腫瘍内部に低酸素領域が形成され、癌幹細胞マーカーの発現がその近傍にみられた。また、卵巣癌細胞のスフェロイド内部に低酸素領域があり、幹細胞マーカーの発現も見られ、さらに新規HIF阻害剤は低酸素領域の細胞死を誘導した。幹細胞マーカーの発現調節にはHIF-2の関与が示唆された。

以上の結果から、ベバシツマブ投与により形成される低酸素環境において、癌幹細胞が出現、維持されており、HIF阻害剤との併用によりその治療抵抗性が解除される可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In the bevacizumab administered ovarian cancer mouse model, hypoxic region is formed inside the tumor, the expression of ovarian cancer stem cell marker was seen in the vicinity of hypoxic region. Further, we constructed spheroids of ovarian cancer as a 3-dimensional hypoxia model, in which the internal hypoxic region contained cancer stem like cells expressing stem cell factor. The internal hypoxic region was disappeared by HIF inhibitor treatment. In conclusion, hypoxia promotes the expansion of cancer stem like cells expressing ovarian cancer stem cell marker accompanied with the increase of stem cell factors, and HIF inhibitor would be a potential candidate for ovarian cancer therapy by inhibiting hypoxia-induced cancer stem like cells expansion.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：低酸素 卵巣癌

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は初期症状がほとんどないため早期発見が難しく、卵巣癌の8割以上が進行期で発見される。その標準的 first-line 化学療法はカルボプラチン/パクリタキセル療法であるが、約75%が再発する上、そのほとんどが化学療法抵抗性を示すため致死率の改善がみられず、婦人科腫瘍の中では最も死亡率が高い。よって新たな治療法の開発が急務となっている。

近年、癌細胞特異的に発現する分子を標的とした分子標的薬が注目されている。その分子標的薬の代表的なものの一つがベバシツマブである。ベバシツマブは血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)に対する抗体で、細胞外において VEGF と特異的に結合することにより、VEGF とそのレセプターとの結合を阻害する。その作用により、血管新生を抑制し癌細胞の増殖を阻害することで抗腫瘍効果を示す。既に結腸・直腸癌、非小細胞肺癌、乳癌で既存の抗癌剤との併用療法が承認されている。卵巣癌においては、2011年に ASCO で、標準的 first-line 化学療法へのベバシツマブの導入の臨床試験結果が発表された。結論は PFS(無増悪生存)期間は約4カ月延長したものの、OS(全生存率)はほとんど変わらないというデータであった。しかし PFS 期間の延長は有意差があり、ベバシツマブとの併用は新規治療法の選択肢の一つとして考慮に十分値するものであり、引き続き至適併用方法、費用対効果などの検討が必要と結論づけられた。一方、ベバシツマブの投与により、血管新生を阻害された腫瘍組織が低酸素環境となっているという報告がある(Ou G et al, 75, 463-467, 2009; Int.J Rad Oncol Biol Phys, 2009, Rapisarda A et al, Mol Cancer Ther, 8, 1867-1877, 2009)。臨床試験結果で認められたベバシツマブ抵抗性の要因の一つとして、低酸素環境に抵抗性を持つサブクローナルポピュレーションがセレクションされている可能性が示唆されてい

る(Bottsford-Miller JN et al, J Clin Oncol, 30, 4026-4034, 2012)。また一方では、近年、癌の治療抵抗性の要因の一つといわれている癌幹細胞の微小環境は低酸素ニッチで維持されていることが明らかにされつつあり、ベバシツマブ抵抗性のサブクローンに癌幹細胞が含まれている可能性も考えられる。そのような低酸素環境下で高発現している転写因子 HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) は1995年に Semenza らによって発見された(Semenza GL, J Biol Chem, 270, 1230-1237, 1995)。HIF-1 $\alpha$ は低酸素環境下でのみ安定化して存在し、 $\beta$ サブユニットとヘテロダイマーを形成し核内で下流の遺伝子発現を調節することにより、癌細胞を取り巻く低酸素環境を克服し、その生存・増殖を持続させていると考えられている。実際、多くの癌組織で HIF-1 が高発現しており、治療抵抗性、予後の不良、転移・再発との関連性が報告されている(Zhong H et al, Cancer Res, 59, 5830-5835, 1999)。また、申請者らは、最近卵巣癌細胞株において低酸素が幹細胞に必要な因子や、癌幹細胞マーカーの発現を亢進し HIF-1 阻害剤のひとつである、TX-402 がその亢進を濃度依存的に抑制することを見出した。低酸素下で高発現している HIF-1 によって癌幹細胞が維持され、その結果癌の悪性化や再発に寄与していることが示唆された。よって申請者らは、ベバシツマブ継続投与により低酸素となった癌微小環境で TX-402 が癌幹細胞の生存を抑制することにより、ベバシツマブの抵抗性が改善される可能性があると考えた。よって、このような抗癌剤とベバシツマブ、HIF-1 阻害剤の併用で卵巣癌の予後の改善が期待できると考え、本研究に着手した。

## 2. 研究の目的

本研究は、卵巣癌に対する抗癌剤と血管新生阻害剤の併用治療の効果を増強するため、低酸素誘導因子(HIF-1)阻害剤を取り入れた新たな治療戦略を構築することを目的とし

た。卵巣癌に対するベバシツマブと抗癌剤の併用による臨床試験の結果、全生存率に有意差が認められなかった。この要因として、血管新生阻害で誘起される低酸素ストレスが選択圧となり悪性な低酸素耐性クローンを増大させ、治療抵抗性を獲得するためと予想した。このクローン選択において HIF-1 が重要な役割を果たすと考えられる。そこで、マウス卵巣癌モデルにおいて HIF-1 阻害剤として低酸素トキシンを併用した場合の治療効果について転移、再発も含めて詳細な検討を行うと共に、卵巣癌患者の tissue micro array 解析を実施し、HIF-1 シグナルと予後の関連を解析した。

### 3. 研究の方法

本研究では卵巣癌の臨床と基礎研究をリンクさせるトランスレーショナルリサーチを目指し、以下の研究を推進した。

(1) 卵巣癌モデルマウスを用いたベバシツマブと新規HIF阻害剤併用による抗腫瘍効果の検討

ベバシツマブ投与による腫瘍内低酸素領域形成の観察

新規HIF阻害剤、シスプラチン(CDDP)との併用効果の検討

(2) 卵巣癌臨床検体から作製するTMAを用いたHIF-1 $\alpha$ の発現と臨床プロファイルとの関連性解析

(3) 卵巣癌細胞株を用いた、新規HIF阻害剤の癌幹細胞維持の分子メカニズムの解析

生体内の腫瘍組織により近い形態となる三次元培養システムを用いて、低酸素微小環境を作り、低酸素下での癌幹細胞化と及びそれに対する新規 HIF 阻害剤の抑制効果を検討する。

### 4. 研究成果

ヌードマウスに卵巣癌細胞株を移植し、血管新生阻害剤ベバシツマブ投与群とプラセボ群に分け、実験を行った。投与期間中は腫瘍体積を計測し、最終的には腫瘍組織を摘出し

て免疫染色を行った。

その結果、ベバシツマブ投与群では、プラセボ群と比較して有意な腫瘍体積縮小がみられた。また摘出した腫瘍の薄切を用いて、低酸素マーカーである pimonidazole に対する免疫染色を行った結果、腫瘍体積は縮小していたのにも関わらず、ベバシツマブ投与群において腫瘍内部に低酸素領域が形成されていることが確認できた。また、卵巣癌幹細胞マーカーとして知られている CD133 についても免疫染色を行った結果、腫瘍内部の低酸素領域近傍に発現がみられた。卵巣癌細胞株を用いた *in vitro* での Real-time PCR の実験により、低酸素環境下で CD133 の発現が亢進していることも確認した。これらのことより、ベバシツマブ投与により腫瘍内部に形成される低酸素環境において、治療抵抗性の一因として考えられている癌幹細胞が出現、維持されている可能性が示された。

また 96 検体からなる卵巣癌 tissue micro array(TMA)を作製し、HIF-1 $\alpha$  と HIF-2 $\alpha$  に対する免疫染色を行い、臨床プロファイルとの関連性を検討した。主に進行期、予後、組織型等との関連を検討したが、傾向はあるものの統計的有意差のある結果を得ることはできなかった。新規 HIF 阻害剤の癌幹細胞に対する作用メカニズムに関しては、卵巣癌細胞株を用いて、それぞれ siRNA によってノックダウンし、幹細胞因子や癌幹細胞マーカーに対する影響を検討した。その結果、HIF-2 $\alpha$  をノックダウンすると低酸素下における幹細胞因子 oct4 の発現亢進が抑制されたため、oct4 に関しては HIF-2 $\alpha$  がその発現調節に関与していることが示唆された。また、より腫瘍組織の状態に近い三次元低酸素モデルとしての卵巣癌 CaOV3 細胞のスフェロイドを構築する系を確立し、低酸素マーカーであるピモニダゾール染色によってスフェロイド内部に低酸素領域が形成されていることが確認され、腫瘍組織の低酸素モデルなりうる

ことが示された。また、免疫蛍光染色により幹細胞因子や癌幹細胞マーカーの発現および TX-402 添加による変化を検討した。その低酸素領域内には幹細胞マーカーの発現が認められ、低酸素環境での幹細胞化の可能性が示された。さらに TX-402 が低酸素領域の細胞死を誘導し、濃度依存的にスフェロイドが縮小した。

#### 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 10 件)

1. 鈴木紀子、永澤秀子、水野智子、森重健一郎：低酸素をターゲットとした卵巣癌治療薬の展望．産科と婦人科 82(10) 1106-1111 , 2015、査読有
2. Suzuki M, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Suzuki N, Takamatsu R, Furui T, Yoshimi N, Kozawa O, Morishige K-I: Regulation by heat shock protein 22 (HSPB8) of transforming growth factor- $\alpha$ -induced ovary cancer cell migration. Archives of Biochemistry and Biophysics. 571:40-49. doi: 10.1016 /j.abb .2015.02.030., 2015、査読有
3. Isobe A, Sawada K, Kinose Y, Ohyagi-Hara C, Nakatsuka E, Makino H, Ogura T, Mizuno T, Suzuki N, Morii E, Nakamura K, Sawada I, Toda A, Hashimoto K, Mabuchi S, Ohta T, Morishige K, Kurachi H, Kimura T. Interleukin 6 receptor is an independent prognostic factor and a potential therapeutic target of ovarian cancer. Plos One Feb 6;10(2):e0118080. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0696., 2015、査読有
4. Kinose Y, Sawada K, Makino H, Ogura T, Mizuno T, Suzuki N, Fujikawa T, Morii E, Nakamura K, Sawada I, Toda A, Hashimoto K, Isobe A, Mabuchi S, Ohta T, Itai A, Morishige K-I, Kurachi H, Kimura T: IKK $\beta$  regulates VEGF expression and is a potential therapeutic target for ovarian cancer as an anti-angiogenic treatment. Mol. Cancer Ther. 14(4):909-919. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0696. , 2015、査読有
5. Nozawa-Suzuki N, Nagasawa H, Ohnishi K, Morishige K-I: The inhibitory effect of hypoxic cytotoxin on the expansion of cancer stem cells in ovarian cancer. Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC).20; 457(4):706-711. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.053., 2015、査読有
6. Mizuno T, Suzuki N, Makino H, Furui T, Morii E, Aoki H, Kunisada T, Morishige K: Cancer stem-like cells of ovarian clear cell carcinoma are enriched in the ALDH-high population associated with an accelerated scavenging system in reactive oxygen species. Gynecologic Oncology. 137(2):299-305. doi : 10. 1016 /j.ygyno. 2014.12.005. ,2015、査読有
7. Kato H, Kanematsu M, Uchiyama M, Yano R, Furui T, Morishige KI : Diffusion-weighted Imaging of Ovarian Torsion: Usefulness of Apparent Diffusion Coefficient (ADC) Values for the Detection of Hemorrhagic Infarction. Magn Reson Med Sci 13:39-44,2014, [https://www.jstage.jst.go.jp/article/mrms/13/1/13\\_2013-0039/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/mrms/13/1/13_2013-0039/_article)、査読有
8. Makino H, Kato H, Furui T, Morishige KI, Kanematsu M: Predictive Value of Diffusion-Weighted MR Imaging during Chemoradiotherapy for Uterine Cervical Cancer. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. 40 :1098-1104, doi: 10.1111/jog.12276. 2014、査読有

9. Kato H, Kanematsu M, Ono H, Yano R, Furui T, Morishige KI, Hatano Y: Ovarian fibromas: MR imaging findings with emphasis on intratumoral cyst formation. Eur J Radiol.82:e417-e421, doi: 10.1016/j.ejrad.2013.04.010, 2013、査読有
10. Ohyagi-Hara C, Sawada K, Kamiura S, Tomita Y, Isobe A, Hashimoto K, Kinose Y, Mabuchi S, Hisamatsu T, Takahashi T, Kumasawa K, Nagata S, Morishige KI, Lengyel E, Kurachi H, Kimura T: miR-92a Inhibits Peritoneal Dissemination of Ovarian Cancer Cells by Inhibiting Integrin  $\alpha 5$  Expression. Am J Pathol. 182 : 1876-1889, doi: 10.1016/j.ajpath.2013.01.039, 2013、査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 鈴木紀子、水野智子、牧野弘、竹中基記、森美奈子、古井辰郎、森重健一郎：卵巣癌幹細胞における酸化ストレス回避機構に関する検討．第 14 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会、ホテル翔峰(長野県松本市)H27.7.17-18
2. 森美奈子、竹中基記、鈴木紀子、古井辰郎、森重健一郎：子宮頸癌における CD44v8-10 の発現と役割．中日本産婦人科セミナー、ホテル森の風立山(富山県富山市)H27.7.4-5
3. 水野智子、森美奈子、牧野弘、古井辰郎、伊藤直樹、矢野光剛、伊藤公彦、西尾真、久慈志保、荒川敦志、井谷嘉男、森重健一郎：卵巣明細胞腺癌における酸化ストレス回避機構に関する検討．第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会、東京国際フォーラム(東京都千代田区) H26.4.18-20
4. 鈴木紀子、池下幸恵、形部智世、大西健、永澤秀子、森重健一郎：卵巣癌細胞スフェロイドモデルにおける低酸素領域の形成と TX-402 の効果の検討．第 13 回

日本婦人科がん分子標的研究会学術集会、皆生グランドホテル天水(鳥取県米子市)H26.3.14-15

5. 鈴木紀子：卵巣癌細胞スフェロイドモデルにおける低酸素領域の形成と TX-402 の効果の検討．第 11 回がんとハイポキシア研究会、東北大学(宮城県仙台市) H25.12.13-14

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
鈴木 紀子 (SUZUKI NORIKO)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・学術研究補佐員  
研究者番号：40642096

(2)研究分担者  
森重 健一郎 (MORISHIGE KEN-ICHIRO)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：90283788

永澤 秀子 (NAGASAWA HIDEKO)  
岐阜薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：90207994

水野 智子 (MIZUNO TOMOKO)  
岐阜大学・医学部付属病院・医員  
研究者番号：60444262

(3)連携研究者  
( )  
研究者番号：