

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462509

研究課題名(和文) がん患者の血栓症予防を目的としたMET-PAI1経路阻害による分子標的治療開発

研究課題名(英文) Development of molecular targeted therapy by the inhibition of MET-PAI-1 pathway for the prevention of thrombosis in cancer patients

研究代表者

豊島 将文 (TOYOSHIMA, Masafumi)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：70451581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん患者の血栓症予防目的に卵巣癌を対象としてMET-PAI-1経路阻害の有効性を検討した。ELISA法による血中PAI-1測定では組織型別で有意差は認めなかった。PAI-1阻害剤TM5275の添加によりES-2の増殖能低下、およびG2/M arrestを認めsiRNAでも確認した。免疫組織化学染色法にて明細胞腺癌と漿液性腺癌でPAI-1発現量に有意差を認めた。さらに卵巣明細胞腺癌の遺伝子コピー数解析を行い、凝固系に関わる事が知られている遺伝子Xのコピー数がDVT発症例で高い傾向を認めた。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of preventing thrombosis in cancer patients, we investigated the effectiveness of MET-PAI-1 pathway inhibition in ovarian cancer. No significant differences were observed between several ovarian cancer tissue types by PAI-1 measurement in the blood by the ELISA method. In in vitro experiments, the addition of the PAI-1 inhibitor TM5275 inhibited the proliferation of ovarian cancer cell line ES-2 by G2 / M arrest. In addition, these phenotypes were confirmed in PAI-1 knockdown by siRNA. There was a significant difference in PAI-1 expression level between clear cell adenocarcinoma and serous adenocarcinoma by immunohistochemical staining of ovarian cancer patients' sample. Furthermore, gene copy number analysis of ovarian clear cell adenocarcinoma was performed, and we found that the copy number of gene X, which is known to be involved in the coagulation system, was higher in DVT onset cases.

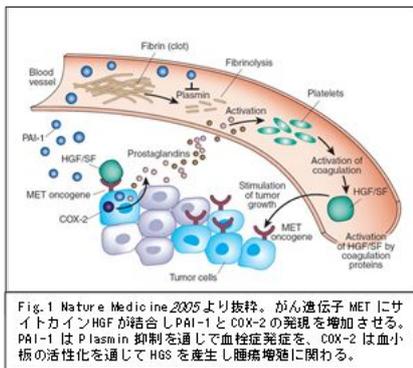
研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣明細胞腺癌 血栓症 遺伝子解析 PAI-1 c-MET 阻害剤

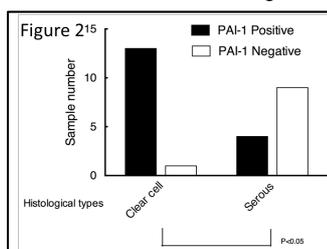
1. 研究開始当初の背景

(1) がん患者に静脈血栓症の合併が多い事は 1865 年のトルソーらの報告以降、多くの研究がなされてきた。がん患者の血液は種々の要因により過凝固状態になりやすく、またがんの種類によっても血栓症発症の頻度は異なり、最近の meta-analysis により卵巣がん(RR 7.0)は膀胱がん(RR 6.1)や肝臓がん(RR 5.6)と並んで最も血栓症の発症頻度が高い事が報告された。卵巣がんの中でも 10-20% を占める卵巣明細胞腺癌では特に血栓症の発症が高率である事が知られており、他の上皮性卵巣がんでは 6.8% に対して明細胞腺癌で 27.3% と有意に高率であった。

(2) がん患者の血液を過凝固状態とする分子機序について、近年マウスを用いた検討で c-MET の過剰発現により PAI-1 が高発現し、その PAI-1 がプラスミンによるフィブリン(血栓)溶解を阻害する事で血栓症発症の原因になるモデルが報告された (Fig.1)。



興味深い事に、最近 c-MET が卵巣明細胞腺癌で特異的に遺伝子増幅/高発現している事が相次いで報告された。一方で我々は免疫組織化学染色で卵巣明細胞腺癌で有意に PAI-1 が高発現する事を発見した (Fig.2)。



(3) 我々の共同研究者である東北大学医学系研究科の宮田敏男らが経口投与可能な低分子 PAI-1 阻害剤 TM5275 を開発し、現在は臨床試験に向けて準備中である。さらに我々は卵巣明細胞腺癌の細胞株を用いた実験で TM5275 および PAI-1 の siRNA による PAI-1 阻害が G2/M 期での arrest およびアポトーシスにより細胞増殖を抑制する事を確認した。以上のような背景から、我々は卵巣明細胞腺癌をモデル疾患として、がん患者の血液過凝固状態に MET-PAI-1 経路が関連しているかを、臨床検体を用いて解析する研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究は当初(1)-(2)を目的として開始され

たが研究の進行に伴い(3)が追加となった。

(1) 当科では毎年 10-20 例の新規卵巣明細胞腺癌の手術症例があり、本研究では手術検体と臨床情報の関連解析を後方視的に行う事を目的とする。

(2) さらに in vitro の系としては卵巣明細胞腺癌の細胞株を用いて c-MET 阻害剤/PAI-1 阻害剤を加えた際の細胞周期変化・アポトーシスの有無などを詳細に検討する。加えて卵巣がん腹膜播種マウスモデルで MET 阻害剤、PAI-1 阻害剤での治療効果の有無を検討する事を本研究期間内の達成目的とする。

(3) 卵巣明細胞腺癌の網羅的なエクソーム解析およびコピー数解析を行い、血栓症が高頻度に生じる原因を探索する。

3. 研究の方法

(1) 当科での卵巣癌手術症例は全例で術前の D-dimer 測定および高値例では下肢エコーのスクリーニングを行っている。それらの症例での患者血液での血液凝固能異常や血栓症の有無の関連を診療録より調べる。

(2) 卵巣癌手術患者の腫瘍組織内 c-MET の遺伝子増幅/高発現と PAI-1 の血中濃度を ELISA kit を用いて測定する。

(3) 卵巣明細胞腺癌より樹立した細胞株を用いて、PAI-1 阻害剤である TM5275 を加えた際の細胞増殖能の変化を ATP 測定により定量化する。さらに細胞周期の変化を FACS にて定量化し、PAI-1 阻害が細胞周期の変化に及ぼすメカニズムを検討する。

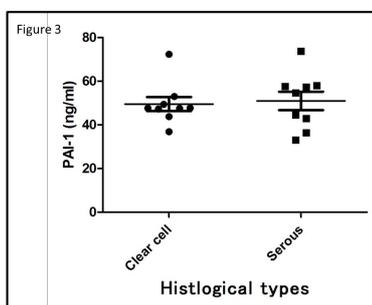
(4) 抗 PAI-1 抗体を使用した免疫組織化学染色により、卵巣癌検体での組織型別 PAI-1 発現量を検討する。

(5) 卵巣明細胞腺癌の癌部をレーザーマイクロダイセクション法で単離して、その部分の DNA を抽出、次世代シーケンサーで網羅的なエクソーム解析およびコピー数解析を行う。

4. 研究成果

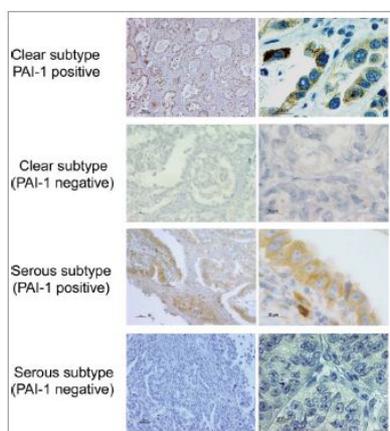
(1) 2007年から2015年に当科で手術を受けた48名の卵巣明細胞腺癌の患者のうち、17名(35.4%)に深部静脈血栓症を認めた。この48名のFIGO進行期の内訳はI期21名、II期8名、III期10名、IV期9名であり、平均年齢は55歳であった。

(2) 患者血液のELISA法によるPAI-1測定では明細胞腺癌(n=9)と漿液性腺癌(n=9)患者共に50ng/ml前後で有意差は認めなかった(Fig.3)。細胞株による検討では明細胞腺癌由来のES-2で非常に高いPAI-1の発現を認めたと、漿液性腺癌由来の細胞株では卵巣表面上皮由来の不死化細胞株(OSE2, OSE4)と同程度であった。腫瘍内c-METの遺伝子増幅に関してはFISH法にて調査したが、実験手技の問題により成果を得ることが出来なかった。



(3)PAI-1 阻害剤である TM5275 の添加により、
 卵巣癌細胞株 ES-2 の増殖能低下、および G2/M
 arrest を確認した。この作用は siRNA による
 特異的な PAI-1 ノックダウンでも見られ、非
 特異的効果ではない事を確認した。TM5275 の
 IC50 値は PAI-1 の発現量と逆相関した。
 (4)抗 PAI-1 抗体を用いた免疫化学染色を行
 い (Fig. 4)、明細胞腺癌では陽性 13 例、陰
 性 1 例、漿液性腺癌では陽性 4 例、陰性 9 例
 と組織型別に PAI-1 発現量に有意差を認めた。

Fig.4



(5)48 症例の卵巣明細胞腺癌の癌部のエクソ
 ームシークエンスを行ったが、深部静脈血栓
 症 (DVT) の有無で有意な遺伝子変異は認めな
 かった。しかし凝固系に関わる事が知られて
 いる遺伝子 X (論文投稿中のため遺伝子名は
 匿名) のコピー数が、DVT 発症例で高い傾向
 を認めた。さらに遺伝子 X の免疫染色でコピ
 ー数増加とタンパク質発現量の相関を確認
 した。遺伝子 X は PAI-1 の発現量を制御する
 事が知られており、現在は詳細なメカニズム
 を検討中である。

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 11 件)

Shibuya Y, Toyoshima M* (*corresponding
 author), Yaegashi N
 ASGO 4th International Workshop on
 Gynecologic Oncology, 査読なし J Gynecol
 Oncol 2017 Mar;28(2):e24
 DOI: 10.3802/jgo.2017.28.e24

Fujimine-Sato A, Toyoshima M*
 (*corresponding author), Shigeta S, Toki

A, Kuno T, Sato I, Watanabe M, Niikura H,
 Yaegashi N

A case of eccrine porocarcinoma of the
 vulva: case report and review of the
 literature, 査読あり Journal of Medical
 Case Reports 2016 10:319
 DOI: 10.1186/s13256-016-1106-1

Toyoshima M* (*corresponding author),
 Tsuji K, Shigeta S, Tokunaga H, Ito K,
 Watanabe Y, Yoshinaga K, Otsuki T, Niikura
 H, Yaegashi N
 Leptomeningeal metastasis from
 gynecologic cancers diagnosed by brain MRI,
 査読あり Clinical Imaging 2017 41, 42-47
 DOI: 10.1016/j.clinimag.2016.09.013

Nishimoto M, Toyoshima M*
 (*corresponding author), Shiga N,
 Utsunomiya H, Tsuji K, Suzuki F, Nagase S,
 Suzuki T, Sasano H, Ito K, Yaegashi N
 Steroid Sulfatase Inhibitor Reduces
 Proliferation of Ishikawa Endometrial
 Cancer Cells in Co-Culture Systems, 査読
 あり OJEMD 2016 6, 193-204
 DOI: 10.4236/ojemd.2016.69025

Toyoshima M* (*corresponding author),
 Momono Y, Makino H, Kudo T, Oka N, Sakurada
 J, Suzuki H, Kodama H, Yoshinaga K
 Cytokeratin 7-positive/cytokeratin
 20-negative cecal adenocarcinoma
 metastatic to the uterine cervix: a case
 report, 査読あり World Journal of
 Surgical Oncology 2016 14:22
 DOI:10.1186/s12957-016-0774-z

Shigeta S, Toyoshima M* (*corresponding
 author), Ishibashi M, Usui T, Kitatani K*,
 Yaegashi N Transferrin facilitates the
 formation of DNA double-strand breaks via
 transferrin receptor 1: the possible
 involvement of transferrin in
 carcinogenesis of high-grade serous
 ovarian cancer, 査読あり Oncogene 2015,
 Nov 9 DOI:10.1038/onc.2015.425

Kitatani K, Usui T, Sriraman S,
Toyoshima M, Ishibashi M, Shigeta S,
 Nagase S, Sakamoto M, Hannun Y, Torchilin
 V, Okazaki T, Ogiso H, Yaegashi N
 Ceramide limits
 phosphatidylinositol-3-kinase
 C2 -controlled cell motility in ovarian
 cancer: potential of ceramide as a
 metastasis-suppressor lipid, 査読あり
 Oncogene 2015, Sep 14
 DOI:10.1038/onc.2015.330

Toyoshima M* (*corresponding author),

Kudo T, Igeta S, Makino H, Momono Y, Shima T, Matsuura R, Ishigaki N, Akagi K, Takeyama Y, Iwashashi H, Rikimaru H, Sato A, Yoshinaga K
Spontaneous retroperitoneal hemorrhage caused by rupture of an ovarian artery aneurysm: a case report and review of the literature, 査読あり Journal of Medical Case Reports 2015 9:84 April
DOI:10.1186/s13256-015-0553-4

Toyoshima M* (*corresponding author), Iwashashi H, Shima T, Hayasaka A, Kudo T, Makino H, Igeta S, Matsuura R, Ishigaki N, Akagi K, Sakurada J, Suzuki H, Yoshinaga K
Solitary uterine metastasis of invasive lobular carcinoma after adjuvant endocrine therapy: a case report, 査読あり Journal of Medical Case Reports 2015 9:47 DOI:10.1186/s13256-014-0511-6

Mashiko S, Kitatani K*, Toyoshima M* (*corresponding 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, 査読あり Cancer Biology & Therapy 2015 16(2), 1-8
DOI:10.1080/15384047.2014.1001271.

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 Prospective Cohort Study in a Tohoku Gynecologic Cancer Unit, 査読あり International Journal of Clinical Oncology 2014 14-Nov
DOI:10.1007/s10147-014-0763-6

〔学会発表〕(計 25 件)

北谷和之、張雪薇、臼井利典、豊島将文、重田昌吾、石橋ますみ、湊純子、小木曾英夫、岡崎俊朗、八重樫伸生
卵巣がん転移制御へのセラミド合成酵素 2 の関与
第5回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会 2017/2/25 大阪医科大学(大阪府高槻市)

張雪薇、北谷和之、豊島将文、石橋ますみ、臼井利典、湊純子、重田昌吾、Mark Kester、八重樫伸生
卵巣がんに対するセラミドナノリポソーム

製剤の抗腫瘍作用
第5回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会 2017/2/25 大阪医科大学(大阪府高槻市)

湊純子、豊島将文、北谷和之、重田昌吾、石橋ますみ、八重樫伸生
卵巣癌における c-Mycと合成致死作用を持つ治療標的分子の探索
第5回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会 2017/2/25 大阪医科大学(大阪府高槻市)

佐藤いずみ、岡本聡、新倉仁、重田昌吾、橋本千明、辻圭太、徳永英樹、豊島将文、三浦弘守、渡部みか、八重樫伸生
子宮体癌のセンチネルリンパ節生検における捺印細胞診の診断精度についての検討
日本臨床細胞学会秋期大会 2016/11/18-19 別府国際コンベンションセンター(大分県別府市)

徳永英樹、岡本聡、渡部洋、重田昌吾、辻圭太、海法道子、豊島将文、新倉仁、八重樫伸生
フローサイトメトリーを利用した腹水細胞診断法のパイロットスタディ
日本臨床細胞学会秋期大会 2016/11/18-19 別府国際コンベンションセンター(大分県別府市)

豊島将文、新倉仁、藤峯絢子、土岐麻実、石橋ますみ、工藤敬、大山喜子、久野貴司、徳永英樹、八重樫伸生
外陰癌手術創部に対する皮膚表面接着剤の有用性について
第39回日本産婦人科手術学会
2016/11/12-13 仙台国際センター(宮城県仙台市)

張雪薇、北谷和之、豊島将文、石橋ますみ、臼井利典、湊純子、重田昌吾、Mark Kester、八重樫伸生
セラミドナノリポソーム製剤によるネクロプトシスの誘導
セラミド研究会学術集会 2016/10/27-28 東京ユビキタス協創広場CANVAS(東京都中央区)

張雪薇、豊島将文、石橋ますみ、臼井利典、湊純子、重田昌吾、Mark Kester、北谷和之、八重樫伸生
セラミドナノリポソームはネクロプトーシスを誘導する薬剤である
第89回日本生化学会 2016/9/25-27 仙台国際センター(宮城県仙台市)

Ishibashi M, Toyoshima M, Zhang X, Minato J, Shigeta S, Kitatani K, Yaegashi N

Involvement of the receptor tyrosine kinase TIE-1 in the platinum-resistance of ovarian cancer cells
Marsha Rivkin the 11th Ovarian Cancer Research Symposium 2016/9/12-13
Seattle University (Seattle, USA)

張雪薇、北谷和之、石橋ますみ、湊純子、豊島将文、八重樫伸生
セラミドナノリポソームによる新しい細胞死ネクロプトーシス
第15回日本婦人がん分子標的研究会
2016/8/19-20 ホテルニューオータニ札幌 (北海道札幌市)

北谷和之、張雪薇、臼井利典、豊島将文、重田昌吾、Mahy Egiz、湊純子、石橋ますみ、小木曾英夫、岡崎俊朗、八重樫伸生
セラミド合成酵素による癌転移制御
第58回日本脂質生化学会 2016/6/9-10 にぎわい交流館AU (秋田県秋田市)

張雪薇、豊島将文、石橋ますみ、臼井利典、湊純子、重田昌吾、Mark Kester、北谷和之、八重樫伸生
卵巣がん細胞に対するセラミド卵巣がん細胞に対するセラミドナノリポソームの抗腫瘍効果-ネクロプトーシスの誘導-
第58回日本脂質生化学会 2016/6/9-10 にぎわい交流館AU (秋田県秋田市)

佐藤いずみ、岡本聡、新倉仁、橋本千明、徳永英樹、豊島将文、三浦弘守、渡部みか、渡部洋、八重樫伸生
子宮頸癌のセンチネルリンパ節生検における捺印細胞診の診断精度についての検討
第57回日本臨床細胞学会総会
2016/5/28-29 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Shigeta S, Toyoshima M, Kitatani K, Ishibashi M, Minato J, Yaegashi N
Transferrin is involved in the carcinogenesis of high-grade serous ovarian cancer by facilitating the DNA double-strand breaks via transferrin receptor 1 in fallopian tube.
第68回日本産科婦人科学会学術総会
2016/4/21 東京国際フォーラム (東京都)

Toyoshima M, Kitatani K, Shigeta S, Ishibashi M, Minato J, Yaegashi N
Casein kinase I epsilon is a novel molecular target for c-Myc driven ovarian cancers
第68回日本産科婦人科学会学術総会
2016/4/21 東京国際フォーラム (東京都)

Minato J, Toyoshima M, Kitatani K, Shigeta S, Ishibashi M, Yaegashi N

Furin, a pro-protein convertase, is a novel molecular target for c-Myc-driven ovarian cancers
The 13th International Congress of Human Genetics 2016/4/3-7 Kyoto International Conference Center (京都府)

Shigeta S, Toyoshima M, Kitatani K, Ishibashi M, Usui T, Minato J, Yaegashi N
Transferrin in follicular fluid can facilitate DNA double-strand breaks to fallopian tube epithelium: possible involvement of transferrin in the carcinogenesis of high-grade serous ovarian cancer.
Society for Reproductive Investigation 63th scientific annual meeting
2016/3/16-19 Montreal, Canada

北谷和之、張雪薇、臼井利典、豊島将文、重田昌吾、石橋ますみ、湊純子、小木曾英夫、岡崎俊朗、八重樫伸生
卵巣がん転移に関わるセラミド生成代謝酵素
第4回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会 2016/2/27 岐阜大学サテライトキャンパス (岐阜市)

石橋ますみ、豊島将文、Mahy Egiz、張雪薇、湊純子、重田昌吾、北谷和之、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4回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会 2016/2/27 岐阜大学サテライトキャンパス (岐阜市)

Shigeta S, Toyoshima M, Kitatani K, Minato J, Ishibashi M, Usui T, Yaegashi N
Transferrin facilitates the formation of DNA-double strand breaks via Transferrin receptor 1 in fallopian tube epithelial cells.
AACR special conference
Advance in Ovarian Cancer Research
2015/10/17-20 Orland, USA

①湊純子、豊島将文、北谷和之、重田昌吾、石橋ますみ、臼井利典、八重樫伸生
卵巣癌における c-myc と合成致死作用を持つ治療標的分子の探索
第14回日本婦人科がん分子標的研究会
2015/7/18 美ヶ原温泉ホテル翔峰 (長野県松本市)

②重田昌吾・豊島将文・北谷和之・石橋ますみ・八重樫伸生
月経血や卵胞液に含まれるトランスフェリンは 型トランスフェリン受容体を介して

卵管上皮細胞における DNA 二重鎖切断を誘導・増幅する
第 66 回日本産科婦人科学会学術総会
2015/4/10 パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

②Shigeta 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.
Hilton, San Francisco, Society for
Reproductive Investigation 62th
scientific annual meeting, 口演 San
Francisco, USA 2015/3/25-28

④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、口演、九州大学医学部百年記念講堂（福
岡市）2015/2/21

⑤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、口演、東京慈
恵医大（東京）2014/7/4

〔図書〕（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ob-gy.med.tohoku.ac.jp/laboratory/category01/m-toyoshima.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊島 将文 (TOYOSHIMA, Masafumi)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：70451581

(2) 研究分担者

北谷 和之 (KITATANI, Kazuyuki)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機
構・助教

研究者番号：40539235