

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462517

研究課題名(和文)細胞内プラチナ濃度を制御するhCTR1とATP7Bに着眼した難治性卵巣癌治療戦略

研究課題名(英文)The new strategies for treatment of ovarian cancer with platinum-resistance which pay its attention to platinum concentration in cell

研究代表者

黒川 哲司(KUROKAWA, Tetsuji)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号：60334835

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)：卵巣癌は、予後不良の婦人科悪性腫瘍の一つである。その予後改善の一つの方法は、抗がん剤であるプラチナ製剤に対する耐性卵巣癌の治療方針である。そこで本研究の目的は、細胞内プラチナ濃度を制御するhCtr-1(human Copper transporter-1)に着眼した、卵巣がんにおけるシスプラチン(抗がん剤)耐性機序の解明とその改善である。

hCtr-1の蛋白発現が、上皮性卵巣癌のプラチナ製剤の感受性や臨床的病理学的予後因子に相関する可能性が示唆された。今後、抵抗性株のhCTR-1発現を誘導し、抵抗性卵巣癌を感受性卵巣癌に変換することを培養細胞と動物モデルを使い試みる予定である。

研究成果の概要(英文)：[Introduction] The objective of our research is to make clear the mechanism of platinum-resistance in ovarian cancer. Many researchers have reported lots of mechanism about platinum-resistance. We focus on the pharmacological resistance. Pharmacological resistance is to inhibit that drug put into the cell and adduct the DNA. Especially, we researched the function of human Copper transporter-1/human copper transporter-1 (hCtr-1). hCTR1 protein is the influx transporter. The function of this transporter makes platinum-drug put into the cell. [Result] There is no difference of hCTR1 expression between short PFS and long PFS. One of the resistant mechanism in mucinous adenocarcinoma or clear cell carcinoma may be low expression of hCTR1. [Conclusion] Our study suggests the possibility that expression of hCTR1 in ovarian carcinomas is clinically correlated with histological type. These results may be useful to overcome the platinum-resistance in ovarian carcinoma.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：Ovarian cancer Cisplatin hCtr-1

### 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は、婦人科癌の中で最も予後不良な癌である。その予後改善には、抗癌剤の key drug であるプラチナ (以後、Pt と略す) 製抗癌剤に対し抵抗性を持つ Pt 抵抗性卵巣癌に対する治療法の開発が、必要不可欠である。Pt 製抗癌剤に対する抵抗能獲得機序は、大きく2つに分けて考えられている。一つは、Pt が細胞内に取り込まれて、核内に入り DNA と架橋を形成するのが阻害される機序 (薬理的機序の障害) と、DNA に架橋を形成したのち、種々の分子生物学的機序により癌細胞をアポトーシスに誘導する部分の障害 (分子生物学的機序の障害) である。後者に関しては、現在まで、多くの研究者が、多くの Pt 抵抗性の機序を報告している。一方、Pt 製抗癌剤の薬理的機序の障害に関する知見は少なく、その為、細胞内 Pt 濃度に着眼した新たな Pt 抵抗性卵巣癌治療法の開発はなされていない。

### 2. 研究の目的

細胞内 Pt 濃度を制御する hCtr-1 (human Copper transporter-1) に着眼した、卵巣癌におけるシスプラチン (以後、CisPt と略す) 耐性機序の解明とその改善である。

### 3. 研究の方法

(1) in vitro の実験では、A2780 (CisPt 感受性卵巣癌細胞株) と 2780CP (CisPt 耐性株) を使い、CisPt に対する感受性は IC<sub>50</sub> で評価した。

(2) in vivo の実験では、卵巣癌患者から抽出された組織の抗 hCtr-1 抗体の免疫染色により行われた。

### 4. 研究成果

(1) hCtr-1 の阻害剤が CisPt の殺細胞効果を抑制するかを検討した。

A2780 (CisPt 感受性卵巣癌細胞株) を使い hCtr-1 の阻害剤による IC<sub>50</sub> 阻害濃度を比較した。結果は、以下の様に、50% の癌細胞を殺す CisPt 濃度が、阻害剤を投与すること

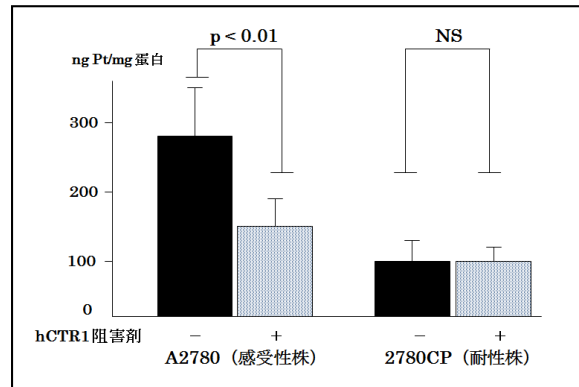
より、高値となった。

CisPt IC<sub>50</sub> 0.14 ± 0.015 uM

CisPt+hCtr 阻害剤 IC<sub>50</sub> 0.24 ± 0.022 uM

これは、hCtr-1 が、CisPt の殺細胞効果に影響を与えることが示唆された。

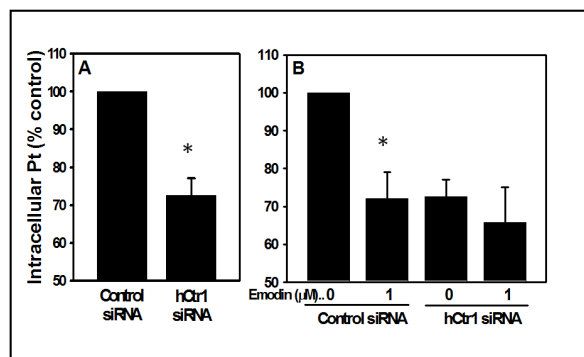
(2) CisPt 感受性株と CisPt 耐性株の hCtr-1 の阻害剤に対する細胞内の Pt 濃度の違いを確認



A2780 (CisPt 感受性株) では hCtr-1 阻害剤で細胞内 Pt 濃度は低下するが、2780CP (CisPt 耐性株) では hCtr-1 阻害剤では細胞内 Pt 濃度に変化がなかった。これは、耐性機序の一つとして hCtr-1 の機能低下が考えられる結果である。

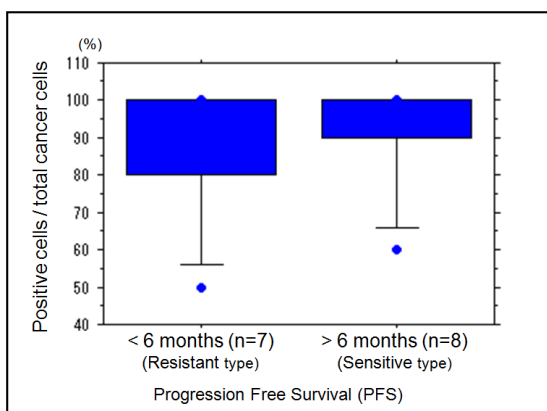
しかし、IC<sub>50</sub> の低下に差が見られるまでに至らなかった。今後、培養時間や細胞株と CisPt の接触時間を変化させ検討する予定である。

(3) hCtr-1 siRNA を使い hCtr-1 を knock-down させることにより、細胞内 Pt 濃度の低下は証明してきた。そこで、IC<sub>50</sub> の変化かを検討した。



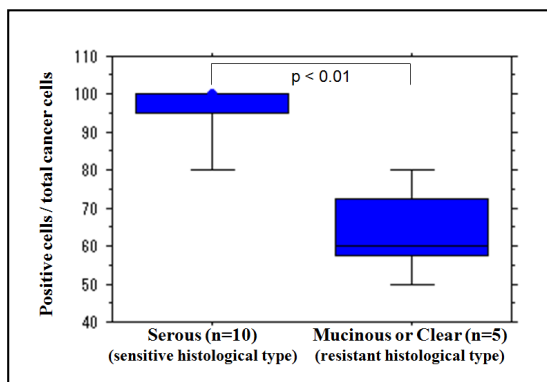
これまでの hCtr-1 siRNA を使用した研究から細胞内 Pt 濃度を低下させることを報告した。しかし、IC<sub>50</sub> に変化を起こすまでに至らなかった。その原因は、2780CP (CisPt 耐性株) の耐性機序の 1 つが hCtr-1 機能の低下であるが、その他にも複数の機序が存在するからではないかと考えている。その為、次に、in vivo の卵巣癌において、hCtr-1 蛋白発現と Pt 製抗癌剤の反応を検討した。

(4) 患者から摘出した卵巣癌組織に、抗 hCtr-1 抗体を用いた免疫組織学的技法により、hCtr-1 蛋白発現と Pt 製抗癌剤に対する反応を検討した。



結果は、臨床で規定されている Pt 耐性卵巣癌と Pt 感受性卵巣癌と hCtr-1 蛋白発現に相関は認めなかった。この結果は、in vitro のデータと一致しており、Pt 耐性卵巣癌は、複数の耐性機序を合わせ持っている可能性が考えられた。

(5) hCtr-1 蛋白発現と卵巣癌の予後因子との相関について検討した。



結果は、hCtr-1 の蛋白発現が、組織型と相関を認めた。このように Pt 製抗癌剤の感受性や臨床的病理学的予後因子に相関する可能性を示唆した。

#### 引用文献

Kurokawa T et al. Cancer Chemotherapy Pharmacology 2010

Siddik et al. Oncogen

#### 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 2 件)

岩崎和美, 黒川哲司, 品川明子, 森正樹, 酒井康弘, 今村好章, 吉田好雄, 液体検体法を導入した子宮内膜細胞診が有効であった未分化子宮肉腫の 1 例、日本臨床細胞学会雑誌、査読有、56(1):33-8、2017.3

<http://doi.org/10.5795/jjsc.56.33>

D.Inoue, M.Yamamoto, G.Sugita, T.Kurokawa, Y.Yoshida, Debulking surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the management of a recurrent aggressive uterine myxoid leiomyosarcoma with peritoneal dissemination, Gynecol Oncol Rep、査読有、13:60-3、2015.7  
DOI: 10.1016/j.gore.2015.06.010.

[学会発表](計 13 件)

黒川哲司、福井県の子宮頸がん検診に HPV 検査を導入し感度は向上するのか、第 54 回日本がん治療学会学術集会(ワークショップ)、2016.10.20-22、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

黒川哲司、子宮頸がん検診 福井県にお

ける HPV 併用検診導入の中間報告、第 1 回日本 HPV 研究会・学術集会、2016.10.19、TKP 横浜駅西口カンファレンスセンター（神奈川県横浜市）

黒川哲司、子宮内膜細胞診の診断精度向上への取り組み - 液状化検体法と免疫染色法導入の試み -、第 33 回日本臨床細胞学会北陸連合会学術集会、2016.9.3、黒部国際文化センター（富山県黒部市）

黒川哲司、日本における HPV16/18 型個別検出の有用性 - 福井県における併用検診導入への取り組み -、第 58 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会（招待講演）2016.7.8-10、米子コンベンションセンター（鳥取県米子市）

品川明子、黒川哲司、杉田元気、山本真、知野陽子、吉田好雄、HPV 感染細胞を可視化する新規コルポスコピーの開発、第 58 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会、2016.7.8-10、米子コンベンションセンター（鳥取県米子市）

T.Kurokawa, A.Shinagawa, Y.Chino, Y.Yoshida, The Assessment of cervical cancer screening using the combination of cervical cytology and high-risk human papillomavirus testing in fukui prefecture, Japan, The 19<sup>th</sup> International Congress of Cytology, 2016.5.28-6.1、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

黒川哲司、品川明子、山本真、大沼利通、知野陽子、吉田好雄、子宮内膜細胞診の診断精度向上への取り組み - 液状化検体法と免疫染色法導入の試み -、第 57 回日本臨床細胞学会総会春期大会（シンポジ

ウム）2016.5.28-29、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

品川明子、黒川哲司、知野陽子、吉田好雄、岩崎和美、森正樹、今村好章、子宮内膜細胞診偽陽性症例の検討 - 記述式報告様式に基づいた診断への試み -、第 57 回日本臨床細胞学会総会（春期大会）、2016.5.28-29、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

黒川哲司、品川明子、知野陽子、吉田好雄、福井県の子宮頸がん検診に細胞診と HPV 検査の同時併用法を導入した第一報 - 細胞診陰性で HPV 検査陽性者に着眼した取り組み -、第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会、2016.4.21-24、東京国際フォーラム（東京都千代田区）

品川明子、黒川哲司、杉田元気、山本真、知野陽子、吉田好雄、子宮内膜細胞診偽陽性症例の検討、第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会、2016.4.21-24、東京国際フォーラム（東京都千代田区）

黒川哲司、知野陽子、品川明子、吉田好雄、子宮頸がんにおいて臨床活用が期待される細胞機能について、第 56 回日本臨床細胞学会総会春期大会（招請講演）2015.6.13-14、くにびきメッセ・松江テルサ（島根県松江市）

坂野陽通、山田しず佳、杉田元気、山本真、玉村千代、高橋仁、品川明子、知野陽子、福田真、西島浩二、折坂誠、黒川哲司、吉田好雄、紡錘形細胞で構成された壁在結節を伴う粘液性卵巣癌、第 6 回 EGOG meeting、2015.5.16、ホテルハイマート上越（新潟県上越市）

黒川哲司, 品川明子, 知野陽子, 折坂誠,  
吉田好雄、プラチナ抵抗性卵巢癌患者に  
おける Human copper transporter1 蛋白  
発現の検討、第 66 回日本産科婦人科学会  
学術講演会、2014.4.18-20、東京国際フ  
ォーラム (東京都千代田区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒川 哲司 (KUROKAWA, Tetsuji)  
福井大学・学術研究院医学系部門・准教授  
研究者番号: 60334835

### (2) 研究分担者

吉田 好雄 (YOSHIDA, Yoshio)  
福井大学・学術研究院医学系部門・教授  
研究者番号: 60220688

品川 明子 (SINAGAWA, Akiko)  
福井大学・学術研究院医学系部門・助教  
研究者番号: 90444223

知野 陽子 (CHINO, Yoko)  
福井大学・学術研究院医学系部門 (附属病  
院部)・特命助教  
研究者番号: 40436845