

令和元年6月6日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11157

研究課題名(和文) 明細胞腺癌におけるHIF-1の非機能化と副作用軽減を目的とした新規抗腫瘍薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel antitumor agents to defunctionalize of HIF-1 and reduce of side effects in ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

宮澤 昌樹 (MIYAZAWA, Masaki)

東海大学・医学部・客員講師

研究者番号：30624572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、難治性卵巣癌である卵巣明細胞癌における、HIF-1の非機能化を通じた新規抗腫瘍薬の開発を目的に検討を行ってきた。その中でキク科のマリアアザミの抽出物であるSilibinin(SLB)に着目し検討したところ、SLBにより癌原遺伝子であるEIF4EおよびRPS6が大きく減少しており、SLBがHIF-1のタンパクの合成を抑制させることによりHIF-1を非機能化していることが明らかとなった。併せて、SLBはアポトーシスによる細胞死を誘導させていることから、今後さらにHIF-1の非機能化を通じた治療法の開発としてSLBによる休眠療法による難治性明細胞癌のQOL改善を目指していきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回着目したHIF-1の非機能化させたSilibinin(SLB)は既に、ドイツにおいてレガロンと呼ばれる肝機能障害の治療薬として長年使用されてきたこと、さらに重篤な副作用が認められないことから、本薬剤の抗腫瘍効果が明らかになったことで、より患者のQOL改善に寄与できるものと思われた。またSLBは肝機能障害の抑制の観点から、既存の抗癌剤との組み合わせによる副作用を軽減させることも期待できる。また経口剤での内服が可能であることから、入院治療せず在宅での治療も可能であり、この点からもQOLの改善ができることから、今後臨床応用を視野にさらに十分な検討を重ねていきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We have been studying for the development of novel antitumor agents through the defunctionalization of HIF-1 in ovarian clear cell carcinoma, which is a kind of refractory ovarian cancer. Among them, we focused on Silibinin(SLB), which is an extract of the milk thistle of the family Asteraceae. We showed that SLB administration significantly reduces the proto-oncogenes EIF4E and RPS6 RNA in some clear cell carcinoma cell lines. To sum up, SLB defunctionalizes HIF-1 by suppressing HIF-1 protein synthesis.

研究分野：婦人科腫瘍学・婦人科病理学

キーワード：卵巣明細胞癌 HIF-1 Silibinin

1. 研究開始当初の背景

一般的に悪性腫瘍は、無秩序な増殖能を有することで自らをより低酸素な環境へと導き、これに順応するために複雑な分子機構を発動しながら微小環境の恒常性を維持し、浸潤、転移性に進展していくものと考えられている。低酸素環境下で機能する分子には多くの腫瘍において共通性がある一方で、しばしば様々なシグナル伝達因子やホルモンの影響を受け、その微小環境に即した個々の因子の発現が調節されていることが推察される。また、腫瘍の発生機序を鑑みると同様の部位(発生母地)から発生をしながら、実際に病理学的には組織型や組織構築が異なっている。これは、その発生に関与する様々な素因(遺伝子変異、ウイルス感染など)を通じ発生し、構築された腫瘍が、さらに様々な微小環境形成因子の発現によって形づけられ、個々の組織型を構築しているものと考えられる。悪性腫瘍の微小環境は血中の酸素やグルコースの濃度、pH などにより特徴づけられており、腫瘍細胞の活発な増殖が微細な新生血管を惹起するものの、形成される血管が未熟かつ無秩序な形成をすることで、しばしば腫瘍には酸素不十分な虚血領域が生じる。その結果として、悪性度の高い腫瘍では広範に出血や壊死(necrosis)を来たしやすいものと考えられる。

腫瘍の微小環境を維持するための中心的分子、さらに微小環境研究における中心的因子としては 1992 年に Semenza らによって発見された「低酸素誘導因子 Hypoxia-Inducible Factor-1(HIF-1)」があまりにも有名である(Mol Cell Biol. 12: 5447-54, 1992)。これまでに HIF-1 はその名のとおり、細胞の低酸素環境に応じて、血管新生因子である Vascular Endothelial Growth factor (VEGF) やグルコースの能動輸送に関わる Glucose Transporter-1 (GLUT-1)、あるいは赤血球増生を促す Erythropoietin (EPO)などを誘導し個々の微小環境への適応を図っていることが報告されている。ここ 10 年ほどで「低酸素分子生物学」が急速に発展し、VEGF、GLUT-1、EPOなどを筆頭に数千種類の遺伝子が HIF-1 によって影響、惹起されることが報告されてきている(Nat Rev Cancer. 3: 721-32, 2003)。これらの遺伝子は、プロモーター、エンハンサー領域に HIF-1 結合配列 Hypoxia Responsive Elements(HREs)を持っており、HIF-1 が Histone Deacetylase 7 (HDAC7)・p300/CBP とユニットを形成し HREs に結合し転写を促している。HIF-1 は HIF-1 α ・HIF-1 β から構成され、HIF-1 β は恒常的に核内に発現している。HIF-1 α は酸素依存性に細胞質に発現しており、通常の酸素濃度下では、E3 ユビキチンリガーゼが von Hippel Lindau タンパク(pVHL)を介して結合することでユビキチン化が起こり、プロテアソームにより速やかに分解される。しかし一転して低酸素に陥ると、この分解経路が停止して細胞質に HIF-1 の蓄積が生じ、速やかに核へ移行し、HIF-1 β と結合することで HIF-1 を形成し種々の遺伝子誘導に働く。

我々はこれまでに、上皮性卵巣癌において HIF-1 α の発現は細胞質では概ね認められるものの、核における発現は他の組織型に比して明細胞癌で有意に亢進していること、さらに活性化型 HIF-1 は上皮性卵巣癌において、腫瘍径や腫瘍の大きさには相関せず、明細胞癌で有意に活性化していることも報告してきている。また、明細胞癌における HIF-1 α の制御機構について検討したところ、明細胞癌では、PI3K- Akt-mTOR シグナル系が亢進しており、mTORC1 のリン酸化は、HIF-1 α mRNA の翻訳を通じ、HIF-1 α の発現を亢進させていることも明らかにしている。

さらにこれらの結果から、明細胞癌における mTORC1 のリン酸化の阻害を通じた HIF-1 α の制御に主眼を置き、検討を行ってきた。その結果、明細胞癌培養株において mTORC1 阻害剤 Rapamycin は HIF-1 α ならびに VEGF を濃度依存的に抑制した。また、Rapamycin の誘導体である Everolimus を用いたところ、明細胞癌で、mTORC1 の阻害を通じた HIF-1 シグナルの抑制のみならず、細胞周期を有意に停止させ、in vitro、in vivo において高い抗腫瘍効果を示した。さらに治療への応用として明細胞癌においては Everolimus とプラチナ系抗癌剤の併用が最も高い抗腫瘍効果を得ることを証明した⁽¹⁾。一方で、予後因子としての解析から、HIF-1 α の核陽性所見と mTORC1 のリン酸化が著明な症例は予後不良であることも報告している。これらの結果は、Japanese Gynecologic Oncology Group (JGOG:日本婦人科悪性腫瘍機構)でも、明細胞癌の新規治療法として高い評価を受け、JGOG3021 試験(EVEROCC Trial)として『再発・再燃卵巣明細胞癌に対する mTOR 阻害剤の第 II 相臨床試験』を計画し、申請者も TR 部門委員として、これまでの経験をもとに mTOR 阻害剤の有効なバイオマーカーの探索などに尽力してきたが、残念ながら諸般の事情で現在試験は中止となっている。

2. 研究の目的

我々は、これまでに本邦にて発生率が高く予後不良な卵巣明細胞癌において腫瘍の微小環境を制御するマスター因子である低酸素誘導因子 Hypoxia Inducible Factor-1(HIF-1)が高発現かつ高活性化をしていることを報告してきていることから、HIF-1 の阻害を通じた、腫瘍選択的な HIF-1 活性化抑制剤の開発を目指す。一方で、HIF-1 は、腫瘍増殖のみならず生体の恒常性維持にも関わる重要な因子であることから、これまでに開発された薬剤は有害事象が多く、臨床応用できず、エフェクター因子をターゲットとしたシグナル伝達系阻害薬などが検討されたきた。そこで、有害事象をより少ない形で HIF-1 を抑制させることは本因子重要性を鑑みると非常に重要である。近年、肝機能障害の治療薬でもある Silibinin(SLB)に HIF-1 を抑制させることが報告されてきており、卵巣癌における効果について興味もたれた。そこで本研究では癌の微小環境即ち HIF-1 をターゲットとしたより有害事象の少ない薬剤の開発を目的としている。

これまでに HIF-1 活性化阻害剤としての抗腫瘍薬剤候補の検討において、興味深いことにキク科のマリアアザミ(ミルクシスル)に含まれるシリピニンに、HIF-1 の活性を抑制し下流のエフ

エクター因子の抑制をできることが明らかになった。さらにシリピニン[®]は PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達系をも阻害するなど、複数の機序で癌細胞のワールブルグ効果を発揮すると報告されている(Oncogene. 28: 313-24, 2009)。さらにシリピニンは、既にドイツにおいて30年前から『レガロン』と呼ばれる肝炎や肝硬変の治療薬として使用されてきており、安全性が担保されている。

3. 研究の方法

各種上皮性卵巣癌株5種を用いて明細胞癌においてSLBのHIF-1抑制機構の解明ならびにその効果について下記の分子生物学的手法を用いて検討した。

- ・LDH測定によるSLBの細胞障害性試験
- ・MTS assayによる細胞生存性試験
- ・DNAマイクロアレイを用いたSLBによるHIF-1関連遺伝子の動態変化の解析
- ・SLBによるHIF-1 α タンパクの発現変化の解析

4. 研究成果

【結果】

- ・細胞障害性試験を行ったところ、卵巣癌細胞株ではいずれもLDH放出量はコントロール群に比して、1割程度であったことから、SLBの細胞障害性は少なかった。
- ・MTS Assayを行ったところ、SLBを100~200 μ M投与することで細胞の生存率が大幅に減少することを認めた。
- ・DNAマイクロアレイの結果から、SLBがHIF-1のエフェクター因子に与える影響を解析したところ、mTOR pathwayにおいてHIF-1 α mRNAの翻訳を促進するEIF4EとRPS6で大幅な減少を認めた。
- ・SLB投与後4時間で有意にHIF-1 α タンパクの発現抑制を認めた。

【考察】

SLBによりEIF4EおよびRPS6が大きく減少していたことから、SLBはHIF-1 α の遺伝子レベルではなく、タンパクの合成を抑制させることが強く示唆された。既に、EIF4Eは癌原遺伝子として腫瘍の形成に関連していることが報告されてきており、SLBはこれらの因子によりHIF-1をコントロールできることが推察された。また、今回の検討の中でSLBは、HIF-1 α を過剰発現させていても強く抑制できることが確認できたことから、SLBがHIF-1の抑制に非常に効果的であることが示唆された。SLBはアポトーシスによる細胞死を誘導することが既に報告されており、SLBによるアポトーシスの誘導も抗腫瘍効果の一部であることも考えられた。卵巣明細胞癌ではARID1Aの変異が他の組織型に比して、高確率で見られること癌化を抑制する機構が欠失していることが予後不良の一因と考えられてきたが、SLB投与によるARID1A変異株でもその有効性が認められたことからARID1A変異患者での有効性も期待できた。今後さらにHIF-1の非機能化を通じた治療法の開発としてSLBなどのフラボノイド系による休眠療法の実現を通じた、QOL改善を目指していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

Yano M, Katoh T, Miyazawa M, Miyazawa M, Ogane N, Miwa M, Hasegawa K, Narahara H, Yasuda M. Clinicopathological correlation of ARID1A status with HDAC6 and its related factors in ovarian clear cell carcinoma. Sci Rep. Vol.9, 2019, in press, [査読有](#)

Yano M, Ito K, Yabuno A, Ogane N, Katoh T, Miyazawa M, Miyazawa M, Hasegawa K, Narahara H, Yasuda M. Impact of TP53 immunohistochemistry on the histological grading system for endometrial endometrioid carcinoma. Mod Pathol. 2019, in press. [査読有](#)

Yano M, Yasuda M, Sakaki M, Nagata K, Fujino T, Arai E, Hasebe T, Miyazawa M, Miyazawa M, Ogane N, Hasegawa K, Narahara H. Association of histone deacetylase expression with histology and prognosis of ovarian cancer. Oncol Lett. Vol.15, 3524-3531, 2018, [査読有](#)

Matsuo K, Tanabe K, Ikeda M, Shibata T, Kajiwara H, Miyazawa M, Miyazawa M, Hayashi M, Shida M, Hirasawa T, Roman LD, Mikami M. Fully sialylated alpha-chain of complement 4-binding protein (A2160): a novel prognostic marker for epithelial ovarian carcinoma. Arch Gynecol Obstet. Vol.297, 749-756, 2018, [査読有](#)

Tanabe K, Matsuo K, Miyazawa M, Hayashi M, Ikeda M, Shida M, Hirasawa T, Sho R, Mikami M. UPLC-MS/MS based diagnostics for epithelial ovarian cancer using fully sialylated C4-binding protein. Biomed Chromatogr. Vol.32, e4180, 2018, [査読有](#)

Tajima T, Miyazawa M, Hayashi M, Asai S, Ikeda M, Shida M, Hirasawa T, Iwamori M, Mikami M. Enhanced expression of hydroxylated ceramide in well-differentiated endometrial adenocarcinoma. Oncol Lett. Vol13, 45-50, 2017, [査読有](#)

Shida M, Yasuda M, Fujita M, Miyazawa M, Kajiwara H, Hirasawa T, Ikeda M, Matsui N, Muramatsu T, Mikami M. Possible role of thymidine phosphorylase in gynecological tumors as an individualized treatment strategy. Oncol Lett. Vol12, 3215-3223, 2016, [査読有](#)

Tanaka K, Miyazawa M, Mikami M, Aoki D, Kiguchi K, Iwamori M. Enhanced expression of

unique gangliosides with GM2-determinant in human uterine cervical carcinoma-derived cell lines. Glycoconj J. Vol33, 745-54, 2016, 査読有
Matsui N, Kajiwara H, Morishita A, Iida T, Nakazawa K, **Miyazawa M**, Mikami M, Ogawa T, Nakamura N, Sato S. Use of epithelial-specific antigen for cytological diagnosis of glandular lesions in the uterine cervix. Pathol Int. Vol66, 305-8, 2016, 査読有

〔学会発表〕(計8件)

Silibinin による HIF-1 阻害の検討 卵巣癌化学療法における補助的意義
宮澤 麻里子, 安田 政実, **宮澤 昌樹**, 矢野 光剛, 加藤 智美, 大金 直樹, 平澤 猛, 松井 成明, 林 優, 三上 幹男
第 107 回日本病理学会総会(2018. 06. ロイトン札幌/ニトリ文化ホール/さっぽろ芸文館)
進行卵巣癌における HDAC の発現と化学療法感受性の相関
矢野 光剛, 榊 美佳, 永田 耕治, 藤野 節, 新井 栄一, 長谷部 孝裕, 小笠原 仁子, 宮澤 麻里子, **宮澤 昌樹**, 安田 政実
第 107 回日本病理学会総会(2018. 06. ロイトン札幌/ニトリ文化ホール/さっぽろ芸文館)
Diagnostics for epithelial ovarian cancer (EOC) using Fully-Sialylated C4-binding protein index (FS-C4BP index)
林優, 宮澤麻里子, **宮澤昌樹**, 矢坂美和, 榎山知明, 飯田哲士, 池田仁恵, 信田政子, 平澤 猛, 三上幹男
第 59 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 (2017. 07. ホテル日航熊本/くまもと県民交流館パレア)
Silibinin による HIF-1 阻害の検討 卵巣癌化学療法における補助的意義
宮澤 麻里子, 安田 政実, 平澤 猛, **宮澤 昌樹**, 林 優, 加藤 智美, 松井 成明, 梶原 博, 信田 政子, 池田 仁恵, 村松 俊成, 三上 幹男
第 59 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会(2017. 07. ホテル日航熊本/くまもと県民交流館パレア)
卵巣癌における HDAC の免疫組織化学的発現の検討
矢野 光剛, 加藤 智美, 長谷川 幸清, 榊 美佳, 永田 耕治, 新井 栄一, 長谷部 孝裕, 宮澤 麻里子, **宮澤 昌樹**, 榎原 久司, 安田 政実
第 59 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会(2017. 07. ホテル日航熊本/くまもと県民交流館パレア)
卵巣チョコレート嚢胞の癌化 Up to date 基礎的知見を臨床に 卵巣チョコレート嚢胞と初期明細胞癌を鑑別する新規糖鎖マーカーの開発
林 優, 宮澤 麻里子, **宮澤 昌樹**, 飯田 哲士, 池田 仁恵, 信田 政子, 平澤 猛, 三上 幹男
第 38 回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会(2017. 01.21-22. 東京コンベンションホール)
上皮性卵巣癌における Complement C4b-Binding Protein の発現と新規マーカーの可能性
林 優, 藤井 幸子, 宮澤 麻里子, **宮澤 昌樹**, 飯田 哲士, 池田 仁恵, 信田 政子, 平澤 猛, 村松 俊成, 三上 幹男
第 58 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会(2016. 07. 米子コンベンションセンター)
卵巣明細胞腺癌における Hypoxia Inducible Factor-1 α 遺伝子多型頻度および exon12 C1772T 遺伝子多型が臨床的予後に及ぼす影響
鈴木 裕之, 安田 政実, 加藤 智美, 鎌田 孝一, 吉田 正行, **宮澤 昌樹**, 岡垣 竜吾, 藤原 恵一, 石原 理
第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会(2016. 04. 東京国際フォーラム)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：宮澤 麻里子

ローマ字氏名：MIYAZAWA, Mariko

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。