

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390426

研究課題名 (和文) 卵巣癌播種性転移のシグナル経路解析とその抑制物質の探索

研究課題名 (英文) Analysis of signaling pathways in peritoneal dissemination of ovarian cancer, which leads to investigation for their suppressor reagents.

研究代表者

小西 郁生 (KONISHI IKUO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90192062

研究成果の概要：

卵巣癌の微小環境によるシグナル分子のエピジェネティックな変化に伴い、HIF-SNAIL-E-cadherin 経路、S100A4-RhoA 経路、Hedgehog 経路、さらに TGF β 経路の活性化が、卵巣癌細胞の播種性転移を促進させることを明らかとした。さらに RhoA、Hedgehog、TGF β の各シグナル経路を阻害する低分子化合物は、卵巣癌播種性転移の治療薬となりうることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：卵巣癌、播種性転移、エピジェネティクス、シグナル伝達、マイクロアレイ、低分子化合物

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は女性性器に発生する悪性腫瘍のうちで最も予後不良の疾患である。卵巣癌患者における最大の予後不良因子は腹腔内播種性転移であり、患者の予後向上にはまず卵巣癌細胞の播種性転移に関与するシグナル伝達経路を同定し、これを抑制する新たな物質の探索が求められる。

2. 研究の目的

- (1) 微小環境が卵巣癌細胞の播種性転移に及ぼす影響を解析する。
- (2) 播種性転移を特徴づけるシグナル経路を

探索する。

- (3) 播種性転移におけるメチル化・脱メチル化遺伝子を探索する。
- (4) 卵巣癌の播種性転移に対する治療薬を、シグナル阻害剤という観点で探索する。

3. 研究の方法

- (1) 卵巣癌摘出標本を用いて、HIF、Hedgehog シグナル分子、S100A4、TGF β シグナル分子の発現を調べた。
- (2) 卵巣癌細胞株を用いて、低酸素培養における HIF、SNAIL、E-cadherin のシグナルの変化を調べた。

(3) 卵巣癌細胞株を用いて、S100A4 が RhoA シグナルに及ぼす影響を調べた。S100A4 遺伝子については、プロモーター領域を詳細に解析し、エピジェネティックな変化が発現に及ぼす影響を検討した。

(4) 卵巣癌細胞株に脱メチル化剤 5Aza-dC を添加してマイクロアレイを行い、網羅的にメチル化遺伝子を検出した。

(5) メチル化と TGF β 経路の関連を、マイクロアレイ、ルシフェラーゼアッセイ、Western blotting により評価した。

(6) 卵巣癌細胞株を用いて、RhoA 阻害剤、Hedgehog 阻害剤、TGF β 阻害剤の転移阻害効果を、in vitro, in vivo で評価した。

4. 研究成果

(1) 卵巣癌細胞における HIF-SNAIL シグナルの解析

卵巣癌細胞株 SKOV3 は低酸素下により SKOV3 細胞の E-cadherin 発現は減弱し、HIF-1 α および HIF-2 α の発現が誘導され、それと同時に E-cadherin 転写抑制因子のなかでも SNAIL 発現が増加した。

(2) 卵巣癌細胞における S100A4-RhoA シグナルの解析

S100A4 の発現を免疫組織学的に検討したところ、卵巣癌では良性、境界悪性腫瘍に比べ有意に発現が増強していた。さらに、S100A4 低発現卵巣癌細胞株に対して S100A4 発現増強すると RhoA の活性が亢進し浸潤能は亢進した。一方、S100A4 の浸潤能亢進効果が Rho inhibitor および Rho kinase inhibitor で抑制された。

(3) 卵巣癌細胞における S100A4 エピジェネティクス解析

免疫染色にて S100A4 陽性部分と陰性部分に分けてマイクロダイセクションを行った後、DNA を抽出し、メチル化の有無を解析した結果、S100A4 遺伝子の第 1 イントロンの CpG サイトは、S100A4 低発現卵巣癌細胞株ではメチル化され、S100A4 高発現細胞株では脱メチル化されていた。

(4) 卵巣癌細胞における Hedgehog シグナルの解析

癌では Hedgehog signal の ligand である sHH, Pathed1, SMO, Gli1 とともに良性および境界悪性に比べて有意に発現が亢進していることが明らかになった。またその発現は細胞増殖マーカーである Ki67 の発現と関連していた。さらに 4 種の卵巣癌細胞株において、Hedgehog Pathway の阻害物質である Cyclopamine を添加したところ細胞増殖が抑制された。これらの結果から、卵巣癌では Hedgehog Pathway 亢進が細胞増殖と関連していることが明らかになった。

(5) 卵巣癌における、DNA メチル化と TGF β 経路の関連についての解析

43 種類の卵巣癌細胞株に 5Aza-dC を添加して遺伝子発現の変化を調べたマイクロアレイデータを元に、卵巣癌における 360 個のメチル化遺伝子リストを作成した。それらのメチル化遺伝子群には TGF β 経路の遺伝子が多く含まれており、実際に TGFBR2 や THBS1 といった、TGF β 経路の活性を亢進させる遺伝子は、その発現とメチル化が逆相関していた。マイクロアレイによって、TGF β 経路の活性を調べると、5Aza-dC の添加によって、その活性が亢進することがわかった。さらに 5Aza-dC による TGF β 経路の活性化は、p-SMAD2/3 の Western blotting や、SMAD3-ルシフェラーゼアッセイでも明らかであった。卵巣癌の臨床サンプルにおいて、TGF β 経路の活性とメチル化 360 遺伝子の発現は正の相関を示し、原発巣と大網転移巣の間で発現マイクロアレイデータを比較すると、大網転移巣において TGF β 経路の活性亢進と 360 遺伝子の発現亢進を認めた。免疫組織染色による検討では、マイクロアレイデータに合致して、大網転移巣における TGFBR2 タンパクの発現亢進および p-SMAD2 の発現亢進を認めた。TGF β 経路の阻害剤である A-83-01 は、マウス卵巣癌細胞株 HM-1 の浸潤、遊走を in vitro で抑制し、in vivo では腹膜播種性転移モデルマウスの生存期間を延長させた。したがって TGF β 阻害剤 A-83-01 は、卵巣癌の転移に対する治療薬として有用と考えられ、臨床応用へ向けてさらに検討を行うべきと思われる。

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 27 件)

- ① Kashima H, Horiuchi A, Uchikawa J, Miyamoto T, Suzuki A, Ashida T, Konishi I, Shiozawa T. Up-regulation of Nuclear Receptor Corepressor (NCoR) in Progesterin-induced Growth Suppression of Endometrial Hyperplasia and Carcinoma. *Anticancer Res.* 29:1023-9. 2009 査読有り
- ② Horiuchi Y, Higuchi T, Tatsumi K, Takakura K, Fujii S, Konishi I. Lactoferrin is associated with a decrease in oocyte depletion in mice receiving cyclophosphamide. *Fertil Steril.* 91: 2069-2078. 2009 査読有り
- ③ Yamamoto K, Kokawa K, Umesaki N,

Nishimura R, Hasegawa K, Konishi I, Saji F, Nishida M, Noguchi H, Takizawa K. Phase I study of combination chemotherapy with irinotecan hydrochloride and nedaplatin for cervical squamous cell carcinoma: Japanese gynecologic oncology group study. *Oncol Rep.* 21: 1005-9. 2009 査読有り

④Wei JP, Nawata M, Wakitani S, Kametani K, Ota M, Toda A, Konishi I, Ebara S, Nikaido T. Human amniotic mesenchymal cells differentiate into chondrocytes. *Cloning Stem Cells.* 11: 19-26. 2009 査読有り

⑤Onda T, Kobayashi H, Nakanishi T, Hatae M, Iwasaka T, Konishi I, Shibata T, Fukuda H, Kamura T, Yoshikawa H. Feasibility study of neoadjuvant chemotherapy followed by interval debulking surgery for stage III/IV ovarian, tubal, and peritoneal cancers: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG0206. *Gynecol Oncol.* 113: 57-62. 2009 査読有り

⑥Kondoh E, Okamoto T, Higuchi T, Tatsumi K, Baba T, Murphy SK, Takakura K, Konishi I, Fujii S. Stress affects uterine receptivity through an ovarian-independent pathway. *Hum Reprod.* 24: 945-53. 2009 査読有り

⑦Izumi-Yoneda N, Toda A, Okabe M, Koike C, Takashima S, Yoshida T, Konishi I, Saito S, Nikaido T. Alpha 1 antitrypsin activity is decreased in human amnion in premature rupture of the fetal membranes. *Mol Hum Reprod.* 15: 49-57. 2009 査読有り

⑧Liu M, Matsumura N, Mandai M, Li K, Yagi H, Baba T, Suzuki A, Hamanishi J, Fukuhara K, Konishi I. Classification using hierarchical clustering of

tumor-infiltrating immune cells identifies poor prognostic ovarian cancers with high levels of COX expression. *Mod Pathol.* 22: 373-84. 2009 査読有り

⑨Kashima H, Shiozawa T, Miyamoto T, Suzuki A, Uchikawa J, Kurai M, Konishi I. Autocrine stimulation of IGF1 in estrogen-induced growth of endometrial carcinoma cells: involvement of the mitogen-activated protein kinase pathway followed by up-regulation of cyclin D1 and cyclin E. *Endocr Relat Cancer.* 16: 113-22. 2009 査読有り

⑩Baba T, Convery PA, Matsumura N, Whitaker RS, Kondoh E, Perry T, Huang Z, Bentley RC, Mori S, Fujii S, Marks JR, Berchuck A, Murphy SK. Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133+ ovarian cancer cells. *Oncogene.* 28: 209-18. 2009 査読有り

⑪Matsumura N, Huang Z, Baba T, Lee PS, Barnett JC, Mori S, Chang JT, Kuo WL, Gusberg AH, Whitaker RS, Gray JW, Fujii S, Berchuck A, Murphy SK. Yin yang 1 modulates taxane response in epithelial ovarian cancer. *Mol Cancer Res.* 7: 210-20. 2009 査読有り

⑫Li K, Mandai M, Hamanishi J, Matsumura N, Suzuki A, Yagi H, Yamaguchi K, Baba T, Fujii S, Konishi I. Clinical significance of the NKG2D ligands, MICA/B and ULBP2 in ovarian cancer: high expression of ULBP2 is an indicator of poor prognosis. *Cancer Immunol Immunother.* 58: 641-52. 2009 査読有り

⑬Kokawa K, Umesaki N, Yamamoto K, Takizawa K, Konishi I, Hasegawa K; Japan Gynecologic Oncology Group. Phase I study

of irinotecan combined with mitomycin-C and 5-fluorouracil for gynecological malignancies: the JGOG study. *Anticancer Res.* 28: 2933-9. 2008 査読有り

⑭ Horiuchi A, Kikuchi N, Osada R, Wang C, Hayashi A, Nikaido T, Konishi I. Overexpression of RhoA enhances peritoneal dissemination: RhoA suppression with Lovastatin may be useful for ovarian cancer. *Cancer Sci.* 99:2532-9. 2008 査読有り

⑮ Kanai M, Ashida T, Ohira S, Osada R, Konishi I. A new technique using a rubber balloon in emergency second trimester cerclage for fetal membrane prolapse. *J Obstet Gynaecol Res.* 34: 935-40. 2008 査読有り

⑯ Sugiyama T, Konishi I. Emerging drugs for ovarian cancer. *Review. Expert Opin Emerg Drugs.* 13: 523-36. 2008 査読有り

⑰ Onda T, Matsumoto K, Shibata T, Sato A, Fukuda H, Konishi I, Kamura T, Yoshikawa H; Japan Clinical Oncology Group. Phase III trial of upfront debulking surgery versus neoadjuvant chemotherapy for stage III/IV ovarian, tubal and peritoneal cancers: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG0602. *Jpn J Clin Oncol.* 38: 74-7. 2008 査読有り

⑱ Yamaguchi K, Mandai M, Fukuhara K, Higuchi T, Hamanishi J, Takakura K, Fujii S. Malignant transformation of mature cystic teratoma of the ovary including three cases occurring during follow-up period. *Oncol Rep.* 19: 705-11. 2008 査読有り

⑲ Hamanishi J, Higuchi T, Mandai M, Fukuhara K, An M, Nakayama T, Takakura K,

Fujii S. Intractable recurrent cervical cancer with pelvic bone involvement successfully treated with external hemipelvectomy. *J Obstet Gynaecol Res.* 34: 112-6. 2008 査読有り

⑳ Matsumura N, Mandai M, Hamanishi J, Yamaguchi K, Fukuhara K, Yagi H, Higuchi T, Takakura K, Fujii S. Immunostimulatory effect of Fms-like tyrosine kinase 3 ligand on peripheral monocyte-derived dendritic cells and natural killer cells: utilization for ovarian cancer treatment. *Oncol Rep.* 19:505-15. 2008 査読有り

㉑ Yamaguchi K, Mandai M, Toyokuni S, Hamanishi J, Higuchi T, Takakura K, Fujii S. Contents of endometriotic cysts, especially the high concentration of free iron, are a possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress. *Clin Cancer Res.* 14: 32-40. 2008 査読有り

㉒ Ushijima K, Yahata H, Yoshikawa H, Konishi I, Yasugi T, Saito T, Nakanishi T, Sasaki H, Saji F, Iwasaka T, Hatae M, Kodama S, Saito T, Terakawa N, Yaegashi N, Hiura M, Sakamoto A, Tsuda H, Fukunaga M, Kamura T. Multicenter phase II study of fertility-sparing treatment with medroxyprogesterone acetate for endometrial carcinoma and atypical hyperplasia in young women. *J Clin Oncol.* 25: 2798-803. 2007 査読有り

㉓ Iijima K, Igawa Y, Imamura T, Moriizumi T, Nikaido T, Konishi I, Nishizawa O. Transplantation of preserved human amniotic membrane for bladder augmentation in rats. *Tissue Eng.* 13:

513-24. 2007 査読有り

②4 Fujii S, Takakura K, Matsumura N, Higuchi T, Yura S, Mandai M, Baba T, Yoshioka S. Anatomic identification and functional outcomes of the nerve sparing Okabayashi radical hysterectomy. Gynecol Oncol. 107:4-13. 2007 査読有り

②5 Baba T, Mori S, Matsumura N, Kariya M, Murphy SK, Kondoh E, Kusakari T, Kuroda H, Mandai M, Higuchi T, Takakura K, Fukuda MN, Fujii S. Trophinin is a potent prognostic marker of ovarian cancer involved in platinum sensitivity. Biochem Biophys Res Commun. 360: 363-9. 2007 査読有り

②6 Osada R, Horiuchi A, Kikuchi N, Yoshida J, Hayashi A, Ota M, Katsuyama Y, Melillo G, Konishi I. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha, hypoxia-inducible factor 2alpha, and von Hippel-Lindau protein in epithelial ovarian neoplasms and allelic loss of von Hippel-Lindau gene: nuclear expression of hypoxia-inducible factor 1alpha is an independent prognostic factor in ovarian carcinoma. Hum Pathol. 38:1310-20. 2007 査読有り

②7 Baba T, Kariya M, Higuchi T, Mandai M, Matsumura N, Kondoh E, Miyanishi M, Fukuhara K, Takakura K, Fujii S. Neuropilin-1 promotes unlimited growth of ovarian cancer by evading contact inhibition. Gynecol Oncol. 105: 703-11. 2007 査読有り

[学会発表] (計2件)

① 松村謙臣 第61回日本産科婦人科学会シンポジウム「卵巣癌における化学療法感受性バイオマーカーの開発と組織型による分子標的の同定—治療個別化に向けたBioinformaticsの応用」2009年4月4日、

国立京都国際会館

② 堀内晶子 第60回日本産科婦人科学会シンポジウム「卵巣癌の発生および進展のエピジェネティクス解析—BRCA1メチル化およびS100A4脱メチル化の臨床的意義」2008年4月14日、パシフィコ横浜

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 郁生 (KONISHI IKUO)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号: 90192062

(2) 研究分担者

万代 昌紀 (MANDAI MASAKI)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号: 80283597
松村 謙臣 (MATSUMURA NORIOMI)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 20452336
馬場 長 (BABA TSUKASA)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 60508240
伊東 和子 (ITO KAZUKO)
信州大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 40303458
堀内 晶子 (HORIUCHI AKIKO)
信州大学・医学部・助教
研究者番号: 80334895
長田 亮介 (OSADA RYOSUKE)
信州大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 80418722
大平 哲史 (OHIRA SATOSHI)
信州大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 90397315

(3) 連携研究者

なし