

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791801

研究課題名(和文) 機能的ゲノム解析による卵巣がんの新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Identification of new molecular target for ovarian cancer via functional genomic analysis

研究代表者

豊島 将文 (TOYOSHIMA, Masafumi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：70451581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣がんにおける新規治療標的の探索を目的にしてがん遺伝子Mycの高発現と合成致死作用を持つ遺伝子を大規模siRNAスクリーニングで検索した。Hit分子はデータベースおよびネットワーク解析によるbioinformatics解析による絞り込みとin vitroおよびin vivoでの検証実験を通じて、CK1e、WEE1、Aurora A、FURINを新規治療標的の候補分子として同定した。

研究成果の概要(英文)：We searched new molecular target with a synthetic lethal effect with the high expression of oncogene c-Myc in ovarian cancer via large scale siRNA screening. Through bioinformatics analysis utilizing network analysis and database, and verification experiments both in vitro and in vivo, we identified CK1e, WEE1, Aurora A and FURIN as candidates molecule for the new therapeutic target.

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：c-Myc 卵巣がん siRNAスクリーニング 合成致死 CK1e WEE1 AuroraA FURIN

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは婦人科領域では最も予後の悪い疾患であり、全女性の死亡原因としても5番目である。p53 変異・PIK3CA 増幅・KRAS 変異などが卵巣がんで見られる主な遺伝子変異であるが、近年 c-Myc のコピー数増幅または過発現も報告されている。癌遺伝子 c-Myc は種々の悪性疾患で過剰発現が知られているが、Myc は酵素活性のない転写因子である事、また正常細胞の増殖においても不可欠である事より癌治療における直接の標的としては不適である。我々は Myc そのものではなく Myc と合成致死作用を持つような遺伝子を治療標的として研究を進め、Myc 合成致死遺伝子として WRN タンパク質の同定、また大規模 siRNA スクリーニングによる機能的遺伝子解析を通じた予後不良 MYCN 増幅神経芽細胞腫における新規治療標的の同定を行った。同様の研究戦略を卵巣がんに応用して新規治療標的の探索を行った。

2. 研究の目的

癌遺伝子 Myc に着目した大規模 siRNA スクリーニングによる機能的ゲノム解析を行う事で、卵巣がんにおける新規治療標的の探索を研究の目的とする。本研究では以下に述べる(1)-(3)の研究目的及び方法で実験を行った。

(1)我々が in vitro で同定した卵巣がん治療標的候補分子に関しマウス卵巣がん腹膜播種モデルで検証実験を行う。

(2)卵巣がん細胞株を用いて Myc に着目した新規 siRNA および化学物質スクリーニングを行う。

(3)シスプラチン耐性卵巣がん細胞株ペアーを用い抗がん剤耐性の克服を目的にした新規 siRNA および化学物質スクリーニングを行う。

3. 研究の方法

研究(1): 我々が同定した卵巣がん新規治療標的としての G2/M チェックポイント阻害効果を、in vivo イメージングシステムを利用した卵巣がん腹膜播種モデルにおける低分子阻害剤投与で検証する。

研究(2): c-Myc 依存性および非依存性の卵巣がん細胞株セットで大規模 siRNA スクリーニングを行う。得られた分子をスクリーニング結果 低分子阻害剤の有無 がん形質との既知の関連情報、の3基準をもとに選択して bioinformatics, in vitro および in vivo の検証実験を通じてその分子の有用性を調べる。

研究(3): シスプラチン耐性の卵巣がん細胞株ペアーを用いて、創薬可能遺伝子の siRNA ライブラリーでの新規スクリーニングを行う。得られた分子をスクリーニング結果 低分子阻害剤の有無 薬剤耐性との既知の関連情報、の3基準をもとに選択して bioinformatics, in vitro および in vivo の検証実験を通じてその分子の有用性を調べる。

4. 研究成果

研究(1): WEE1 阻害剤 MK1775、AuroraA 阻害剤 MLN8237、CK1e 阻害剤 IC-261 を用いて、マウス卵巣がんモデルでの治療効果を測定した。卵巣がんモデルとして in vivo imaging system を用い癌性腹膜炎モデルを用いた。EF プロモーター下流で luciferase を定常発現するレンチウイルスベクター

(pLentiEFLuc/GFP-Zeo)より卵巣がん細胞株を樹立、xenograft として免疫不全マウスに腹腔内注射した。薬剤投与の効果と副作用を評価した。

研究(2): c-Myc 発現量により選んだ6種の卵巣がん細胞株を用い siRNA スクリーニングを行った。細胞生存率は Promega 社の Cell Titer Glo で細胞処理し、Luminescence 測定値をコントロールとの相対生存率として計

算した。siRNA スクリーニング後に スクリーニング結果 低分子阻害剤の有無 がん形質との既知の関連情報の3基準をもとに検証実験にすすむ遺伝子を選択しネットワーク解析を行った。それらの検討を踏まえて、新規治療標的分子としてセリンプロテアーゼである FURIN を見出した。FURIN は低分子阻害剤による in vitro での検討も行き、c-Myc 依存的な細胞増殖阻害のメカニズム検討を行い、現在は論文投稿準備中である。

研究(3):シスプラチン耐性卵巣がん細胞株である A2780CP を用いて、6550 遺伝子からなる genome scale siRNA library でスクリーニングを行った。ノックダウンによりシスプラチン感受性を増強させる遺伝子群を抽出し、それらを bioinformatics 解析した。さらに off-target 効果を否定するためにスクリーニングと独立した配列の siRNA を用いて、異なる 2 種類のシスプラチン耐性株ペア（A2780CP と親株の A2780、および PE04 と元株の PE01）で 2 次スクリーニングを行った。

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) (全て査読有)

Satoru Nagase ・ Fumihiko Suzuki ・

Hideki Tokunaga ・ Masafumi

Toyoshima ・ Hiroki Utsunomiya ・

Hitoshi Niikura ・ Nobuo Yaegashi

Molecular Pathogenesis of Uterine Serous Carcinoma

Curr Obstet Gynecol Rep

2014 (3) 33-39

Tadao Takano ・ Takeo Otsuki ・ Hideki

Tokunaga ・ Masafumi Toyoshima ・ Hiroki

Utsunomiya ・ Satoru Nagase ・ Hitoshi

Niikura ・ Kiyoshi Ito ・ Nobuo Yaegashi

・ Hidekazu Yamada ・ Toru Tase ・ Masahiro

Kagabu ・ Tadahiro Shoji ・ Toru Sugiyama

・ Naoki Sato ・ Toshio Fujimoto ・

Yukihiro Terada ・ Kenji Nakahara ・

Hirohisa Kurachi ・ Yoshihito Yokoyama

・ Hideki Mizunuma ・ Shu Soeda ・ Hiroshi

Nishiyama ・ Takashi Matsumoto ・ Shinya

Sato ・ Muneaki Shimada ・ Junzo Kigawa

Paclitaxel-carboplatin for advanced

or recurrent carcinosarcoma of the

uterus: the Japan Uterine Sarcoma

Group and Tohoku Gynecologic Cancer

Unit Study

Int J Clin Oncol.

2014 PMID: 24395448

Tanaka S, Nagase S, Kaiho-Sakuma M,

Nagai T, Kurosawa H, Toyoshima M,

Tokunaga H, Otsuki T, Utsunomiya H,

Takano T, Niikura H, Ito K, Yaegashi N.

Clinical outcome of pelvic

exenteration in patients with advanced

or recurrent uterine cervical cancer.

Int J Clin Oncol

2014 Feb;19(1):133-8

doi: 10.1007/s10147-013-0534-9.

Hitoshi Niikura, Michiko Kaiho-Sakuma,

Hideki Tokunaga, Masafumi Toyoshima,

Hiroki Utsunomiya, Satoru Nagase,

Tadao Takano, Mika Watanabe, Kiyoshi

Ito, Nobuo Yaegashi

Tracer injection sites and

combinations for sentinel lymph node

detection in patients with endometrial cancer

Gynecologic Oncology

2013 8258(13)01103-7

doi: 10.1016/j.ygyno.2013.08.018.

Shin Takayama, Yasutake Monma, Megumi

Tsubota-Utsugi, Satoru Nagase,

Yoshitaka Tsubono, Takehiro Numata,

Masafumi Toyoshima, Hiroki Utsunomiya,

Junichi Sugawara, and Nobuo Yaegashi

Food Intake and the Risk of Endometrial Endometrioid Adenocarcinoma in Japanese Women
Nutrition and Cancer
2013 65(7):954-60
doi: 10.1080/01635581.2013.818158.
Naomi Shiga, Masafumi Toyoshima, Jun-ichi Akahira, Satoru Nagase, Hitoshi Niikura, Nobuo Yaegashi
Carcinosarcoma of the uterine cervix with a clear cell adenocarcinoma component
Int Canc Conf J
2013 Volume 2(3),154-156
Hideki Tokunaga, Satoru Nagase, Kosuke Yoshinaga, Sota Tanaka, Tomyuki Nagai, Hiroki Kurosawa, Michiko Kaiho-Sakuma, Masafumi Toyoshima, Takeo Otsuki, Hiroki Utsunomiya, Tadao Takano, Hitoshi Niikura, Kiyoshi ito and Nobuo Yaegashi
Small Cell Carcinoma of the Uterine Cervix: Clinical Outcome of concurrent Chemoradiotherapy with a Multidrug Regimen
Tohoku J. Exp. Med.
2013 229(1), 75-81
PMID: 23269283
Russell Moser*, Masafumi Toyoshima* (* contributed equally), Kristin Robinson, Kay E. Gurley, Heather L. Howie, Jerry Davison, Martin Morgan, Christopher J. Kemp and Carla Grandori.
MYC-driven tumorigenesis is inhibited by WRN syndrome gene deficiency.
Mol. Cancer Research
April 2012 10:535-545
doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0508.
Masafumi Toyoshima, Heather L Howie, Maki Imakura, Ryan M Walsh, James E

Annis, Aaron N. Chang, Jason Frazier, B Nelson Chau, Andrey Loboda, Peter S Linsley, Michele A. Cleary, Julie R Park, Carla Grandori
Functional Genomics Identifies Therapeutic Targets for MYC-Driven Cancer PNAS 2012
June 12. 2012; 109(24) 9545-9550
doi: 10.1073/pnas.1121119109.
Hiroki Kurosawa, Kiyoshi ito, Hitoshi Nikura, Tadao Takano, Satoru Nagase, Hiroki Utsunomiya, Takeo Otsuki, Masafumi Toyoshima, Tomoyuki Nagai, Souta Tanaka, Mika Watanabe and Nobuo Yaegashi
Hysteroscopic inspection and total curettage are insufficient for discriminating endometrial cancer from atypical endometrial hyperplasia
Tohoku J. Exp. Med.
2012 228(4), 365-370
PMID: 23154663

〔学会発表〕(計 12 件)

Masafumi Toyoshima Epidemiology of the cervical cancer, and the Present State of Screening/Vaccination in Japan Phnom Penh Hotel 12th SCGO annual meeting Invited Phnom Penh, Cambodia 2013/8/9
豊島将文 大規模 siRNA スクリーニングを通じた、卵巣がんに対する新規治療標的分子の同定 勝山館
TYCOONS Seminar 2013 招待講演 仙台 2013/8/3
北谷和之・豊島将文・増子さつき・重田昌吾・石橋ますみ・八重樫伸生 卵巣がん転移を標的にした創薬:スフィンゴ脂質の利用 東大寺総合文化センター
第 12 回日本婦人科がん分子標的研

研究会口演 奈良 2013/7/5-6
Masafumi Toyoshima, Kazuyuki Kitatani,
Satsuki Mashiko, Shogo Shigeta and
Nobuo Yaegashi
Identification of Targeted Therapies
for Ovarian Cancers by Functional
Genomics ヒルトン札幌他 第65
回日本産科婦人科学会学術総会 ポスタ
ー 札幌 2013/5/9-12
重田昌吾・豊島将文・増子さつき・北谷
和之・八重樫伸生 卵巣上皮内腺癌
における DNA 二本鎖切断と p53 発現の免
疫組織学的検討 ヒルトン札幌他
第65回日本産科婦人科学会学術総会
ポスター 札幌 2013/5/9-12
増子さつき・豊島将文・北谷和之・重田
昌吾・八重樫伸生 卵巣明細胞腺癌
における PAI-1 の発現と血栓症発症の関
連についての検討 ヒルトン札幌他
第65回日本産科婦人科学会学術総
会 ポスター 札幌 2013/5/9-12
豊島将文・北谷和之・増子さつき・重田
昌吾・石橋ますみ・八重樫伸生 c-Myc
高発現をバイオマーカーとした卵巣が
んにおける治療標的分子の同定 東京大
学 伊藤国際学術研究センター 第1回
婦人科がんバイオマーカー研究会学術
集会口演 東京 2013/2/16
石橋ますみ・豊島将文・北谷和之・増子
さつき・重田昌吾・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 東京大学 伊藤国際学術
研究センター 第1回婦人科がんバイオ
マーカー研究会学術集会 口演
東京2013/2/16
Masafumi Toyoshima Identification
of Targeted therapies for Ovarian
Cancer by Functional Genomics
Seattle University Marsha Rikin

the 9th Ovarian Cancer Research
Symposium Invited Seattle, USA
2012/9/6-7
豊島 将文 機能的ゲノミクスによる、
卵巣がんにおける c-Myc 過剰発現と合成
致死作用を持つ分子標的の探索 東北大
学薬学部 化合物ライブラリー第2
回講習会 口演 仙台
2011/12/20
Masafumi Toyoshima Therapeutic
targets for MYC-driven cancer
Moscone Center West AACR-NCI-EORTC
International Conference, Molecular
Targets and Cancer Therapeutics
ポスター San Francisco, USA
2011/11/15
Masafumi Toyoshima Identification
of Targeted Therapies for c-Myc
overexpressed Ovarian Cancers by
Functional Genomics 名古屋国際会議
場 第70回日本癌学会 口演 名古屋
2011/10/3

〔その他〕

ホームページ等

研究室 HP

<http://www.ob-gy.med.tohoku.ac.jp/laboratory/m-toyoshima-01.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊島 将文 (TOYOSHIMA, MASAFUMI)

東北大学・大学院医学系研究科・大学院非
常勤講師

研究者番号：70451581