

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：34401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670709

研究課題名(和文) 卵巣癌の抗癌剤耐性評価システムと再発早期発見ツールの構築—個別化治療へ向けて—

研究課題名(英文) Development of anticancer drug resistance evaluation system, and early recurrence-detection tools in ovarian cancer

研究代表者

大道 正英 (Ohmichi, Masahide)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：10283764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌におけるCD24強発現は浸潤能亢進、シスプラチン耐性化に重要であり、CD24を分子標的とすることで治療に応用できると考えた。CD24特異的抗体を外郭に搭載したシスプラチン内包ミセル(CDDP-CD24-LIPO)を開発し、基礎的検討をおこなった。腹膜播種モデルマウスにおいてCDDP-CD24-LIPO群はCDDP群と比較し、病巣における組織移行性が高く優れた治療効果を認めたことにより、新たな卵巣癌分子標的療薬として期待できる。つまりCD24抗原やCD24強陽性Circulating Tumor Cellsを血中から検知すれば、予後予測、癌発見ツールとして利用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：CD24 has been reported to be a marker for a poor prognosis in several tumors, and we have demonstrated the functions of CD24 in human ovarian cancer cell lines which contributes to epithelial-mesenchymal transition and cisplatin (CDDP) resistancy. Recently, several kinds of nanoparticle therapeutic platforms, including polymeric micelles, have been developed based on the idea that the drug delivery system can accumulate in the tumor selectively. We analyzed the cytotoxicity and antitumor effects of anti-CD24 antibody conjugated CDDP-incorporating polymeric micellar nanoparticle (CDDP-CD24-LIPO). CDDP-CD24-LIPO represented a significant anti tumor effects and safety. Therefore, CD24 has potential as tool for evaluation of prognosis and cancer detection.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 CD24 EMT 高分子ミセル

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は生存率が最も低い婦人科癌である。その理由として、当初抗がん剤に感受性を示していてもしだいに耐性を示す場合が多いことが考えられる。特に転移病巣は多くの場合抗がん剤耐性を示す。従って、第1選択のレジメンとして代表的な白金製剤およびタキサン製剤の耐性化の分子機構を解析し、それらの耐性化機構を解除できるか否かの研究は、卵巣癌に対する新たな治療戦略として非常に重要である。我々は従来から、シスプラチンおよびタキソールの耐性化機構に、生存シグナルである ERK と PI-3 kinase-Akt 経路およびその下流に、抗がん剤耐性化のみならず癌の浸潤・転移に関与する mammalian target of rapamycin (mTOR)、VEGF と転写因子 nuclear factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) が関与し、それらの分子をブロックすればシスプラチンおよびタキソールの感受性が増強されることを *in vitro* および *in vivo* において明らかにしてきた。しかしながら、実際に研究を進めると、抗がん剤耐性化は薬剤によってメカニズムが異なり複数の分子が絡み合っている影響があるので、画一化された治療ではなく個別化医療の必要性が認識され始めている。

そこで、抗がん剤に対する感受性の効果予測因子を遺伝子、蛋白、miRNA の多方面からマイクロアレイを用いてスクリーニング・同定し、スコア作成することで、効果の期待できる症例に個別化された薬剤選択を実現したり、癌組織から患者血中へ流れ出した Circulating Tumor Cells (CTCs) を患者血清から検出し、癌早期発見ツールとしての価値を評価することが望まれていた。

## 2. 研究の目的

卵巣癌の早期発見、および治療効果判定に有用な CTCs は、癌細胞の転移浸潤過程において、細胞間接着や細胞極性を失い、間葉系細胞に変化し間質内へ浸潤転移する「上皮間葉形態転換(EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition)」が起きていると考えられる。過去の報告から、EMT の現象を起こしている細胞は、強い自己複製能と腫瘍形成能を有する癌幹細胞との関連が示唆されている。癌幹細胞は抗癌剤や放射線療法に抵抗を示し、癌再発の原因細胞と考えられていることから、EMT 現象を起こした癌幹細胞様細胞の制御が卵巣癌克服の大きな一歩となりえる。

よって卵巣癌の EMT 細胞、癌幹細胞の表現マーカーの同定とその裏付けを分子生物学的に検討するのを目的とした。また、膀胱癌や肺癌で癌幹細胞マーカーの可能性が示唆されている膜蛋白 CD24 に着目し、EMT との関連を検討した。さらに、CD24 特異的抗体を外郭に搭載したシスプラチン内包高分子ミセル (CDDP-CD24-LIPO) を開発し、

治療応用へ向けた基礎的検討を行なうことを目的とした。

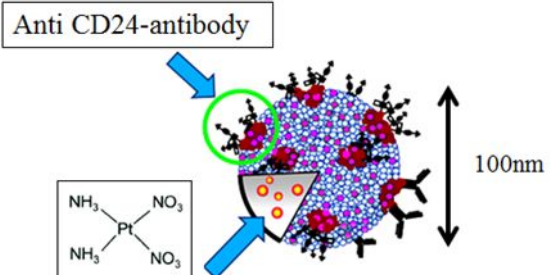
## 3. 研究の方法

卵巣癌細胞における CD24 の発現が、予後因子として関与するか否かを検討するために、卵巣癌患者 200 例の病理組織を用い組織マイクロアレイを作成したのち、CD24 を免疫染色し、染色強度による無病生存期間と全生存期間に対する相関を検討した。さらに、抗 E-Cadherin 抗体、抗 Snail 抗体で免疫染色し、E-Cadherin 減弱と Snail 増強を EMT(+), その逆を EMT(-)とし、EMT と CD24 発現強度との関連を検討した。

シスプラチン耐性卵巣癌細胞株 Caov3 を用い、CD24 発現量がシスプラチン耐性能に関与しているか、抗 CD24 抗体で細胞を免疫染色したのち FACS にて CD24(+) と CD24(-) 分画に分離し、MTS assay および invasion assay にて検討した。さらに、Caov3 に CD24 の過剰発現および siRNA 導入による knockdown を行ない、細胞浸潤能を invasion assay にて検討した。

Caov3 細胞を抗 CD24 抗体で免疫染色したのち FACS にて CD24(+) と CD24(-) 分画に分離し、 $5 \times 10^6$  個ずつヌードマウスの腹腔内に投与し、卵巣癌モデルマウスを作成し、腫瘍形成能を比較した。

現在使用されている抗癌剤の多くは低分子化合物であるため、投与直後に全身に分布してしまう。このような問題を解決するため、DDS (Drug Delivery System) が大きな注目を集めている。今回、外郭に抗 CD24 抗体を共結合させ、コアにシスプラチンを封入した薬物キャリアーである高分子ミセル (CD24-CDDP-LIPO) を作成した。抗 CD24 抗体を外郭に結合させることにより、CD24 強発現細胞へ効率的に薬剤を導入することが可能となる。

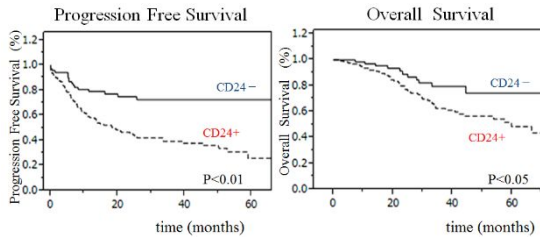


Caov3 細胞をヌードマウスに腹腔内投与し腹膜播種モデルを作成し、PBS 群、CDDP (10mg/kg) 群、CD24-CDDP-LIPO (10mg/kg) 群としてそれぞれ尾静脈から週に 1 回ずつ投与し生存曲線で治療効果を評価した。さらに、治療後の腫瘍組織から CDDP 残留濃度を ICP-OES (誘導結合プラズマ発光分析法) にて定量し、CDDP の組織移行性を評価した。

#### 4. 研究成果

##### 卵巣癌における CD24 発現と予後

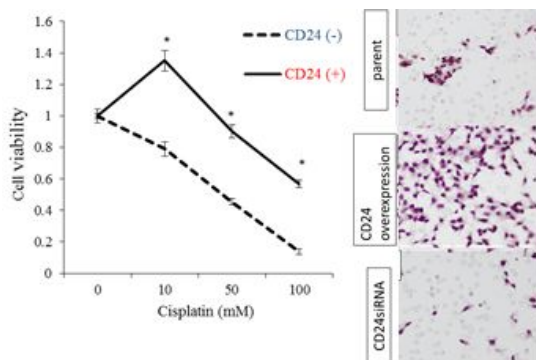
CD24 陽性群は陰性群と比較し、無病生存期間と全生存期間ともに有意に短縮した。また、EMT(+)(E-cadherin 減弱と Snail 増強)と CD24 強発現は有意な関連を認めた。つまり卵巣癌組織において、CD24 発現は EMT 現象に関連することが示唆された。



Variables	CD24		
	Low (%)	High (%)	P-value
EMT			0.003
Positive	4 (11.6)	32 (88.4)	
Negative	66 (40.6)	98 (59.4)	

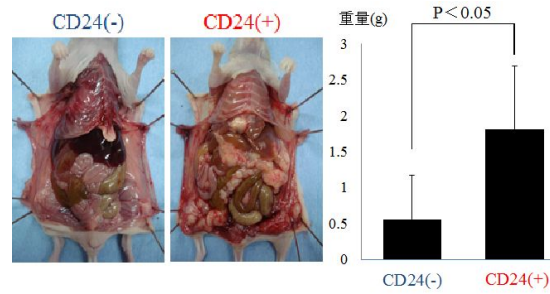
##### CD24 はシスプラチン耐性と浸潤能亢進に 関与する。

CD24(+)は CD24(-)よりもシスプラチン耐性であり、IC50 は約 2 倍の濃度であることが判明した。また、CD24 過剰発現で浸潤能が更新し、CD24 の knockdown により浸潤能が抑制されたことより、CD24 発現は卵巣癌の浸潤能亢進に関与することが示唆された。



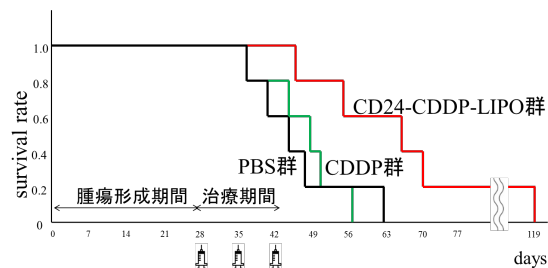
##### CD24 は卵巣癌モデルマウスにおいて腫瘍形成能に関与する。

CD24(+)分画の播種病巣は CD24(-)分画と比較して有意に増大しており、CD24 は *in vivo* において腫瘍形成能に関与することが示唆された。

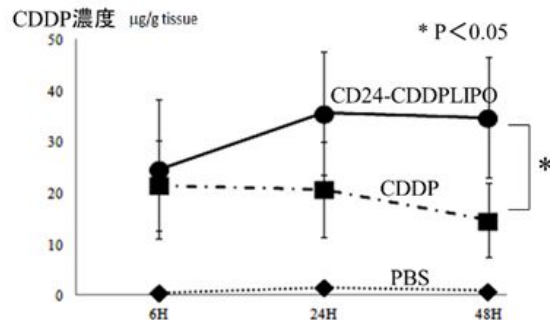


##### CD24 強発現細胞を標的とした高分子ミセルによる治療は卵巣癌腹膜播種モデルマウスの予後を有意に改善する。

全生存期間は生食群 46.8 日、CDDP 群 47.8 日に対して、CDDP-CD24-LIPO 群 71.2 日と有意に延長を認めた



そして腫瘍組織内の CDDP 濃度は CDDP 群と比較し、CD24-CDDP-LIPO 群で有意に高濃度であり、組織移行が良好であることが示唆された。



##### 結論

卵巣癌において CD24 発現は癌細胞のシスプラチン耐性化および EMT 化に関与しており、CD24 を治療標的とすることで予後改善が期待できることが示唆された。すなわち、CD24 抗原、または CD24 強陽性 CTCs を患者血中から検知することは、予後予測、ひいては癌発見ツールとして利用できる可能性を秘めていると考えられる。

#### 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 5 件)

Takai M, Nakagawa T, Tanabe A, Terai Y, Ohmichi M, Asahi M.  
Crosstalk between PI3K and Ras pathways

via protein phosphatase 2A in human ovarian clear cell carcinoma. Cancer Biol Ther. 2015, 16:325-335. (査読あり)

Ono YJ, Hayashi M, Tanabe A, Hayashi A, Kanemura M, Terai Y, Ohmichi M. Estradiol-mediated hepatocyte growth factor is involved in the implantation of endometriotic cells via the mesothelial-to-mesenchymal transition in the peritoneum. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2015, 308:E950-E959. (査読あり)

Nakamura M, Ono YJ, Kanemura M, Tanaka T, Hayashi M, Terai Y, Ohmichi M. Hepatocyte growth factor secreted by ovarian cancer cells stimulates peritoneal implantation via the mesothelial-mesenchymal transition of the peritoneum. Gynecol Oncol. 2015, 139:345-354. (査読あり)

Kawaguchi H, Terai Y, Tanabe A, Sasaki H, Takai M, Fujiwara S, Ashihara K, Tanaka Y, Tanaka T, Tsunetoh S, Kanemura M, Ohmichi M. Gemcitabine as a molecular targeting agent that blocks the Akt cascade in platinum-resistant ovarian cancer. J Ovarian Res. 2014, 7:38. (査読あり)

Takai M, Terai Y, Kawaguchi H, Ashihara K, Fujiwara S, Tanaka T, Tsunetoh S, Tanaka Y, Sasaki H, Kanemura M, Tanabe A, Ohmichi M. The EMT (epithelial-mesenchymal-transition) related protein expression indicates the metastatic status and prognosis in patients with ovarian cancer. J Ovarian Res. 2014, 7:76. (査読あり)

〔学会発表〕(計 6 件)

芦原敬允、寺井義人、古形祐平、藤田和也、小野賀大、藤原聡枝、田中良道、田中智人、佐々木浩、恒遠啓示、金村昌徳、田辺晃子、**大道正英** シスプラチン内包 CD24 高分子ミセルを用いた難治性卵巣癌モデルへの治療応用 第 14 回日本婦人科がん分子標的研究会 2015 年 7 月 17 日～18 日 長野県 美ヶ原温泉ホテル翔峰

芦原敬允、田中良道、田中智人、佐々木浩、

恒遠啓示、田辺晃子、金村昌徳、寺井義人、**大道正英** シスプラチン内包 CD24 高分子ミセルの開発とマウス難治性卵巣癌モデルへの治療応用 第 67 回日本産科婦人科学会 2015 年 4 月 9 日～12 日 神奈川県 パシフィコ横浜

芦原敬允、田中良道、恒遠啓示、田辺晃子、金村昌徳、寺井義人、**大道正英** 卵巣癌における CD24 の発現意義と機能解析について 第 66 回日本産科婦人科学会 2014 年 4 月 18 日～20 日 東京都 東京国際フォーラム

寺井義人 難治性卵巣癌の浸潤・転移に関わる分子をターゲットとして新規治療法の開発 第 66 回日本産科婦人科学会 2014 年 4 月 18 日～20 日 東京都 東京国際フォーラム

寺井義人 婦人科癌の浸潤転移における EMT の意義と EMT 制御をターゲットとした新規治療の基礎的研究 第 53 回日本婦人科腫瘍学会 2013 年 11 月 23 日～24 日 岡山県 岡山コンベンションセンター

中村起代子、田中良道、川口浩史、高井雅聡、愈史夏、藤原聡枝、田中智人、恒遠啓示、田辺晃子、金村昌徳、寺井義人、**大道正英** 上皮間葉転換(EMT)を介した浸潤・転移の制御を目指して～CD24 の機能解析～ 第 65 回日本産科婦人科学会 2013 年 5 月 10 日～12 日 北海道 ロイトン札幌

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大道 正英 (Ohmichi Masahide)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10283764

### (2) 研究分担者

田辺 晃子 (Tanabe Akiko)  
大阪医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号：70454543

寺井 義人 (Terai Yoshito)  
大阪医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：90278531

金村 昌徳 (Kanemura Masanori)  
大阪医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号：40298782

恒遠 啓示 (Tsunetoh Satoshi)  
大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70388255

林 正美 (Hayashi Masami)  
大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号：00551748

兪 史夏 (Yoo Saha)  
大阪医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80625674

田中 良道 (Tanaka Yoshimichi)  
大阪医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10625502