

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462508

研究課題名(和文) 遺伝子治療を目指したCarbonyl reductaseの腫瘍縮小機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of inhibitory effect of Carbonyl reductase on cancers aiming to gene therapy

研究代表者

横山 良仁 (Yokoyama, Yoshihito)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：90261453

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)：2種類のヒト卵巣癌細胞株にCR1-cDNAを導入、強発現させることで腫瘍増殖が有意に抑制されることを確認した。その機序にTNFRを介した反応が関与している可能性を考慮し、摘出腫瘍においてTNFR-1とTNFR-2の発現を確認したところTNFR-1の発現強度が強かった。CR1強発現腫瘍における抗腫瘍効果にはTNFR-1を介したアポトーシスが関与している可能性が示唆された。TNFRを介したシグナル伝達のうち、death domainを介してcaspaseを活性化する経路が優位に働き、逆にNF- κ Bやc-junを活性化する経路が抑制されることにより、腫瘍増殖が抑制されていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Tumor growth was significantly suppressed in mice injected with CR1-overexpressing cells. Tumor volume in the CR1 induction group decreased temporarily until 2 weeks. Tumor cell membranes in both CR1 induction and control groups were positive for TNFR1 expression; however, total protein levels did not differ between the two groups. TNFR-2 expression was comparatively weak in both groups. The expression of NF- κ B and c-Jun was weaker in the CR1 induction group than in control. In contrast, caspase-8 and caspase-3 expression was higher in the CR1 induction group. Furthermore, the number of apoptotic cells was significantly greater in tumors that appeared after injections of both types of CR1-overexpressing cells than in those of control cancer cells. These results suggest that CR1 induces apoptosis by activating the caspase pathway via binding to TNFR1.

研究分野：医歯薬学 外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：Carbonyl reductase Ovarian cancer アポトーシス 腫瘍縮小 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

複数の卵巢癌細胞を用いて担癌マウスモデルと癌性腹膜炎マウスモデルを用いた実験的卵巢癌において、核内受容体 Peroxisome proliferator-activated receptor であるクロフィブリン酸の投与により、卵巢癌のKey drugの一つであるシスプラチンと同等の腫瘍縮小効果と生存期間の延長が得られることを見いだした。クロフィブリン酸投与により腫瘍内に Carbonyl reductase (CR)が誘導され PGE₂の減少を介して腫瘍内の血管新生の減少、腫瘍細胞のアポトーシスの増加から腫瘍の増大が抑制されることが判明した。また、マウスの卵巢癌細胞に CR の cDNA を導入した皮下担癌マウスの実験系では、CR を導入していないコントロールの細胞は時間と共に腫瘍径が増加していくのに対し、CR が強発現している細胞では一旦増大した腫瘍が自然に退縮していくという、非常に興味深い結果となった。CR 導入細胞群では、腫瘍細胞のアポトーシスと腫瘍の壊死が見られ、マクロファージ等の免疫細胞による貪食像が目立っていた。腫瘍細胞内と間質には、貪食細胞に対する eat-me signal である Milk fat globule EGF factor 8 が強発現しており、これはコントロール群では認められなかった現象である。CR の発現が腫瘍の進展の抑制に関与していることが示唆されたが、腫瘍細胞がアポトーシスに至る経路や貪食されるに至る経路は不明である。しかし、腫瘍周囲のマクロファージから産生される TNF が関与している可能性が推察される。TNF のレセプターにはデスドメインを欠損する TNFR2 と、それを有する TNFR1 とが存在し、TNFR1 はデスドメインを介していくつかの伝達物質と DISC (death-inducing signaling complex)と呼ばれる複合体を形成し、蛋白分解酵素である Caspase-8、Caspase-3 を介してがん細胞にアポトーシスを誘導する。

一方、TNF の TNFR2 を介した反応として NF- κ B や AP-1 などの転写因子の活性化も知られており NF- κ B の活性化はアポトーシスに抑制的に働くため、デスドメインを介したものは正反対の結果をもたらす。また、NF- κ B や AP-1 の活性化は炎症性サイトカインの増加をもたらし、PGE₂の増加を介してアポトーシスの抑制や VEGF の増加による血管新生を促進して、腫瘍の増殖をもたらす。これらの事実から、CR は腫瘍細胞で発現する TNFR1 を促進するとともに TNFR2 を抑制し、腫瘍細胞の運命を決定しているとの仮説をもつに至った。

2. 研究の目的

- 1) 腫瘍細胞で実際にTNFR1を介した Caspase-8,3の誘導やTNFR2を介したNF- κ B やAP-1の活性化が起こっているか？
- 2) コントロール細胞とCR導入細胞での TNFR1とTNFR2の発現の違いがあるか？
- 3) CR導入細胞でTNFR1を介した Caspase-8,3の誘導やTNFR2を抑制したNF- κ BやAP-1の不活化が起こるか？
- 4) CR発現の強弱による腫瘍進展に違いがあるか？担癌マウスモデルの実験的卵巢癌において、CR導入細胞の腫瘍とsiRNAでCRをknockdownした場合の腫瘍の両者の腫瘍増殖、転移様式を比較する。
- 5) 遺伝子治療を目指したデンドリマーを利用したCRの細胞内への輸送の至適条件を決定する。

3. 研究の方法

ヒト卵巢漿液性腺癌細胞株である OVCAR-3 とヒト卵巢明細胞腺癌細胞株である TOV-21G の 2 種類の上皮性卵巢癌細胞株を使用した。

- 1) 2 種類の細胞株に GFP 付きの CR1-cDNA を導入し、48 時間培養した。蛍光顕微鏡で CR1 の発現を確認して細胞を回収し、Western blot でも CR1 の発現を確認

- 認した。
- 2) CR1 強発現細胞とコントロール細胞をそれぞれ 5.0×10^6 個に調整し 8 週齢のヌードマウスの皮下に移植し皮下担癌モデルを作製した。CR1 強発現群 (n=5) とコントロール群 (n=5) に分けて経時的に腫瘍体積を計測した。3~4 週間後に皮下腫瘍を摘出し腫瘍重量を比較した。摘出した皮下腫瘍の病理組織所見を比較、またアポトーシス細胞の数について免疫染色を用いて比較検討した。
 - 3) 摘出した皮下腫瘍を用いて TNFR-1 と TNFR-2 の発現強度を免疫組織学的に検討した。TNFR-1 の活性化によって誘導され、アポトーシスを促進する caspase-8,3 や、TNFR-1,2 の活性化によって誘導され抗アポトーシスや炎症促進に関与するとされる NF- κ B、c-jun について、その発現強度を免疫組織染色と Western blot を用いて比較検討した。ヒト卵巣漿液性腺癌から樹立した細胞株の HRA と DISS を使用した。
 - 4) HRA、DISS に PAMAM dendrimer を用いて CBR1 DNA を導入した。GFP タグ付きの DNA を用いて、癌細胞への DNA の導入状況を蛍光顕微鏡で確認した。N/P 比 (dendrimer の窒素残基数と DNA のリン酸基数の比) を 5:1~30:1 に設定し、効率的な N/P 比の検討を行った。さらにウエスタンブロット法で CBR1 DNA を導入した癌細胞での CBR1 の発現レベルを N/P 比と導入時間で比較した。
 - 5) N/P 比を 5:1~25:1 として CBR1 DNA と dendrimer 複合体を癌細胞に導入し、癌細胞の増殖能の差異を吸光度法で比較した。
 - 6) 癌性腹膜炎のマウスモデルを用いて CBR1 の抗腫瘍効果を検討した。8 週齢のヌードマウスに HRA を腹腔内投与することで癌性腹膜炎モデルを作製した。

コントロール群 (n=5) と CBR1 DNA 導入群 (n=5) の 2 群に分け、コントロール群には PBS のみを隔日投与し、CBR1 DNA 導入群には CBR1 DNA と dendrimer の複合体を隔日投与した。癌細胞を腹腔内投与した当日を Day0 として Day1 よりそれぞれの薬液投与を開始し、生存期間と腹腔内所見を比較した。コントロール群では Day25 に全例死亡し、DNA 導入群では Day24 以降に薬液の投与を中止し、自然経過観察とした。

4. 研究成果

- 1) 両細胞株において、導入後 48 時間後に蛍光顕微鏡において CR1-cDNA の導入を確認でき、Western blot においても CR1 導入群で強陽性を確認できた。導入効率は両細胞株で同程度であった。
- 2) 両細胞株において、CR1 強発現群で有意に腫瘍増殖が抑制された。OVCAR-3 では腫瘍作成後 12 日目、TOV-21G では 18 日目以降に有意差が認められ、腫瘍摘出時の腫瘍体積、重量ともに CR1 強発現群で有意に小さかった (各々 $P < 0.001$)。
- 3) OVCAR-3、TOV-21G の摘出腫瘍の HE 染色所見では、コントロール群で腫瘍細胞が密に増生しているのに対し、CR1 強発現群においては広範囲に壊死所見を認めた。アポトーシス細胞の数を比較したところ、CR1 強発現群で有意にアポトーシス細胞の数が多かった (各々 $P < 0.0001$)。
- 4) 腫瘍細胞の細胞膜において、TNFR-1 の発現が確認された。TNFR-1 は TNFR-2 より染色強度が強かった。CR1 強発現群では caspase-8、caspase-3 がコントロール群に比べて強発現しており、一方、NF- κ B、c-jun はコントロール群に比べて CR1 強発現群で抑制されていた。これは OVCAR-3、TOV-21G 両細胞株の腫瘍

で同様の結果であった。

- 5) CBR1 DNA 導入から 48 時間後まで CBR1 DNA の取り込みが増加し、種々の N/P 比の中で 20:1 が最も良好だった。さらにウエスタンブロット法で、コントロールの細胞よりも CBR1 DNA を導入した細胞で CBR1 の発現が増強している事を確認し、HRA、DISS とともに CBR1 の発現は N/P 比が 20:1、導入時間が 48 時間の場合で最も良好だった。
- 6) 2) HRA、DISS で N/P 比 20:1 および 25:1 の際に細胞増殖が有意に抑制された。
- 7) マウス癌性腹膜炎モデルにおいて、コントロール群では Day 25 までに全例死亡した。一方、Day 25 の時点で CBR1 DNA 導入群では全例生存していた。Day 24 以降は CBR1 DNA 導入を中止して経過を観察した。CBR1 DNA 導入を中止して 8 日目に 1 例死亡し、Day 50 までに全例死亡した。コントロール群と比較して CBR1 DNA 導入群の生存日数は統計学的にも有意に延長した ($P < 0.01$)。またコントロール群では高度の播種性病巣と血性腹水の貯留を呈していたのに対し、CBR1 DNA 導入群では播種病巣も腹水貯留も軽微であった。

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 21 件)

以下はすべて査読あり。

1. Futagami M, Yokoyama Y, Sato T, Hirota K, Shimada K, Miyagi E, Suzuki N, Fujiwara M. Palliative care for patients with gynecologic cancer in Japan: a Japan Society of Gynecologic Palliative Medicine (JSGPM). *Asia Pac J Cancer Prev* 2016; 17; 4637-4642. DOI: 10.22034/APJCP.2016.17.10.4637
2. Miura R, Yokoyama Y, Shigeto T,

Futagami M, Mizunuma H, Kurose A, Tsuruga K, Sasaki S, Terui K, Ito E. Dysgerminoma developing from an ectopic ovary in a patient with WAGR syndrome: A case report. *Mol Clin Oncol*, 2016; 5: 503-506. DOI:

10.3892/mco.2016.1004

3. Mizunuma M, Yokoyama Y, Futagami M, Horie K, Watanabe J, Mizunuma H. FOXP1 forkhead transcription factor is associated with the pathogenesis of endometrial cancer. *Heliyon* 2016; 2: e00116. DOI: 10.1016/j.heliyon.2016.e00116
4. Nakagawa J, Terui K, Hosoi K, Ueno K, Yokoyama Y, Hayakari M. Passage of irinotecan and its active metabolite, SN-38, into human milk. *J Clin Pharm Ther* 2016; 41: 579-582. DOI: 10.1111/jcpt.12428
5. Sugiyama T, Okamoto A, Enomoto T, Hamano T, Aotani E, Terao Y, Suzuki N, Mikami M, Yaegashi N, Kato K, Yoshikawa H, Yokoyama Y, Tanabe H, Nishino K, Nomura H, Kim JW, Kim BG, Pignata S, Alexandre J, Green J, Isonishi S, Terauchi F, Fujiwara K, Aoki D. The randomized phase 3 trial of irinotecan plus cisplatin compared with paclitaxel plus carboplatin as first line chemotherapy for ovarian clear cell carcinoma: JGOG3017/GCIG Trial. *J Clin Oncol* 2016; 34: 2881-2887. DOI: 10.1200/JCO.2016.66.9010
6. Yokoyama Y, Futagami M, Watanabe J, Sakuraba A, Nagasawa K, Maruyama H, Sato S. The advantage of incorporating liquid-based cytology (TACAS™) in mass screening for cervical cancer. *Hum Cell* 2016; 29: 83-90.

- DOI: 10.1007/s13577-015-0130-6
7. Yokoyama Y, Shigeto T, Miura R, Kobayashi A, Mizunuma M, Yamauchi A, Futagami M, Mizunuma H. A strategy using photodynamic therapy and clofibrac acid to treat peritoneal dissemination of ovarian cancer. *Asia Pac J Cancer Prev* 2016; 17: 775-779.
DOI:<http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.2.775>
 8. Kobayashi A, Yokoyama Y, Osawa Y, Miura R, Mizunuma H. Gene therapy for ovarian cancer using carbonyl reductase 1 DNA with a polyamidoamine dendrimer in mouse models. *Cancer Gene Ther* 2016; 23: 24-28. DOI: 10.1038/cgt.2015.61
 9. Miura R, Yokoyama Y, Shigeto T, Futagami M, Mizunuma H. Inhibitory effect of carbonyl reductase 1 on ovarian cancer growth via tumor necrosis factor signaling. *Int J Oncol* 2015; 47: 2173-2180. DOI: 10.3892/ijo.2015.3205
 10. Luchini C, Veronese N, Solmi M, Cho H, Kim JH, Chou A, Gill AG, Faraj SF, Chau A, Netto GJ, Nakayama K, Kyo S, Lee SY, Kim DW, Yousef GM, Scorilas A, Nelson GS, Köbel M, Kalloger SE, Schaeffer DF, Yan HB, Liu F, Yokoyama Y, Zhang X, Pang D, Sergi G, Manzato E, Capelli P, Scarpa A, Correll CU. Prognostic role and implication of mutational status of tumor suppressor gene ARID1A in cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2015; 6: 39088-97 DOI: 10.18632/oncotarget.5142.
 11. Yokoyama Y, Ito K, Takamatsu K, Takehara K, Nakanishi T, Harano K, Watari H, Susumu N, Aoki D, Saito T. How do Japanese gynecologists view hormone replacement therapy for survivors of endometrial cancer? Japanese Gynecologic Oncology Group (JGOG) survey. *Int J Clin Oncol* 2015; 20: 997-1004.
DOI: 10.1007/s10147-015-0808-5
 12. Mizunuma M, Yokoyama Y, Futagami M, Aoki M, Takai Y, Mizunuma H. The pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts therapeutic response to radiation therapy and concurrent chemoradiation therapy in uterine cervical cancer. *Int J Clin Oncol* 2015; 20: 989-996. DOI: 10.1007/s10147-015-0807-6
 13. Futagami M, Yokoyama Y, Iino K, Aoki M, Shoji T, Sugiyama T, Ariga H, Tokunaga H, Takano T, Watanabe Y, Yaegashi N, Jingu K, Sato N, Terada Y, Anbai A, Ohta T, Kurachi H, Kuroda Y, Nishiyama H, Fujimori K, Watanabe T, Sato H, Tase T, Wada H, Mizunuma H. Investigation of the clinicopathological features of squamous cell carcinoma of the vulva: a retrospective survey of the Tohoku Gynecologic Cancer Unit. *Int J Clin Oncol* 2015; 20: 1005-1011. DOI: 10.1007/s10147-015-0803-x
 14. Osawa Y, Yokoyama Y, Shigeto T, Futagami M, Mizunuma H. Decreased expression of carbonyl reductase 1 promotes ovarian cancer growth and proliferation. *Int J Oncol* 2015; 46: 1252-1258. DOI: 10.3892/ijo.2014.2810
 15. Otsuki A, Watanabe Y, Nomura H, Futagami M, Yokoyama Y, Shibata K, Kamoi S, Arakawa A, Nishiyama H, Katsuta T, Kudaka W, Shimada M, Sato N, Kotera K, Katabuchi H, Yaegashi N. Paclitaxel and Carboplatin in Patients with Completely or Optimally Resected

- Carcinosarcoma of the Uterus: a Phase II trial by the Japanese Uterine Sarcoma Group and the Tohoku Gynecologic Cancer Unit. *Int J Gynecol Cancer* 2015; 25: 92-97. DOI: 10.1097/IGC.0000000000000302
16. Matsushita Y, Yokoyama Y, Yoshida H, Osawa Y, Mizunuma M, Shigeto T, Futagami M, Imaizumi T, Mizunuma H. The level of RECQL1 expression is a prognostic factor for epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2014; 7: 107. doi:10.1186/s13048-014-0107-1.
17. Tamura Y, Yokoyama Y, Yoshida H, Imaizumi T, Mizunuma H. 4-Methylumbelliferone inhibits ovarian cancer growth by suppressing thymidine phosphorylase expression. *J Ovarian Res* 2014; 7: 94. DOI: 10.1186/s13048-014-0094-2
18. Matsumura Y, Yokoyama Y, Shigeto T, Futagami M, Mizunuma H. The prophylactic effects of a traditional Japanese medicine, goshajinkigan, on paclitaxel-induced peripheral neuropathy and its mechanism of action. *Mol Pain* 2014; 10: 61. DOI:10.1186/1744-8069-10-61
19. Shoji T, Takatori E, Kaido Y, Omi H, Yokoyama Y, Mizunuma H, Kaiho M, Otsuki T, Takano T, Yaegashi N, Nishiyama H, Fujimori K, Sugiyama T. A phase I study of irinotecan and pegylated liposomal doxorubicin in recurrent ovarian cancer (Tohoku Gynecologic Cancer Unit 104 study). *Cancer Chemother Pharmacol* 2014; 73: 895-901. DOI: 10.1007/s00280-014-2418-8
20. Watanabe J, Yokoyama Y, Futagami M, Mizunuma H, Yoshioka H, Washiya K, Hana K Endou H, Okayasu I. L-type Amino Acid Transporter 1 (LAT1) Expression Increases in Well-differentiated but Decreases in Poorly Differentiated Endometrial Endometrioid Adenocarcinoma, and Shows an Inverse Correlation With p53 Expression. *Int J Gynecol Cancer* 2014; 24: 659-663. DOI: 10.1097/IGC.0000000000000123
21. Hirakawa H, Yokoyama Y, Yoshida H, Mizunuma H. Inhibitory effects of aromatase inhibitor on estrogen receptor-alpha positive ovarian cancer in mice. *J Ovarian Res* 2014; 7: 4. DOI: 10.1186/1757-2215-7-4.
- 〔学会発表〕(計 20 件)
1. Yoshihito Yokoyama, et al. Decreased ARID1A expression is correlated with chemo-resistance in epithelial ovarian cancer. 第 15 回国際婦人科腫瘍学会学術会議、2014 年 11 月 6 日-11 月 11 日、メルボルン (オーストラリア)
 2. Aisa Yamauchi, Yoshihito Yokoyama, et al. The clinicopathological features of relapsed stage IA endometrial cancer. 第 18 回欧州癌会議、2015 年 9 月 25 日-9 月 29 日、ウィーン (オーストリア)
 3. Masayuki Futagami, Yoshihito Yokoyama, et al. How does the serum CA125 level change in relapsed ovarian cancer? 第 18 回欧州癌会議、2015 年 9 月 25 日-9 月 29 日、ウィーン (オーストリア)
 4. 横山良仁他、ロボット支援下広汎子宮全摘術の現状. 第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会、2016 年 4 月 21 日-4 月 24 日、東京国際フォーラム(東京都)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
横山良仁 (YOKOYAMA YOSHIHITO)
弘前大学・医学研究科・教授
研究者番号：90261453
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
なし
 - (4) 研究協力者
なし