

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462533

研究課題名(和文) 癌幹細胞マーカーCD44v9を標的とした難治性卵巣がんの治療戦略

研究課題名(英文) The CD44v9-targeted therapy for intractable ovarian cancer

研究代表者

棚瀬 康仁 (Tanase, Yasuhiro)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20423915

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)：子宮内膜症性嚢胞と子宮内膜症関連卵巣癌において、CD44v9とDNA損傷マーカーである8-OHdGについて免疫染色を行った。卵巣癌を合併した子宮内膜症においてはCD44v9の発現は低下、8-OHdGは発現が上昇していた。また、8-OHdGとCD44v9の発現には負の相関を認めた。CD44v9と8-OHdGの発現の変化が、子宮内膜症の悪性転化と関連している可能性が示唆された。またCD44v9を発現している卵巣明細胞癌細胞株に、抗癌剤とシスチントランスポーター(xCT)阻害剤の併用実験を行ったところ、細胞増殖能は相対的に低下した。xCT阻害剤の併用は、抗癌剤感受性を高める可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The endometriotic epithelial cells of benign OE (ovarian endometrioma) and endometriotic lesions adjacent to clear cell carcinoma tumorous tissue (CCC endometriotic tissues) were immunostained for CD44v9 and 8-OHdG. In CCC endometriotic tissues, CD44v9 expression was downregulated, and 8-OHdG was upregulated compared to benign OE. And a significant negative correlation between CD44v9 and 8-OHdG expression was identified. Alterations in CD44v9 and 8-OHdG may be associated with malignant transformation of benign OE. In the CCC cell line which expressed CD44v9, the xCT inhibitor sulfasalazine with anticancer agents had inhibited the cell growth. The combination chemotherapy with xCT inhibitor may become an effective therapy for CCC.

研究分野：婦人科腫瘍学

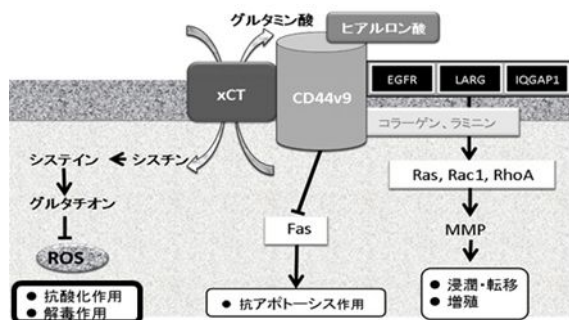
キーワード：癌幹細胞マーカー 卵巣がん分子マーカー 明細胞癌治療 スルファサラジン

1. 研究開始当初の背景

1925年にSampsonらが子宮内膜症と卵巣癌の関連を公表して以来、病理学的に子宮内膜症から卵巣癌が発生することを示唆する所見が数多く示されてきた。我々は、17年間にわたる前方視的疫学研究から、子宮内膜症の約1%が将来明細胞癌や類内膜癌といった卵巣癌を発症することを報告した。子宮内膜症上皮は、陳旧性の血液を含む特殊な環境下におかれ、ヘモグロビン由来と考える鉄を過剰に含み、フェントン反応による強力な活性酸素により持続的に細胞傷害を受け発癌すると考えている。

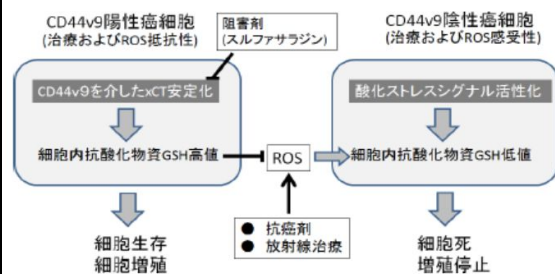
CD44はヒアルロン酸をはじめとする細胞外マトリックスと結合する接着分子で、白血球や線維芽細胞、上皮細胞、腫瘍細胞など広汎な細胞に発現する。CD44の主な機能として、細胞外マトリックスとの接着、リンパ球の活性化、ホーミング、細胞移動、癌細胞の増殖転移が挙げられる。20個のエキソンより構築され、10個のエキソン(v1~v10)は選択的にスプライシングされ、バリエーションフォームが形成される(CD44v)。このCD44vは様々ながん細胞において特異的に過剰発現して増殖・浸潤・転移と密接に関係し、単なる接着因子ではなく、様々なシグナル伝達に関わっていると言われている。近年では癌幹細胞マーカーとして注目を集めている。

CD44vの内、中でもCD44v9は細胞膜上でシスチン・グルタミン酸トランスポーター(xCT)と結合し安定化し、細胞内へのシスチンの取り込みを増加させる。シスチンは細胞内で、システイン グルタチオン(GSH)に還元化される。CD44v9は、結果的にこのGSHの生成を促進することでROS抵抗性を高めて治療抵抗性に寄与することを近年我々は報告している。



今回、子宮内膜症や子宮内膜症由来の明細胞腺癌において、このCD44v9とその下流遺伝子の発現等を調べることで、これらが発癌に関与していることを確認するだけでなく、将来的に血清学的手法を用いた発癌の予知が可能となり得る可能性も秘めている。また、これまでの報告を再検討すると、明細胞腺癌の治療の標的となり得る遺伝子・蛋白発現異常として、PIK3CA, ARID1A, ZNF217, mTOR, PTEN, HIF-1α, VEGF, HNF-1β, EGFR等が挙げられる。これらは主に、細胞

増殖、血管新生、浸潤の促進に関与しており、特にmTORやVEGFの阻害剤は、臨床応用に最も近い分子標的薬として期待されているが、その効果は現時点では不明である。近年、癌幹細胞マーカーであるCD44のバリエーションフォームが細胞のROS抵抗性を亢進させる機能が解明され、治療抵抗性に寄与していることがわかってきた。我々は免疫組織学的な予備実験を行い、明細胞腺癌において、特異的にCD44v9が過剰発現していることを確認した。細胞周期が遅いこと、Annexin4の変異・過剰発現などが明細胞腺癌の抗癌剤抵抗性の機序として考えられていたが、今回の研究にあたり我々は、CD44v9によるROS抵抗性が抗癌剤抵抗性のさらなる要因であるとの仮説を立てた。この点に着目した分子標的薬の研究はこれまでに無い。CD44v9は細胞膜上のxCTと結合し、還元型グルタチオン(GSH)の生成を促進してROS抵抗性を高めることで、治療抵抗性を惹起し、また悪性細胞の生存・増殖を誘導する。今回の研究で我々はxCT特異的阻害剤であるスルファサラジン(炎症性腸疾患や関節リウマチにおいて臨床応用されている)を用いる。本薬剤の悪性腫瘍に対する治療可能性を考慮した研究は未だ無く、明細胞腺癌細胞株における治療効果を検討することは、新たな治療の確立に寄与し極めて有意義と考える。



2. 研究の目的

子宮内膜症から卵巣癌が高頻度に発生することは知っているが、我々はチョコレート嚢胞内容液中の鉄による持続的な酸化ストレス(ROS)が発癌に関与していることを報告した。内膜症由来の卵巣癌は特定の組織型を示し、特に高頻度にみられる明細胞癌は、化学療法に抵抗性を示し予後不良である。近年CD44は癌幹細胞マーカーとして注目され、そのバリエーションフォーム(CD44v)にはROSに対する抵抗性を亢進させる機能があり、癌治療抵抗性に寄与していることがわかってきた。我々は、すでに明細胞癌において高頻度にCD44v9が発現することを明らかにしてきた。今回、CD44v9の発癌や抗癌剤耐性獲得への関与を解明し、新たな分子マーカーとしての血清診断と新たな分子標的治療を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 子宮内膜症・内膜症由来卵巣明細胞癌の保存血清・組織標本を用いた CD44v9、ROS マーカーの血清診断および免疫組織学的検討

血清診断マーカーの有用性検討

当院での周術期にサンプリングされた子宮内膜症性嚢胞、卵巣癌、コントロール症例の保存血清を用いて、ELISA 法で CD44v9、xCT、ROS マーカー(8-OHdG)等を測定し、その陽性率をこれまで子宮内膜症のマーカーとされてきた CA125 と比較する。これらの検討から明細胞癌特有の血清診断マーカーを同定する。

免疫組織学的検討

当院で摘出した子宮内膜症性嚢胞、内膜症由来の明細胞癌、内膜症非合併の明細胞癌のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、CD44v9、xCT、ROS マーカー(8-OHdG)等の発現を免疫組織染色にて検討する。特に、子宮内膜症と明細胞癌を発症した内膜症を免疫組織学的に比較検討することで、CD44v9 や ROS による DNA 損傷と発癌の関係を推測する。

2) 明細胞癌の培養細胞における CD44v9 遺伝子ノックダウンと下流遺伝子群の動態

明細胞癌培養細胞株を用いたノックダウン実験

CD44v9 が発現している明細胞癌培養細胞株 TOV, KOC, TUO を用いて、その発現を RNA 干渉法により抑制し、下流遺伝子群の動態を調べる。候補遺伝子産物の発現の変化をウェスタンブロットで確認するとともに、CD44v9 の有無で細胞増殖能や ROS 耐性能等が変化するかどうか調べる。

明細胞癌培養細胞株に対し CD44v9 ノックダウン、CD44v9 特異抗体を用いた抗癌剤感受性試験

CD44v9 は ROS 抵抗性を獲得することから、細胞表面の CD44v9 発現を siRNA による CD44v9 ノックダウンや CD44v9 特異的中和抗体を用いて修飾しながら、ROS 生成を誘導する抗癌剤であるシスプラチンを併用することで、明細胞癌培養細胞株においてシスプラチンの感受性を増強させることができるかを評価する。

また、上記ノックダウンの実験において、抗癌剤抵抗性に関与する標的分子を認めた場合は、その阻害剤に関しても同様に評価を行う。

3) 明細胞癌の培養細胞における抗癌剤 with/without スルファサラジン(xCT 特異的阻害剤)の抗癌剤感受性試験

明細胞癌培養細胞株に対してスルファサラジンを用いた抗癌剤感受性試験

CD44v9 は xCT と結合し、ROS 抵抗性を獲得する。このため、xCT 阻害剤であるスルファサラジンと ROS 生成を誘導する抗癌剤であるシスプラチンを併用することで、明細胞癌培養細胞株においてシスプラチンの感受性を増強させることができるかを評価する。スルファサラジンは潰瘍性大腸炎、クローン病、関節リウマチに有効な抗炎症薬とされており、現在広く臨床応用されているが、産婦人科領域ではまだ使用されていない。

また、上記ノックダウンの実験において、xCT 以外で抗癌剤抵抗性に関与する標的分子を認めた場合は、その阻害剤に関しても同様に評価を行う。

ROS 蛍光プローブを用いた解析

各種活性酸素種 ROS の選択的検出を可能とする蛍光プローブを用いて培養細胞を可視化することにより、CD44v9 ノックイン・ノックダウン、スルファサラジン、CD44v9 中和抗体、抗がん剤の同時添加により起こると考えられる細胞内 ROS の変化を定量化する。

4) ノードマウスへの移植実験

ノードマウスへの移植実験(1): CD44v9 の発現の異なる明細胞癌を移植し、腫瘍の増殖、転移の有無を評価

ノードマウスに CD44v9 陽性(ノックイン)と陰性(ノックダウン)のヒト明細胞癌細胞株を背部皮下および腹腔内に移植する実験を行い、それぞれにおいて増殖、浸潤・転移、腹膜播種及び生存期間に差があるかを評価する。また、移植した腫瘍組織の CD44v9 の有無により ROS レベルに差があるのかを犠牲死前、もしくは屠殺後に原発巣・転移巣を摘出し蛍光プローブを用いて生化学的に検討する(Live Cell Imaging)。

ノードマウスへの移植実験(2): CD44v9 過剰発現の明細胞癌を移植し、抗癌剤とスルファサラジン(xCT 阻害剤)を併用した治療効果を評価

ノードマウスに CD44v9 陽性の明細胞癌細胞株(上記)を移植し、CD44v9 特異的中和抗体あるいは xCT 特異的阻害剤スルファサラジンを投与することで、ROS レベルに差が現れるかどうかを原発巣・転移巣を摘出し蛍光プローブを用いて生化学的に検討する。さらに、腫瘍組織内に活性酸素が蓄積し、酸化ストレスシグナルの活性化がおこっている

るかを評価する。

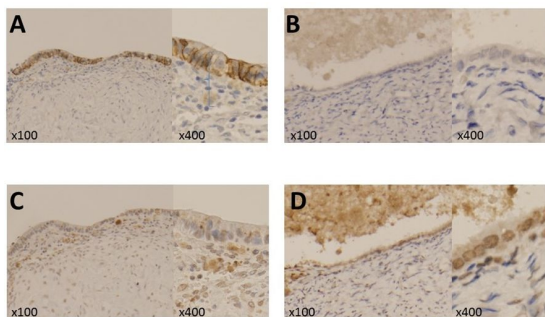
また、ROSの生成を誘導する抗癌剤であるシスプラチンと併用することで、抗腫瘍効果を増大させることができるかを評価する。それぞれの実験において増殖、浸潤・転移、腹膜播種及び生存期間に差があるかを評価する。

さらに上記実験と合わせて、シスプラチン投与後にCD44v9特異的中和抗体あるいはxCT特異的阻害剤スルファサラジンを維持化学療法として行い、その有効性評価を行う。

4. 研究成果

1) 子宮内膜症・内膜症由来卵巣明細胞癌の保存血清・組織標本を用いたCD44v9、ROSマーカーの血清診断および免疫組織学的検討

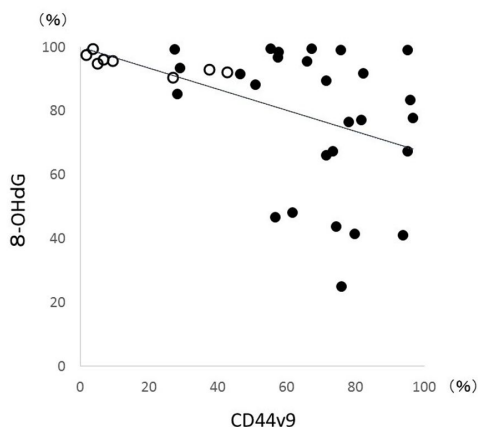
CD44v9が子宮内膜症から明細胞癌への発癌機構に関与しているかを調べるために、子宮内膜症性嚢胞と内膜症由来の明細胞癌の臨床検体を用いて、免疫組織学的検討を行った。その結果、子宮内膜症性嚢胞では、明細胞癌を合併している子宮内膜症と比較し、優位にCD44v9の発現が高いことが分かった(図1)。



(図1) 子宮内膜症性嚢胞と子宮内膜症関連卵巣癌(明細胞癌)に合併した内膜症の、組織におけるCD44v9と8-OHdGの発現の違い

A, Cは子宮内膜症性嚢胞、B, Dは明細胞癌に合併した内膜症である。A, BはCD44v9、C, Dは8-OHdGの免疫組織学的染色である。

そこで、活性酸素によるDNA損傷の指標として、8-OHdGの発現について検討した。その結果、CD44v9と8-OHdGの発現には、 $R=-0.46$ と負の相関関係を認めた(図2)。さらに、8-OHdGは40歳以上において発現が高まっており、「加齢」によってDNA損傷の機会が増え発癌のリスクが高まっている可能性が考えられた。



(図2) 組織におけるCD44v9と8-OHdGの関係

2) 卵巣明細胞癌細胞株を用いた、xCT阻害剤(スルファサラジン)の有効性評価

卵巣明細胞癌細胞株TOVを使用した。まずウエスタンブロットにより、培養細胞株におけるCD44v9の発現を確認した。このことから、卵巣明細胞癌に対しCD44v9が治療標的あるいはバイオマーカーとなる可能性が考えられた。

次に、CD44vによるシスチンの取り込みが抗酸化作用すなわち抗癌剤抵抗性を生み出すため、xCT(シスチントランスポーター)阻害薬であるスルファサラジンを用いたin vitro実験を行った。卵巣明細胞癌培養細胞株に対して、まずスルファサラジン単剤を投与したところ、細胞増殖能は有意に低下した($IC_{50}=1mM$)。これはCD44v発現癌細胞の抗酸化能が低下することで、自然発生する酸化ストレスへの感受性が高まり、癌細胞がアポトーシスに至ったと考えられる。次に、抗癌剤併用にて殺癌細胞効果に上乘せ効果を認めるかを確認するために、スルファサラジンとパクリタキセル・シスプラチン・プレオマイシン・Chk1 inhibitorとを様々な濃度で組み合わせ投与する実験を行った。

スルファサラジンを高用量で投与した場合、どの抗癌剤との組み合わせでも明らかな相加相乗効果は認めなかった。しかし、スルファサラジン単剤ではほとんど細胞増殖抑制しない程度の低用量($0.1mM$)にて投与した場合、パクリタキセルとシスプラチンとの併用において細胞増殖能は相加的に低下した。これは、少量のスルファサラジンにより抗酸化能を軽度低下させることで、抗癌剤による高度の酸化ストレスに対して感受性が非常に高まったためと考えられる。

3) 今後の展望、課題

In vitroにおいて、卵巣明細胞癌細胞株に

よる xCT 阻害剤の有効性を一部確認できた。今後は in vivo 実験として、ヌードマウスに卵巣明細胞癌培養細胞株を移植し、スルファサラジン単剤や抗癌剤併用投与を行いたいと考えている。In vivo にてスルファサラジンと抗癌剤との併用投与の有用性を確認できれば、パクリタキセルやシスプラチンは実臨床においても卵巣明細胞癌に対し使用している薬剤であるため、「スルファサラジンの上乘せ」治療が期待できることとなる。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

重富洋志、植栗千陽、伊東史学、棚瀬康仁、春田祥治、金山清二、吉田昭三、古川直人、大井豪一、小林 浩、須藤 保：子宮内膜症における CD44v9 の発現と活性酸素抵抗性。第 66 回日本産婦人科学会学術講演会。2014 年 4 月 18 日～2014 年 4 月 20 日。東京国際フォーラム(東京)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

棚瀬 康仁 (TANASE YASUHIITO)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：20423915

(2) 研究分担者

吉元 千陽 (YOSHIMOTO CHIHARU)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：00526725

重富 洋志 (SHIGETOMI HIROSHI)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：20433336

小林 浩 (KOBAYASHI HIROSHI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：40178330