

令和元年5月31日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11151

研究課題名(和文) 卵巣明細胞癌に対するKANK1を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) The KANK1 pathway may be a novel therapeutic target for ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

板持 広明 (ITAMOCHI, Hiroaki)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：20314601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞癌56例の組織検体を用い、免疫組織化学にて腫瘍組織中のAurora kinase A (Aurora-A) 発現を検討した。腫瘍組織中のAurora-A蛋白発現は96%の症例でみられた。Aurora-A中・高発現群の生存率は有意に低く、その発現強度は独立予後因子であった。明細胞癌株を用いたAurora-A阻害剤(ENMD-2076)と抗がん剤との併用効果の検討では、6株中シスプラチンとSN38で4株に相乗効果がみられたものの、パクリタキセルでは3株で拮抗作用がみられた。また、シスプラチンとENMD-2076との併用添加によりアポトーシスが著明に増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣明細胞癌において、腫瘍組織中のAurora-A蛋白発現強度は有望な予後予測マーカーであることが示唆された。また、基礎的検討においてAurora-A阻害剤とシスプラチンとの併用療法の有効性が示唆された。したがって、難治性卵巣癌の一つである明細胞癌において、Aurora-Aは重要なバイオマーカーであり、Aurora-A阻害剤は明細胞癌患者の予後を改善する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We examined the incidence of Aurora kinase A (Aurora-A) protein expression in ovarian clear cell carcinoma (OCCC) tumor tissues and its correlation with clinical parameters. In addition, we assessed the efficacy of ENMD-2076, an Aurora-A inhibitor, in combination with chemotherapeutic agents for the treatment of OCCC. The expressions of Aurora-A protein were found in 96% of OCCC. Increased Aurora-A expression was associated with significantly worse overall survival of FIGO stages IC3 to IV patients (21% vs 77%). Multivariate analysis revealed that Aurora-A expression was an independent prognostic factor for stages IC3 to IV OCCC patients. Furthermore, synergistic effects were observed with ENMD-2076 in combination with cisplatin or SN-38 in 4 of the 6 tested cell lines. ENMD-2076 dramatically enhanced apoptosis and cell cycle arrest at the G2/M phase induced by cisplatin. Aurora-A is a promising biomarker that is predictive of patient outcomes and a potential target for OCCC.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣明細胞癌 Aurora kinase A バイオマーカー シスプラチン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 上皮性卵巣癌に対するタキサン化合物とプラチナ製剤との併用化学療法は高い奏効率を示し、その短期予後を改善した。しかしながら、再発卵巣癌の多くは化学療法に抵抗性を示し、長期予後はいまだ不良である。一方、近年増加傾向にある卵巣明細胞癌は化学療法の奏効率が10%程度と非常に低く、進行例の予後は極めて不良である。卵巣癌治療において薬剤耐性は重要な予後因子であり、その克服や新規治療法の開発が切望されている。さらに、腫瘍の生物学的特性に基づいた治療の個別化や組織型別の治療法選択の必要性が指摘されている。

(2) これまでに「創薬コンセプトに基づく戦略的治療デザインの確立」卵巣がんにおける化学療法効果規定因子の探索(文部科学省次世代がん研究シーズ戦略的育成プログラム)において、明細胞癌組織検体を用いて、全エクソームシーケンス解析を行った。55例を解析した結果、KN motif and ankyrin repeat domains 1 (KANK1) 遺伝子変異が21例(38%)にみられた。正常組織では、腎尿細管や消化管上皮(大腸・胃)等でKANK1の発現が観察される。一方、KANK1遺伝子は様々ながん腫(腎癌、膀胱癌、前立腺癌、肺癌、乳癌等)でその発現の抑制あるいは欠損が報告されており、がん抑制遺伝子の一つと考えられている。しかしながら、KANK1の機能解析はいまだ十分になされておらず、その発現と癌患者の予後との関連や、KANK1経路の治療標的としての可能性も明らかでない。

### 2. 研究の目的

(1) KANK1蛋白は細胞質でのactinの重合を制御しており、細胞骨格の形成に関与するとともに細胞の浸潤・転移、細胞周期やアポトーシスを抑制すると考えられている。また、KANK1はbeta-cateninと複合体を形成することで、核内でのbeta-cateninの局在を調整しその機能を制御している。そこでbeta-cateninによる制御が示唆されているAurora kinase A (Aurora-A)に着目した。

(2) Aurora kinase A (Aurora-A)は分裂期特異的に作用するセリン/スレオニンキナーゼであり、有糸分裂において双極紡錘体形成や中心体分離、細胞質分裂に関与している。また、Aurora-Aの異常により中心体数の増加と異数体形成が促されことから、その発がんへの関与が示唆されている。これまでに、上皮性卵巣癌を含む様々な悪性疾患で、Aurora-AのmRNAや蛋白の過剰発現が報告されている。しかしながら、明細胞癌におけるAurora-A発現の臨床的意義に関する検討はなされていない。

(3) Aurora-A阻害剤であるENMD-2076は、様々な癌腫における基礎的検討でその効果が示されている。現在、明細胞癌患者を対象として、ENMD-2076を用いた第II相試験が進行中である。しかしながら、上皮性卵巣癌におけるAurora-A阻害剤と抗がん剤との併用効果についてはいまだ検討されていない。

本研究では、明細胞癌に対するENMD-2076と抗がん剤との併用効果を明らかにするとともに、Aurora-A蛋白発現が明細胞癌の予後に与える影響を知ろうとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) Aurora-Aの卵巣明細胞癌におけるバイオマーカーとしての可能性

2009年から2015年に岩手医科大学附属病院で治療を行った明細胞癌患者のうち、文書により同意の得られた56例を対象とした。初回手術時に得られた明細胞癌組織検体を用いて、Aurora-AおよびKi-67の蛋白発現を免疫組織化学で検討した。Aurora-Aの染色率と(≤5%:0、6%-25%:1、26%-50%:2、51%-75%:3、>75%:4)染色強度(陰性:0、弱陽性:1、中等度陽性:2、強陽性:3)をスコアリングし、これらの統合により蛋白発現を4グループに分類した(0-1点:無発現、2-3点:低発現、4-5点:中発現、6-7点:高発現、図1)。累積生存率はKaplan-Meier法で、有意差はlog-rank法を用いて検討するとともに、Coxの比例ハザードモデルを用いて予後因子解析を行った。

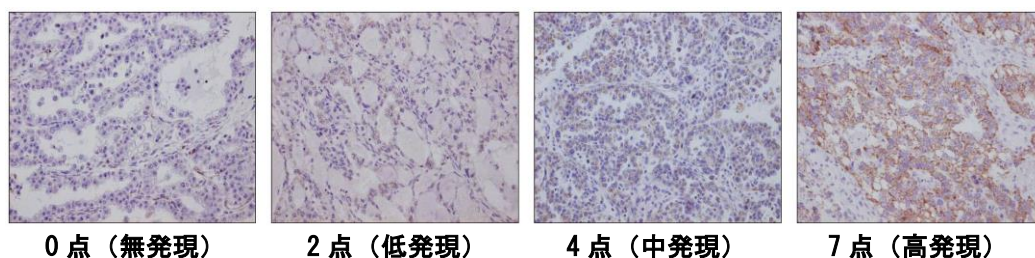


図1 免疫組織化学：Aurora-A蛋白発現

#### (2) Aurora-Aの卵巣明細胞癌に対する治療標的としての可能性

卵巣明細胞癌由来細胞株 6 株 (KK, KOC-7C, OVAS, OVMANA, RMG-I, TU-OC-1) を用いた。Aurora-A 阻害剤である ENMD-2076 と、シスプラチン (CDDP)、パクリタキセル (PTX)、ドキソルビシン (DXR) およびイリノテカンの活性体である SN-38 の細胞増殖抑制効果を WST-8 assay により検討した。ENMD-2076 と抗がん剤との併用効果は、median effect 法を用いて検索した。また、薬剤添加後のリン酸化 Aurora-A 蛋白発現をウエスタンブロット法で検討するとともに、細胞周期の変化およびアポトーシスを flow cytometry で解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Aurora-A の卵巣明細胞癌におけるバイオマーカーとしての可能性

対象症例の FIGO 進行期は IA 期 14 例、IC 期 22 例、II 期 4 例、III 期 12 例、IV 期 4 例であった。腫瘍組織中の Aurora-A 蛋白発現は 96% (54/56) の症例で観察された (無・低発現: 14 例、中・高発現群: 42 例)。一方、Ki-67 陽性細胞率 (LI) の中央値は 12.5% (0.2-53.8%) であった。Aurora-A 蛋白発現と Ki-67 LI との間に関連はみられなかった。

単変量解析では、全生存期間は FIGO 進行期 IC3-IV 期と残存腫瘍径 >1 cm で有意に短かった。Aurora-A 蛋白の中・高発現群では、陰性・弱発現群に比して予後不良の傾向がみられた (図 2A)。特に、FIGO 進行期 IC3 期-IV 期例の累積 5 年生存率は、Aurora-A 蛋白の中および高発現群では 21% であり、陰性または弱発現群の 77% に比して有意に低かった (図 2B)。多変量解析の結果、Aurora-A 蛋白染色強度は残存腫瘍径とともに独立予後因子であった (表)。

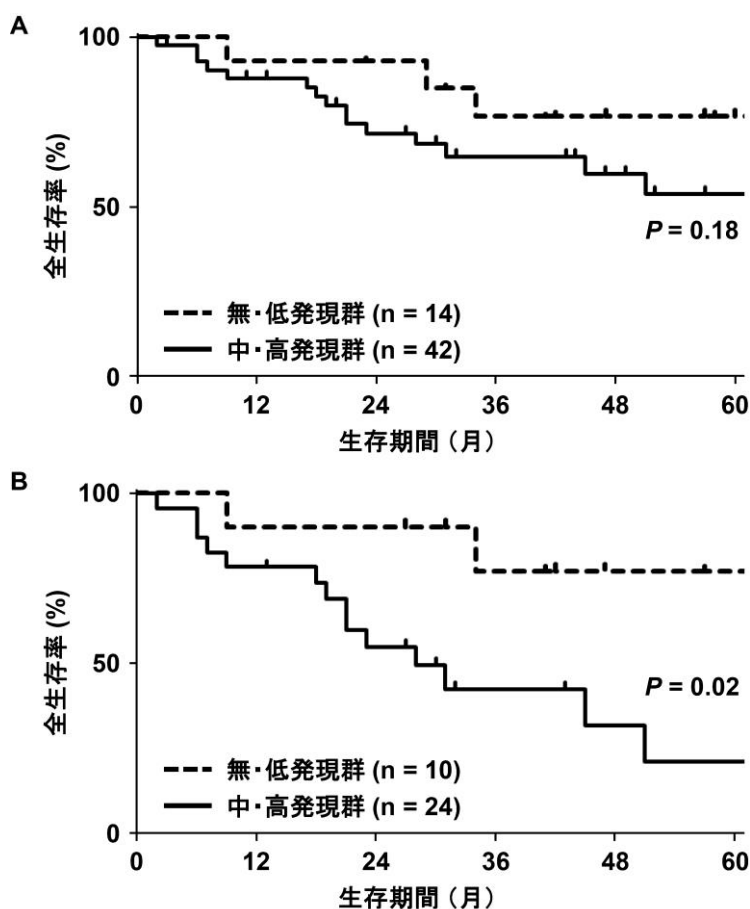


図 2 Aurora-A 蛋白発現と全生存率

表 Cox の比例ハザードモデル

因子	ハザード比 (95% 信頼区間)	P-value	
年齢	< 52歳 ≥ 52歳	3.2582 (0.9347 to 12.8980)	0.0639
FIGO進行期	IC3・II期 III・IV期	0.9824 (0.2593 to 3.7023)	0.9787
残存腫瘍径	< 1 cm ≥ 1 cm	7.7746 (1.8126 to 38.3010)	0.0058
Aurora-A	無・低発現 中・高発現	7.0381 (1.4539 to 52.0524)	0.0141

(2) Aurora-A の卵巣明細胞癌に対する治療標的としての可能性  
 明細胞癌 6 株の各薬剤に対する 50%阻害濃度 (IC50) は ENMD-2076 で 1.1-2.8  $\mu\text{mol/L}$ 、CDDP で 3.6-8.9  $\text{nmol/L}$ 、SN-38 で 9.5-42.2  $\text{nmol/L}$ 、DXR で 77-380  $\text{ng/mL}$ 、PTX で 29.9-3730  $\text{nmol/L}$  であった。ENMD-2076 と抗がん剤との併用効果の検討では、CDDP と SN-38 で 6 株中 4 株に、DXR で 3 株に相乗効果が得られたものの、PTX では 4 株で拮抗作用がみられた (図 3)。

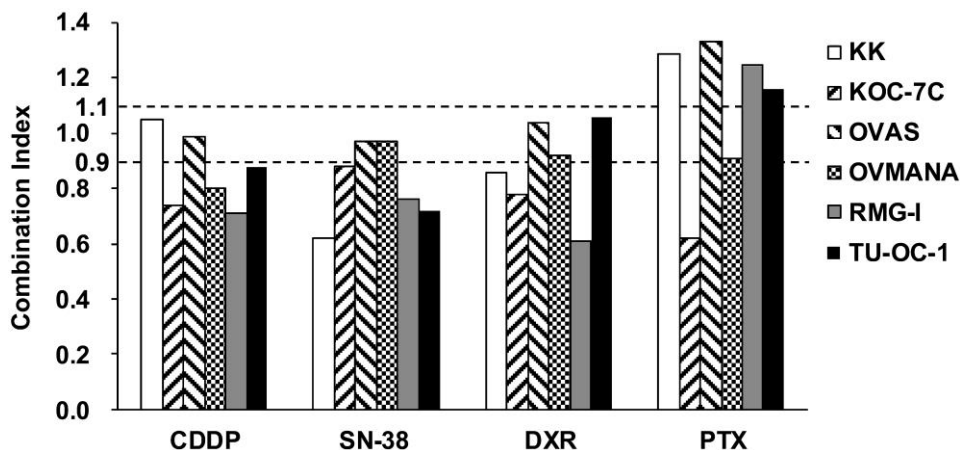


図 3 ENMD-2076 と抗癌剤との併用効果

ENMD-2076 と CDDP との併用添加により、単剤添加に比して G2/M 期細胞比率の増加が観察されるとともに、アポトーシスが有意に増加した (図 4、5)。

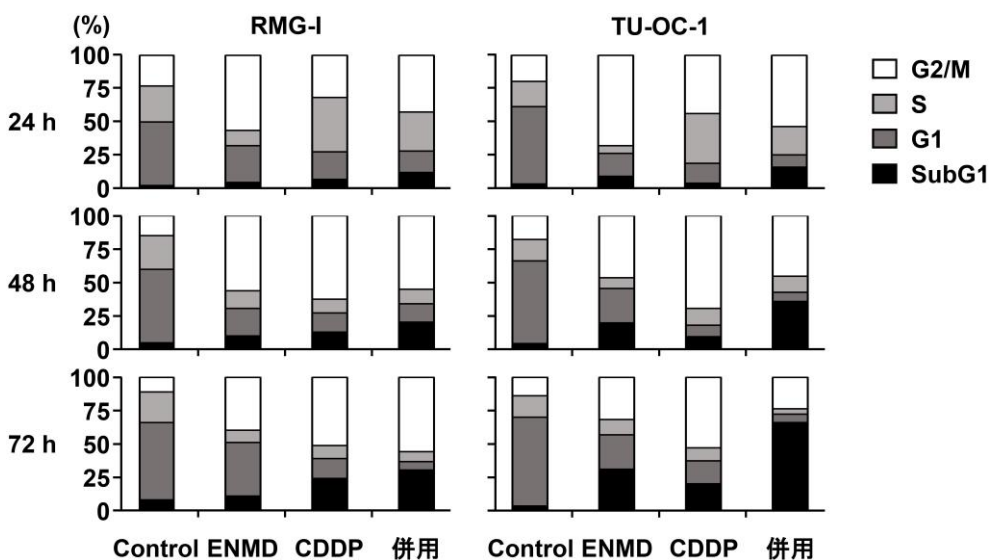


図 4 薬剤添加後の細胞周期の変化

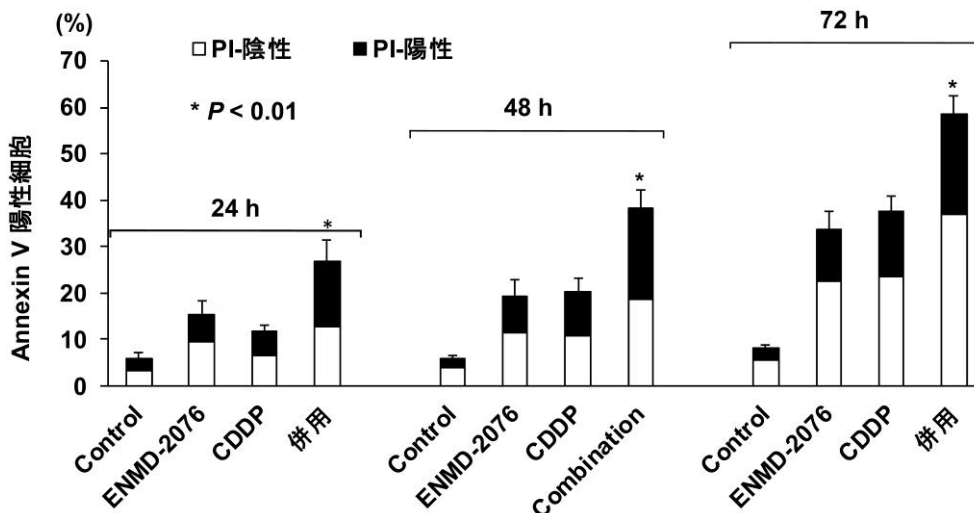


図 5 薬剤添加後のアポトーシス細胞比率

以上の成績から、難治性卵巣癌の一つである明細胞癌において Aurora-A 蛋白発現は有望な予後予測マーカーとなり得ることが示唆されるとともに、Aurora-A 阻害剤は明細胞癌患者の予後を改善する可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Chiba Y, Sato S, Itamochi H, Yoshino N, Fukagawa D, Kawamura H, Suga Y, Kojima-Chiba A, Muraki Y, Sugai T, Sugiyama T. Inhibition of Aurora Kinase A Synergistically Enhances Cytotoxicity in Ovarian Clear Cell Carcinoma Cell Lines Induced by Cisplatin: A Potential Treatment Strategy. *Int J Gynecol Cancer*. 2017; 27: 1666-1674. doi: 10.1097/IGC.0000000000001081. 査読有り
- ② Chiba Y, Sato S, Itamochi H, Suga Y, Fukagawa T, Oumi N, Oishi T, Harada T, Sugai T, Sugiyama T. Establishment and characterization of a novel uterine carcinosarcoma cell line, TU-ECS-1, with mutations of TP53 and KRAS. *Hum Cell* 2017; 30: 140-148. doi: 10.1007/s13577-016-0154-6. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

- ① 佐藤誠也、板持広明. Molecular and genetic alterations in ovarian clear cell carcinoma. 第 60 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会ワークショップ; 2018; 京都.
- ② 千葉洋平、佐藤誠也、板持広明、杉山徹. 卵巣明細胞癌に対する Aurora kinase A 阻害剤を用いた至適併用化学療法の探索. 第 76 回日本癌学会学術総会; 2017; 横浜.
- ③ Chiba Y, Sato S, Fukagawa D, Suga Y, Kagabu M, Chiba A, Takeuchi S, Itamochi H, Sugai T, Sugiyama T. Aurora-A inhibition synergistically enhances cisplatin induced cytotoxicity in ovarian clear cell carcinoma cell lines. 5th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology; 2017; Tokyo, Japan.
- ④ 千葉洋平、佐藤誠也、深川大輔、菅安寿子、永沢崇幸、小見英夫、利部正裕、千葉淳美、竹内聡、板持広明、菅井有、杉山徹. 卵巣明細胞癌における Aurora kinase A 発現の臨床的意義に関する検討. 第 65 回北日本産科婦人科学会学術講演会; 2017; 仙台.
- ⑤ 千葉洋平、佐藤誠也、板持広明、千葉淳美、吉野直人、村木靖、菅井有、杉山徹. 卵巣明細胞癌に対する Aurora kinase A を標的とした新規治療法の開発. 第 143 回東北連合産科婦人科学会総会・学術講演会; 2017; 秋田.
- ⑥ 千葉洋平、佐藤誠也、古武陽子、永沢崇幸、小見英夫、利部正裕、千葉淳美、竹内聡、板持広明、杉山徹. 卵巣明細胞癌に対する Aurora kinase A 阻害剤を用いた至適併用化学療法の探索. 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会; 2017; 広島.

[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]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：小見 英夫

ローマ字氏名：(OMI, hideo)

所属研究機関名：岩手医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：20382608

研究分担者氏名：利部 正裕

ローマ字氏名：(KAGABU, masahiro)

所属研究機関名：岩手医科大学

部局名：医学部

職名：特任講師

研究者番号（8桁）：30382609

研究分担者氏名：佐藤 誠也

ローマ字氏名：(SATO, seiya)

所属研究機関名：岩手医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：30621007

研究分担者氏名：杉山 徹

ローマ字氏名：(SUGIYAMA, toru)

所属研究機関名：岩手医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：40162903

研究分担者氏名：竹内 聡

ローマ字氏名：(TAKEUCHI, satoshi)

所属研究機関名：岩手医科大学

部局名：医学部

職名：特任准教授

研究者番号（8桁）：60252772

研究分担者氏名：小島 淳美

ローマ字氏名：(KOJIMA, atsumi)

所属研究機関名：岩手医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：60508753

## (2) 研究協力者

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。