

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20176

研究課題名(和文) 婦人科癌における癌幹細胞と関連する血管内皮細胞を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment targeting vascular endothelial cell related to cancer stem cell in gynecologic cancer.

研究代表者

内野 繭代(森繭代)(Mori-Uchino, Mayuyo)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30570452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：TP53は腫瘍抑制因子としての機能が期待されるため、細胞内のTP53の調節因子であるMDM2の阻害剤による抗腫瘍効果を検討した。これまでに、卵巣明細胞腺癌(WTp53)に対する、MDM2阻害剤(RG-7112)の抗腫瘍効果(Makii C, Oncotarget, 2016)およびPI3K/mTOR阻害剤(DS-7423)の併用による相乗効果、新規MDM2阻害剤(DS-3032b, DS-5272)およびmTOR阻害剤(Everolimus)の抗腫瘍効果について報告した。現在、血管内皮培養細胞およびマウス卵巣癌腹膜播種モデルを用いて、MDM2阻害剤の血管新生抑制効果の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：MDM2, a ubiquitin ligase, suppresses wild type TP53 via proteasome-mediated degradation. We evaluated the prognostic and therapeutic value of MDM2 in ovarian clear cell carcinoma. The anti-tumor effects of RG7112 in vivo were examined in a mouse xenograft model. MDM2 expression was significantly higher in clear cell carcinoma than in ovarian high-grade serous carcinoma and normal tissues. High MDM2 expression determined by microarray was significantly associated with poor progression-free survival and poor overall survival. Notably, RG7112 significantly suppressed cell viability in clear cell carcinoma cell lines with wild type TP53. RG7112 also strongly induced apoptosis, increased TP53 phosphorylation, and stimulated expression of the proapoptotic protein PUMA. Similarly, siRNA knockdown of MDM2 induced apoptosis. Finally, RG7112 significantly reduced the tumor volume of xenografted RMG-I clear cell carcinoma cells, and the density of microvessels.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：癌幹細胞 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

婦人科領域において、進行性・転移性卵巣癌に対する治療戦略は手術治療の完遂度に依存しており、腹腔内播種、転移が重要な予後規定因子となっている。

癌幹細胞 (Cancer stem cell: CSC) は腫瘍増殖を促進、持続させ、転移および化学療法に対する耐性を引き起こすことが知られており、近年では腫瘍内血管内皮細胞 (Tumor endothelial cell: TEC) 新生との関連が指摘されている。TEC の新生は、癌細胞から放出される VEGF など血管内皮細胞増殖因子によって誘導されることは知られており、婦人科領域では、進行卵巣癌に対し血管新生阻害剤のベバシズマブ併用化学療法が使用されているが、治療に抵抗を示す症例も多く、新たな分子標的薬の開発が望まれている。また、治療中の血管新生阻害を評価できるバイオマーカーが存在しないことも臨床問題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、癌幹細胞と血管内皮細胞の制御メカニズムの解明し、既存の血管新生阻害剤の治療効果を評価できるバイオマーカーの創出、さらにはより治療効果の高い新規血管新生阻害剤の開発を目指すことを目的とした。

CSC と TEC の制御メカニズムを解明し、癌細胞の薬剤耐性、腫瘍形成促進を促す血管内皮細胞からのシグナルを制御することが可能となれば、新規治療法の開発へ応用が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 卵巣癌の培養細胞、モデルマウスから作成した腫瘍組織、及び同意の取れた臨床検体から CSC 様細胞、TEC の分離と特性に対する蛋白、DNA、RNA 解析を行う。

(2) 婦人科癌における TEC の病態生理学的なメカニズムを制御し得る因子を新しく同定し、かつ CSC 様細胞との関連を検証することで、バイオマーカー、阻害剤開発を目指した基礎的検討を行う。

4. 研究成果

(1) 卵巣癌細胞株と血管内皮細胞 HUVEC 細胞と共培養モデルを樹立し、共培養下にて HUVEC 細胞の分化を確認した。分化への誘導を確認できたことから、癌細胞による血管新生メカニズムを視覚化できたと考えている。また、臨床検体よりスフェロイド法による癌幹細胞の樹立を行った。今後は、腫瘍内血管内皮細胞 (Tumor endothelial cell: TEC) の分子生物学的なプロファイリングを行う予定である。

(2) ベバシズマブに代わる新たな治療戦略を模索するにあたり、卵巣明細胞腺癌に着目

し、培養細胞およびマウスモデルを用いて検討を行った。卵巣明細胞腺癌は本邦において高頻度であり、化学療法におけるプラチナ抵抗性の特徴をもち、特に予後不良な組織型として知られている。また、漿液性腺癌と比較して、癌抑制遺伝子である TP53 変異率が低いこと、PI3K 経路が高頻度に活性化していることが知られている。TP53 は細胞周期やアポトーシス、オートファジー、細胞老化に関わる重要な腫瘍抑制因子であり、HIF-1 の抑制によって血管新生を抑制することも知られており、野生型 TP53 を有する癌では TP53 は腫瘍抑制因子としての機能が期待される。そこで、細胞内の TP53 の調節因子である MDM2 および PI3K 経路の治療標的としての意義を検討した。

a) 卵巣明細胞癌臨床検体では、正常組織と比較して MDM2 発現が有意に高く (図 1)、MDM2 高発現例の予後は有意に不良であった。PIK3CA 高発現も予後不良因子であり、双方の高発現例では更に予後不良であった (図 2)。

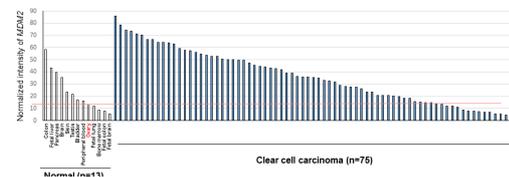


図 1 正常組織と卵巣癌における MDM2 の発現

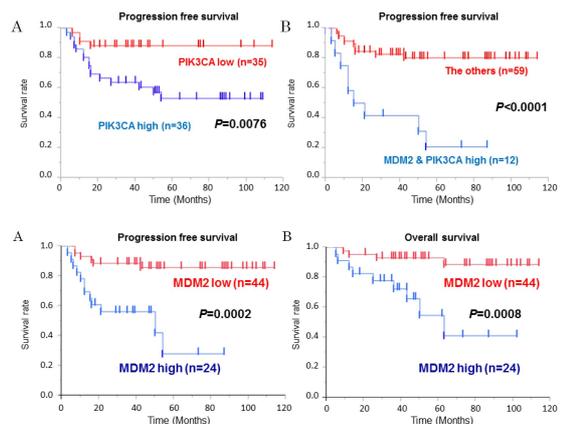


図 2 卵巣明細胞腺癌における MDM2 および PIK3CA 遺伝子発現の予後解析

b) MDM2 阻害剤である RG-7112 の細胞増殖抑制効果をみるために、卵巣明細胞腺癌細胞株を用いて MTT assay を行ったところ、RG-7112 は TP53 野生型株では、容量依存的に細胞増殖を抑制した (図 3)。さらに、RG-7112 による TP53 関連タンパクへの影響を調べるために、ウェスタンブロッティングを行った。TP53 野生型株では、RG-7112 添加により、TP53、TP21 の発現増加に加え、アポトーシス促進因子である PUMA の発現

上昇や抗アポトーシス因子の survivin の抑制が認められた(図4)。さらに、フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析により、TP53 野生型株では、RG-7112 添加により sub-G1 期の増加と S 期の短縮を認めた。また PI と AnnexinV による二重染色を行い、TP53 野生型株におけるアポトーシスの誘導を確認した。

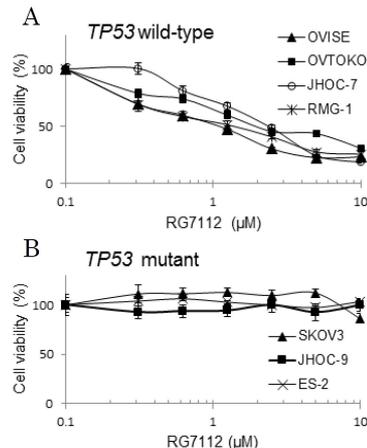


図3 卵巣明細胞腺癌株における RG-7112 投与下での細胞生存率

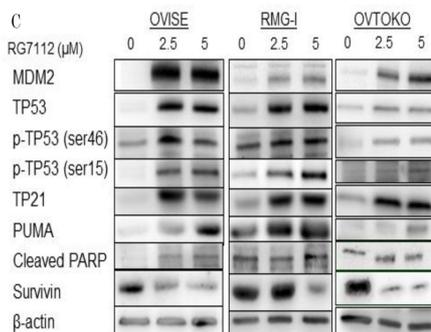


図4 RG-7112 による TP53 関連タンパクの活性化

c) MDM2 阻害剤である RG-7112 は、ヌードマウス皮下移植モデルにおいて有意に腫瘍増殖を抑制した(図5)。

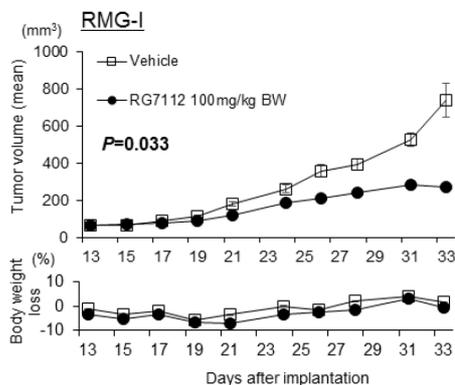


図5 皮下移植モデルにおける RG-7112 の抗腫瘍効果

c) RG-7112 が HIF-1 と腫瘍血管に与える影響に関して検討を行った。In vitro では、RG-7112 添加により、低酸素下(1% O₂)での HIF-1 発現が抑制され、VEGF の低下も認められた。In vivo においても、腫瘍切片を用いて血管内皮マーカーである CD31 の免疫染色を行った結果、RG-7112 投与後の腫瘍組織ではコントロールと比較し、血管径は小さく、かつ血管密度は低値であり、CD31 陽性細胞の割合が少なかった。すなわち、MDM2 阻害剤は、HIF-1 を介し血管新生を抑制することが明らかとなった。

d) 新規 MDM2 阻害剤 DS-3032 b の抗腫瘍効果の検討に加え、MDM2 阻害剤と、PI3K/mTOR 同時阻害剤 (DS-7423) もしくは mTOR 阻害剤 (Everolimus, Temsirolimus) の併用療法による抗腫瘍効果の増強を確認した。さらに現在、マウス卵巣癌腹膜播種モデルを用いて、MDM2 阻害剤の血管新生抑制効果および腹水産生抑制効果について検討を行っている。

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 6 件)

Nakamura H, Taguchi A, Kawana K, Baba S, Kawata A, Yoshida M, Fujimoto A, Ogishima J, Sato M, Inoue T, Nishida H, Furuya H, Yamashita A, Eguchi S, Tomio K, Mori-Uchino M, Adachi K, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Oda K, Nagamatsu T, Osuga Y, Fujii T. Therapeutic significance of targeting survivin in cervical cancer and possibility of combination therapy with TRAIL, Oncotarget, 査読有、9 巻、2018、13451-13461
DOI:18632/oncotarget.24413

Oda K, Tanikawa M, Sone K, Mori-Uchino M, Osuga Y, Fujii T. Recent advances in targeting DNA repair pathways for the treatment of ovarian cancer and their clinical relevance, International Journal of Clinical Oncology, 査読有、22 巻、2017、611-618
DOI: 10.1007/s10147-017-1137-7

Oki S, Sone K, Oda K, Hamamoto R, Ikemura M, Maeda D, Takeuchi M, Tanikawa M, Mori-Uchino M, Nagasaka K, Miyasaka A, Kashiya T, Ikeda Y, Arimoto T, Kuramoto H, Wada-Hiraike O, Kawana K, Fukayama M, Osuga Y, Fujii T. Oncogenic histone methyltransferase EZH2: A novel prognostic marker with

therapeutic potential in endometrial cancer, *Oncotarget*, 査読有、8 巻、2017、40402-40411
DOI: 10.18632/oncotarget.16316

Nakamura H, Taguchi A, Kawana K, Kawata A, Yoshida M, Fujimoto A, Ogishima J, Sato M, Inoue T, Nishida H, Furuya H, Tomio K, Eguchi S, Mori-Uchino M, Yamashita A, Adachi K, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Oda K, Nagamatsu T, Osuga Y, Fujii T. STAT3 activity regulates sensitivity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in cervical cancer cells. *Int J Oncol*, 査読有、49 巻、2016、2155-2162
DOI: 10.3892/ijo.2016.3681

Makii C, Oda K, Ikeda Y, Sone K, Hasegawa K, Uehara Y, Nishijima A, Asada K, Koso T, Fukuda T, Inaba K, Oki S, Machino H, Kojima M, Kashiyama T, Mori-Uchino M, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Kawana K, Yano T, Fujiwara K, Aburatani H, Osuga Y, Fujii T. MDM2 is a potential therapeutic target and prognostic factor for ovarian clear cell carcinomas with wild type TP53. *Oncotarget*, 査読有、15 巻、2016、75328-75338
DOI: 10.18632/oncotarget.12175.

Sato M, Arimoto T, Kawana K, Miyamoto Y, Ikeda Y, Tomio K, Tanikawa M, Sone K, Mori-Uchino M, Tsuruga T, Nagasaka K, Adachi K, Matsumoto Y, Oda K, Osuga Y, Fujii T. Measurement of endometrial thickness by transvaginal ultrasonography to predict pathological response to medroxyprogesterone acetate in patients with grade 1 endometrioid adenocarcinoma. *Mol Clin Oncol*, 査読有、2016、492-496
DOI: 10.3892/mco.2016.748

[学会発表](計 14 件)

第 58 回日本婦人科腫瘍学会学術集会
アロマターゼ阻害薬にて病勢コントロールが得られた再発子宮体癌の 3 例
第 58 回日本婦人科腫瘍学会学術集会
卵巣癌新進行期分類 (FIGO2014) IIIA1 期の再発形式と予後の検討
第 58 回日本婦人科腫瘍学会学術集会
再発卵巣癌・腹膜癌 53 例に対する salvage chemotherapy としての weeklyCPT 11 療法の有用性について
第 54 回日本癌治療学会学術集会 広汎

/ 準広汎子宮頸部摘出術の可否における術中リンパ節転移探索の有用性
第 54 回日本癌治療学会学術集会 当院における子宮頸癌 IVB 期の治療成績と予後因子の検討
第 54 回日本癌治療学会学術集会 子宮内膜異型増殖症または APAM の術前診断における子宮鏡下手術 (TCR) の有用性の検討
第 54 回日本癌治療学会学術集会 リンパ節転移陽性の子宮体癌において付属器転移は予後不良因子である
第 55 回日本癌治療学会学術集会 脈管侵襲, 特に静脈侵襲に着目した子宮体癌の臨床病理学的予後因子の検討
第 59 回日本婦人科腫瘍学会学術集会 婦人科悪性腫瘍に伴い脳梗塞を呈した Trousseau 症候群の 3 例
第 59 回日本婦人科腫瘍学会学術集会 子宮体癌における子宮内膜症合併の意義の検討
第 59 回日本婦人科腫瘍学会学術集会 希少組織型子宮頸部悪性腫瘍 32 例の治療・予後に関する後方視的検討
第 59 回日本婦人科腫瘍学会学術集会 長期の再発治療中に治療関連骨髄異形成症候群 (tMDS) を発症した BRCA 変異陽性卵巣癌の 1 例
第 59 回日本婦人科腫瘍学会学術集会 子宮頸部原発悪性黒色腫に対して免疫チェックポイント阻害剤を使用した 1 例
第 59 回日本婦人科腫瘍学会学術集会 類内膜腺癌 G1、1A 期の子宮体癌における傍大動脈リンパ節郭清 (PAN 郭清) 施行症例の検討

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

内野(森) 蘭代 (MORI-UCHINO, Mayuyo)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 3 0 5 7 0 4 5 2