

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：13401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K16840
 研究課題名(和文) 抗癌剤抵抗性卵巣癌のカルシウム伝達とミトコンドリア動態に着目した治療戦略の開発

 研究課題名(英文) the development of novel prognostic marker and targeted therapy related to mitochondrial dynamics and calcium signaling in chemoresistant ovarian cancer

 研究代表者
 津吉 秀昭 (Tsuyoshi, Hideaki)

 福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教

 研究者番号：90593864
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞株を用いた基礎実験において、細胞内カルシウム伝達を活性化させる薬剤が、抗癌剤抵抗性卵巣癌細胞において細胞死を誘導することを証明し、これにはミトコンドリア分裂に関わるタンパクの活性化と細胞周期におけるチェックポイント機構の調節という、従来とは異なる新たな細胞死誘導メカニズムが関与していることを証明した。更に、卵巣癌患者の摘出標本において、ミトコンドリアの分裂と融合に関わる活性化Drp1およびその上流タンパクであるCaMKIの発現が、既存の予後予測因子と有意に相関するだけでなく、活性化Drp1発現が無増悪生存率を予測する独立した因子であることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗癌剤抵抗性卵巣癌における有効な治療戦略は未だに未解決のままである。本研究では、抗癌剤抵抗性獲得における細胞内カルシウム伝達・ミトコンドリア動態の役割を基礎的に解明し、これらを調節する薬剤を同定したことで、従来の抗癌剤とは異なる経路によって癌の細胞死を誘導する新規治療薬の開発へとつなぐことができる。更に臨床検体からこれらの機序に関連するタンパク発現を調査し、臨床所見及び経過との強い相関関係を証明したことで、癌の再発を予測する早期バイオマーカーの開発へとつなぐことができる。これら2つのアプローチから、予後不良の抗癌剤抵抗性卵巣癌患者に対する新規治療戦略の開発へとつながる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have investigated the mechanisms of chemoresistance in ovarian cancer (OVCA). We have shown that a calcium mobilizing agent, saikosaponin-d suppressed phospho-Drp1Ser637 content and CaMKI phosphorylation - which has also been reported to up-regulate Drp1 - leading to mitochondrial fission and subsequently apoptosis in chemoresistant OVCA cells. Extending from these in vitro findings, we have examined the clinical relevance and prognostic impact of Drp1, CaMKI and their phosphorylated forms in epithelial OVCA. Phospho-Drp1Ser637 emerged as an independent prognostic factor for progression-free survival which serves as the first report to explain the role of Drp1 and its related proteins in comprehensive patients' cohort. These findings are promising and provide important insights into developing novel prognostic marker and targeted therapy in the patients with epithelial OVCA.

研究分野：産科婦人科学

キーワード：抗癌剤抵抗性卵巣癌 細胞内カルシウム伝達 ミトコンドリア分裂 アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は、最も予後不良な婦人科悪性腫瘍であり、その最大の原因は、癌細胞が抗癌剤に対する抵抗性を獲得することである。従来の抗癌剤は、癌抑制遺伝子 p53 を介して癌細胞のアポトーシスを誘導する。しかし、再発卵巣癌・高悪性度漿液性卵巣癌では p53 が高頻度に変異してしまうため、従来の抗癌剤に反応しなくなってしまう。更に、これを克服する有効な治療は現在も存在しない。

p53 変異が高頻度に見られる抗癌剤抵抗性卵巣癌において、p53 に依存しないアポトーシス誘導メカニズムを解明できれば、抗癌剤抵抗性を克服し、卵巣癌患者の予後改善につながる可能性がある。近年ミトコンドリアにおいて、p53 を介する従来のアポトーシス誘導経路に加え、p53 に依存しないミトコンドリアの分裂・融合という形態変化に着目したアポトーシス制御機構の重要性が報告され始めている。

ミトコンドリアは、分裂と融合を繰り返すことで、細胞呼吸、カルシウム伝達、アポトーシス、オートファジー(自食作用)など、細胞の生存・死に深く関与している。これらの制御において特に重要な役割を担うのが Dynamin-related protein 1(Drp1)である。Drp1 は、異なるセリン残基がリン酸化されることで分裂・融合の双方を誘導することができる。また、細胞内カルシウム濃度の上昇が Drp1 のリン酸化に関与することも報告されている。

我々はこれまでに、抗癌剤抵抗性 p53 変異卵巣癌細胞において、細胞内カルシウム濃度の上昇を誘導するいくつかの薬剤が、リン酸化(活性化)Drp1 を調節することによってミトコンドリア分裂及びアポトーシスを誘導することを証明している。今後 *in vitro* においてこれらの詳細な機序を解明し、卵巣癌患者の臨床所見との関連性を検討することで、抗癌剤抵抗性のメカニズムに対する理解を深めるとともに、p53 変異をもった卵巣癌患者の予後を改善する可能性が期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗癌剤抵抗性 p53 変異卵巣癌の病態を「細胞内カルシウム伝達」及び「ミトコンドリア内 Drp1 タンパク」の観点から解明し、抗癌剤抵抗性に対する新規治療法を開発することである。

当該研究者らは本研究の予備実験として、医用植物からの抽出物で、細胞内カルシウム伝達を活性化させることが報告されているサイコサポニン d (Saikosaponin-d:Ssd) が、p53 変異卵巣癌細胞で、ミトコンドリア分裂とアポトーシスを誘導することを証明している。これらの研究成果をもとに

(1) 抗癌剤抵抗性卵巣癌細胞を使用し、細胞内カルシウム濃度の上昇によって、Drp1 が、他のミトコンドリア動態に関与するタンパクと、どのように相互作用し抗癌剤抵抗性を克服するか、

(2) 卵巣癌患者標本において Drp1 を含むこれらのタンパク発現の変化を調査し、抗癌剤抵抗性の予後を早期に予測するバイオマーカーとなりうるか、予後を改善しうる新たな治療薬の開発につながるかを、それぞれ検討する。

3. 研究の方法

(1) Ssd がミトコンドリア分裂とアポトーシスを誘導するメカニズムを、*in vitro* で証明する。

ミトコンドリア分裂タンパクである Drp1 の関与

Drp1 及びミトコンドリア分裂・融合に関連するリン酸化 Drp1 のタンパク発現を Western blot 法、局在を免疫染色法でそれぞれ評価する。更に、選択的 Drp1 阻害剤(mdivi1)を併用し、ミトコンドリア分裂とアポトーシスへの影響を評価する。

ミトコンドリア分裂・融合に関わる他のタンパクの関与と Drp1 との相互作用

ミトコンドリア融合タンパクである Optic atrophy 1 (Opa1)の発現を同様に分子生物学的に評価する。

カルシウム伝達経路とミトコンドリア分裂との関与

Ssd が、卵巣癌細胞においても細胞内カルシウム濃度を上昇させることを、カルシウム特異的染色を用いて評価する。またその下流であるミトコンドリア膜電位を免疫染色法で、あるいは Drp1 との相互作用が報告されている CaMKI 及び活性型であるリン酸化 CaMKI の発現、局在を同様に分子細胞学的に評価する。

(2) 卵巣癌患者の摘出標本における Drp1 及びその関連タンパクの発現と予後との関連を後方視的に検討する。

卵巣癌患者の摘出標本を用いて、Drp1 及び関連するタンパク発現を免疫組織学的に評価し、抗癌剤抵抗性獲得との関連を証明する。更には、病理及び細胞悪性度との関連、寛解及び再発率、無増悪及び全生存期間との関連を比較検討することで、抗癌剤抵抗性を早期に予測するバイオマーカーとなりうるかを検証する。

4. 研究成果

(1) Ssd がミトコンドリア分裂とアポトーシスを誘導するメカニズムを、*in vitro* で証明する。

細胞内カルシウム伝達を活性化する Ssd は、異なるステータスを持つプラチナ抵抗性細胞においてアポトーシスを誘導することができた。

Ssd は、プラチナ抵抗性卵巣癌においても、細胞内カルシウム伝達を活性化することができた。またその効果は、下流のミトコンドリアにおける膜電位の消失を引き起こし、更に CaMKI と呼ばれるタンパクを活性化することで、ミトコンドリア分裂とアポトーシスを誘導した。

Ssd はミトコンドリアの分裂と誘導に関与する Drp1 と呼ばれるタンパクの活性化、更にはミトコンドリア融合タンパクである Opa1 を抑制することによってもミトコンドリア分裂とアポトーシスを誘導した。またこれらの作用は、阻害剤を用いることにより抑制されることが証明された。

最後に、癌細胞の増殖において重要な経路の一つである細胞周期へ与える影響を、チェックポイント機構に焦点を当て、抗癌剤抵抗性との関連と、Ssd がもたらす影響について証明した。

以上の基礎実験の結果から、カルシウム伝達とミトコンドリア動態の活性化を介するアポトーシス誘導メカニズムが、p53 変異を伴う予後不良の卵巣癌に対し、プラチナ抵抗性を克服しうる新しい治療戦略となる可能性が示唆された。

(2) 卵巣癌患者の摘出標本における Drp1 及びその関連タンパクの発現と予後との関連を後方視的に検討する。

約 50 人の卵巣癌患者の残余組織検体からパラフィンブロックを作製し薄切、in vitro で証明した細胞内カルシウム伝達およびミトコンドリア分裂に関連するタンパク発現を免疫組織化学検査によって証明し、その発現と患者予後との関連について解析を行った。

解析結果から卵巣癌患者において、ミトコンドリアの融合に関わるリン酸化 Drp1、およびその上流タンパクである CaMKI の発現は、抗癌剤抵抗性といった既存の予後不良因子と有意に相関していた。更にリン酸化 Drp1 発現は、無増悪生存率を予測する独立した因子であった。

以上の結果から、カルシウム伝達とミトコンドリア動態に関連するタンパク発現は、癌の再発を予測する早期バイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

(1)(2) 2 つのアプローチから、予後不良の抗癌剤抵抗性卵巣癌患者に対する新規治療戦略の開発へとつなぐことが出来ると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsuyoshi H, Wong VKW, Han Y, Orisaka M, Yoshida Y, Tsang BK.	4. 巻 8(59)
2. 論文標題 Saikosaponin-d, a calcium mobilizing agent, sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis by facilitating mitochondrial fission and G2/M arrest.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 99825-99840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.21076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsuyoshi H, Orisaka M, Fujita Y, Asare-Werehene M, Tsang BK, Yoshida Y	4. 巻 20(1)
2. 論文標題 Prognostic impact of Dynamin related protein 1 (Drp1) in epithelial ovarian cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-020-06965-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 津吉 秀昭
2. 発表標題 研究って・・・どうなの
3. 学会等名 第10回 リサーチ・マッチング（研究者勧誘に係る説明会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津吉 秀昭
2. 発表標題 Saikosaponin-d, a calcium mobilizing agent, sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis by facilitating mitochondrial fission and G2/M arrest.
3. 学会等名 第9回2017年度優秀論文（2017.4～2018.3.31）発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideaki Tsuyoshi, Makoto Orisaka, Yoshio Yoshida.
2. 発表標題 Saikosaponin-d sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis by facilitating mitochondrial fission and G2/M arrest
3. 学会等名 第69回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 津吉 秀昭
2. 発表標題 抗癌剤抵抗性卵巣癌のカルシウム伝達とミトコンドリア動態に着目した治療戦略の開発
3. 学会等名 第4回 中日本産婦人科セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 津吉 秀昭
2. 発表標題 抗癌剤抵抗性卵巣癌のカルシウム伝達とミトコンドリア動態に着目した治療戦略の開発
3. 学会等名 第4回 新潟産婦人科シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 津吉 秀昭
2. 発表標題 抗癌剤抵抗性卵巣癌のカルシウム伝達とミトコンドリア動態に着目した治療戦略の開発
3. 学会等名 第16回日本婦人科がん分子標的研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	折坂 誠 (Orisaka Makoto)		
研究協力者	吉田 好雄 (Yoshida Yoshio)		