

研究種目：	基盤研究(B)
研究期間：	2007 ~ 2009
課題番号：	19390427
研究課題名(和文)	上皮間葉転換誘導因子を標的とする卵巣癌の抗癌剤感受性増強と転移抑制治療法の開発
研究課題名(英文)	New strategy for the enhanced chemosensitivity and less metastatic potential of ovarian cancer targeting EMT inducible transcriptional factor
研究代表者	
	吉川 史隆 (Kikkawa Fumitaka)
	名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
	研究者番号：40224985

研究成果の概要(和文)：卵巣癌の転移浸潤における上皮間葉転換(EMT)の意義、特に EMT 誘導転写因子 TWIST が腹膜播種形成や抗癌剤耐性に促進的な影響を及ぼしていることを明らかにした。さらに、抗癌剤に耐性化した再発・再燃卵巣癌における EMT 発現と局所環境における転移・浸潤能亢進とのリンクが示された。EMT 誘導転写因子を分子標的とすることによって再発あるいは薬剤耐性卵巣癌に対する治療に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the significance of EMT and EMT inducible transcriptional factor in the metastasis of ovarian cancer. In addition, TWIST, one of the EMT inducible factors positively influenced the formation of peritoneal metastasis or the resistance to anti-neoplastic agents in this tumor. Furthermore, even in the recurrent ovarian cancer we showed the possible link between EMT and increasing local metastatic potential. Our study suggested the EMT inducible factor targeting therapy may lead to a new approach for the treatment of refractory ovarian cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2008年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 産婦人科学

キーワード：上皮性卵巣癌 上皮間葉転換現象 転移浸潤 抗癌剤耐性

1. 研究開始当初の背景

(1) 上皮性卵巣癌は腹膜転移やリンパ行性転移を起しやすく、婦人科悪性腫瘍の中でも予後不良である。手術で病変を除去することが重要であるが、細胞レベルの病変に対しては既存の抗癌剤を中心とした化学療法に依存しているが、抗癌剤に対する自然耐性と獲

得耐性が治療上の大きな障壁となっている。これら耐性の克服、すなわち薬剤感受性増強と転移浸潤の抑制が今後の卵巣癌に対してさらなる予後改善に不可欠である。

(2) 以前より、腫瘍の転移において EMT の関与に関する報告が数多くなされているが、

卵巣癌の腹膜転移におけるエビデンスは存在していない。我々は 82 例の卵巣癌手術切片において TWIST (EMT 誘導転写因子) 発現を免疫組織化学染色にて検討した結果、発現陽性例では陰性例に比較して有意に予後の短縮を認めた。従って TWIST 陽性例が予後不良であるのは腹腔内及びリンパ系を含めた全身の脈管内に腫瘍の micrometastasis が存続し引き続く抗癌剤耐性が原因と推定された。

2. 研究の目的

(1) 卵巣癌の転移・浸潤能の獲得および抗がん剤耐性化における EMT の関連性を明確にする。

(2) EMT の阻害が、難治性卵巣癌の転移抑制と抗がん剤感受性回復に通じるか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) TWIST-RNA interfering technique (RNA-i) を用いて TWIST をノックダウンし *in vitro* および *in vivo* の両系においてアポトーシス誘導性、および腹膜転移能に対する基礎的研究を行った。

(2) TGF- β をメインとした液性因子が EMT のトリガーとなることは既に明らかとなっているが、我々がこれまで樹立してきた adriamycin, vincristine, carboplatin, cisplatin, paclitaxel 耐性株を用いて再発再燃卵巣癌における EMT 発現の意義について検討した。また、耐性癌における TWIST を RNAi で抑制することによって再び感受性を回復する可能性を *in vitro* および *in vivo* の両系において追求した。

4. 研究成果

(1) 卵巣がん細胞株 HEY において、RNA-i による TWIST 抑制が MET (Mesenchymal-epithelial transition) を誘導し、運動能と浸潤能を低下させるだけでなく、単層培養した腹膜中皮細胞との接着を抑制した。また、この TWIST をノックダウンした細胞では同時に CD29 や CD44 などの接着分子とともにマトリックスプロテアーゼ 2 (MMP2) や膜型 MMP などの発現が抑制されており、TWIST と細胞接着・転移浸潤関連分子とのリンクが明らかとなった。さらに、より高濃度の RNA-i で高転移性卵巣癌細胞の TWIST 発現を抑制すると一部の細胞は浮遊し、細胞内には泡沫を伴い小型円形化というアポトーシス様の形態変化を確認した。細胞周期を調べてみると核断片化を示す 2n 以下の分画増加を認めアポトーシスであることが判明した。さらに、ノックダウンにより、p53 のユビキチン化を抑制

する ARF および p53 の増加と、p53 のユビキチン化を促進する MDM2 の減少が認められており、タキソールの併用下でも相乗効果的に腫瘍発育が抑制されるという結果を得た。また蛋白レベルで p53 がコードしている PUMA および cleaved PARP の増加が確認できた。以上データから、卵巣癌細胞の腹膜転移能の獲得には EMT が重要であり EMT 誘導転写因子、特に TWIST をブロックすることによって卵巣癌の転移の抑制と抗癌剤感受性の増強効果が同時に期待できる可能性が示唆された。

(2) chronic paclitaxel 耐性株 (CP 細胞株) のみならず adriamycin, vincristine, carboplatin, 及び cisplatin の薬剤耐性株においても EMT 関連分子や MMPs 等の転移関連分子の発現は亢進していた。

(3) CP 細胞株における EMT 誘導性およびマウス腹腔内播種形成の亢進が認められた。結果としては耐性卵巣癌細胞では野生株に比較して exogeneous な TGF- β 産生能は増強しており、そのレセプターやシグナル伝達系の SMAD3 の発現が亢進していた。さらに、二次的に matrix metalloproteinases (MMPs) の発現も亢進していたことから、転移に有利な細胞環境となっていることを示唆する結果を得た。従って、耐性化によって EMT を促進因子である TGF- β の発現増強を伴った “stress-resistance” が誘導される構図が考えられた。さらに CP 耐性株で発現が亢進していた EMT 誘導転写因子を *in vitro*、及び *in vivo* siRNA でノックダウンすることによって腹膜中皮細胞や細胞外マトリックスとの接着親和性の減少、およびマウスでの遠隔転移性の低下、さらには paclitaxel 耐性の解除などが示された。従って EMT 誘導転写因子の観点から、卵巣癌における二次性転移の生じる機序と耐性克服を目指した新たな分子標的治療の可能性を示唆することができた。

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)

※すべて査読あり

[雑誌論文] (計 23 件)

1: Kajiyama H, Shibata K, Suzuki S, Ino K, Nawa A, Kawai M, Nagasaka T, Kikkawa F. Fertility-sparing surgery in young women with invasive epithelial ovarian cancer. Eur J Surg Oncol. 2010 (in press)

2: Fujiwara S, Nawa A, Nakanishi T, Shimoyama Y, Kajiyama H, Shibata K, Ino K,

Nakamura S, Kikkawa F, Yatabe Y. Thyroid transcription factor 1 expression in ovarian carcinomas is an independent prognostic factor. Hum Pathol. 2010 (in press)

3: Umezumi T, Shibata K, Shimaoka M, Kajiyama H, Yamamoto E, Ino K, Nawa A, Senga T, Kikkawa F. Gene silencing of glypican-3 in clear cell carcinoma of the ovary renders it more sensitive to the apoptotic agent paclitaxel in vitro and in vivo. Cancer Sci. 101(1):143-8. 2010.

4: Kajiyama H, Shibata K, Ino K, Mizutani S, Nawa A, Kikkawa F. The expression of dipeptidyl peptidase IV (DPPIV/CD26) is associated with enhanced chemosensitivity to paclitaxel in epithelial ovarian carcinoma cells. Cancer Sci. 101(2):347-54. 2009.

5: Takahashi N, Yamamoto E, Ino K, Miyoshi E, Nagasaka T, Kajiyama H, Shibata K, Nawa A, Kikkawa F. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in mucinous tumors of the ovary. Oncol Rep. 22(5):1027-32. 2009.

6: Inaba T, Ino K, Kajiyama H, Yamamoto E, Shibata K, Nawa A, Nagasaka T, Akimoto H, Takikawa O, Kikkawa F. Role of the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase in the progression of ovarian carcinoma. Gynecol Oncol. 115(2):185-92. 2009.

7: Ishida D, Nawa A, Tanino T, Goshima F, Luo CH, Iwaki M, Kajiyama H, Shibata K, Yamamoto E, Ino K, Tsurumi T, Nishiyama Y, Kikkawa F. Enhanced cytotoxicity with a novel system combining the paclitaxel-2'-ethylcarbonate prodrug and an HSV amplicon with an attenuated replication-competent virus, HF10 as a helper virus. Cancer Lett. 288(1):17-27. 2009.

8: Yamamoto E, Ino K, Miyoshi E, Inamori K, Abe A, Sumigama S, Iwase A, Kajiyama H, Shibata K, Nawa A, Kikkawa F. N-acetylglucosaminyltransferase V regulates extravillous trophoblast invasion through glycosylation of alpha5beta1 integrin. Endocrinology. 150(2):990-9. 2009.

9: Yoshida N, Ino K, Ishida Y, Kajiyama H, Yamamoto E, Shibata K, Terauchi M, Nawa A, Akimoto H, Takikawa O, Isobe K, Kikkawa F. Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human endometrial carcinoma cells induces rapid tumor growth in a mouse xenograft model. Clin Cancer Res. 14(22):7251-9. 2008.

10: Shibata K, Kajiyama H, Yamamoto E, Terauchi M, Ino K, Nawa A, Kikkawa F. Establishment and characterization of an ovarian yolk sac tumor cell line reveals possible involvement of Nkx2.5 in tumor development. Oncology. 74(1-2):104-11. 2008.

11: Ino K, Yamamoto E, Shibata K, Kajiyama H, Yoshida N, Terauchi M, Nawa A, Nagasaka T, Takikawa O, Kikkawa F. Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. Clin Cancer Res. 14(8):2310-7. 2008.

12: Tsukamoto H, Shibata K, Kajiyama H, Terauchi M, Nawa A, Kikkawa F. Aminopeptidase N (APN)/CD13 inhibitor, Ubenimex, enhances radiation sensitivity in human cervical cancer. BMC Cancer. 19;8:74. 2008.

13: Umezumi T, Shibata K, Kajiyama H, Terauchi M, Ino K, Nawa A, Kikkawa F. Taxol resistance among the different histological subtypes of ovarian cancer may be associated with the expression of class III beta-tubulin. Int J Gynecol Pathol. 27(2):207-12. 2008.

14: Shibata K, Kajiyama H, Ino K, Terauchi M, Yamamoto E, Nawa A, Nomura S, Kikkawa F. Twist expression in patients with cervical cancer is associated with poor disease outcome. Ann Oncol. 19(1):81-5. 2008.

15: Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Ino K, Nawa A, Kikkawa F. Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian

carcinoma. *Int J Cancer*.122(1):91-9. 2008.

16: Tsukamoto H, Shibata K, Kajiyama H, Terauchi M, Nawa A, Kikkawa F. Irradiation-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) related to invasive potential in endometrial carcinoma cells. *Gynecol Oncol*.107(3):500-4. 2007.

17: Kajiyama H, Shibata K, Ino K, Nawa A, Mizutani S, Kikkawa F. Possible involvement of SDF-1alpha/CXCR4-DPPIV axis in TGF-beta1-induced enhancement of migratory potential in human peritoneal mesothelial cells. *Cell Tissue Res*. 330(2):221-9. 2007.

18: Terauchi M, Kajiyama H, Shibata K, Ino K, Nawa A, Mizutani S, Kikkawa F. Inhibition of APN/CD13 leads to suppressed progressive potential in ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer*.27;7:140. 2007.

19: Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Yamashita M, Ino K, Nawa A, Kikkawa F. Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. *Int J Oncol*.31(2):277-83. 2007.

20: Tsukamoto H, Shibata K, Kajiyama H, Terauchi M, Nawa A, Kikkawa F. Uterine smooth muscle cells increase invasive ability of endometrial carcinoma cells through tumor-stromal interaction. *Clin Exp Metastasis*.24(6):423-9. 2007.

21: Terauchi M, Kajiyama H, Yamashita M, Kato M, Tsukamoto H, Umez T, Hosono S, Yamamoto E, Shibata K, Ino K, Nawa A, Nagasaka T, Kikkawa F. Possible involvement of TWIST in enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *Clin Exp Metastasis*.24(5):329-39. 2007.

22: Yamashita M, Kajiyama H, Terauchi M, Shibata K, Ino K, Nawa A, Mizutani S, Kikkawa F. Involvement of aminopeptidase N in enhanced chemosensitivity to paclitaxel in ovarian carcinoma in vitro and in vivo. *Int J Cancer*.120(10):2243-50. 2007.

23: Hosono S, Kajiyama H, Terauchi M, Shibata K, Ino K, Nawa A, Kikkawa F. Expression of Twist increases the risk for recurrence and for poor survival in epithelial ovarian carcinoma patients. *Br J Cancer*.96(2):314-20. 2007.

[学会発表] (計 39 件)

1. シスプラチン耐性卵黄嚢腫瘍細胞株の樹立と耐性機序の検討 柴田清住、吉川史隆 他
第 68 回日本癌学会学術総会 2009.10.1-3
横浜
2. 卵巣癌進展における免疫抑制酵素 IDO の役割とマウス腹膜播種モデルにおける IDO 阻害剤の効果 井篁一彦、吉川史隆 他
第 46 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 2009.7.10-12 新潟
3. 婦人科癌における甲状腺転写因子 1 (TTF-1) の発現と EGFR 遺伝子変異との関連 藤原多子、吉川史隆 他
第 46 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 2009.7.10-12 新潟
4. ワークショップ「婦人科腫瘍薬物療法の進歩 卵巣癌の腹膜転移機構の解明 ～がんにとって中皮は“味方”となりうるのか? 梶山広明
第 46 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 2009.7.10-12 新潟
5. 卵巣癌の腹膜播種に対するケモカインレセプターを標的とする新規治療戦略 梶山広明
第 8 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会 2009.7.3 福岡
6. Glypican3 抑制による卵巣明細胞腺癌のタキソール感受性の増強について 梅津朋和、吉川史隆 他
第 61 回日本産科婦人科学会学術集会 2009.4.3-5 京都

7. 浸潤子宮頸癌において免疫抑制酵素

indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) は新規
予後規定マーカーになり得る

稲葉智子, 吉川史隆 他

第 61 回日本産科婦人科学会学術集会

2009. 4. 3-5 京都

8. Epithelial-mesenchymal transition (EMT)

をターゲットにした子宮癌放射線治療後の
転移予防 塚本裕久, 吉川史隆 他

第 60 回日本産科婦人科学会総会・学術講演
会 2008. 4. 12-15 横浜

9. Glypican-3 は卵黄嚢腫瘍の新規診断、予

後マーカーとなりうる 梅津朋和, 吉川史隆
他 第 60 回日本産科婦人科学会総会・学術
講演会 2008. 4. 12-15 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 史隆 (Kikkawa Fumitaka)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：4 0 2 2 4 9 8 5

(2) 研究分担者

那波 明宏 (Nawa Akihiro)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：9 0 2 4 2 8 5 9

柴田 清住 (Shibata kiyosumi)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：9 0 3 3 5 0 2 6

梶山 広明 (Kajiyama hiroaki)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：0 0 3 4 5 8 8 6