

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890114

研究課題名（和文） マイクロアレイによる、卵巣明細胞腺癌に有効な薬剤の探索

研究課題名（英文） Searching for effective drugs against ovarian clear cell carcinoma based on microarray analysis

研究代表者

松村 謙臣（MATSUMURA NORIOMI）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20452336

研究成果の概要：卵巣癌細胞株のマイクロアレイ解析によって、明細胞腺癌を特徴づける遺伝子群を同定した。その結果、1) 卵巣明細胞腺癌を特徴づける遺伝子群には、チョコレートのお胞内の酸化ストレス環境によって上昇する遺伝子が多く含まれること、2) 明細胞腺癌は腎細胞癌と類似し、キナーゼ活性との関連が深い Ras 活性が高く、増殖能との関連が深い E2F 活性が低いことを明らかにした。したがって、明細胞腺癌に対して、増殖をターゲットとする抗がん剤ではなく、キナーゼ活性を阻害する分子標的薬が有用と考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

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：卵巣明細胞腺癌、マイクロアレイ、バイオインフォマティクス、分子標的薬

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は、日本や欧米では婦人科悪性腫瘍の中で最も年間死亡者数が多い疾患であるが、組織型によって、予後、化学療法感受性、進行期の分布、リンパ節転移の頻度など、臨床像が異なることが知られており、組織型に基づいて治療の個別化をはかることが卵巣癌の治療成績向上のために重要と考えられる。特に明細胞腺癌は、他の組織型に比して、卵巣癌に対する標準的な化学療法であるプラチナ製剤とタキサン製剤の併用療法に対して抵抗性を示すことが知られており、その病態の解明と治療法の開発は今なお重要な課題である。

卵巣明細胞腺癌はチョコレートのお胞より発生することが知られているが、最近我々は、その内容液に含まれる鉄が酸化ストレスを引き起こし、発癌の原因となることを見だし報告してきた。

近年急速に発展してきた発現マイクロアレイ技術および、Bioinformatics による評価方法によって、癌の全体像を捉えて癌の表現形を理解することができるようになってきた。卵巣明細胞腺癌は、特徴的な遺伝子発現を有していると考えられ、その中には明細胞腺癌の生物学的特徴や発癌環境を反映する遺伝子、さらに明細胞腺癌の治療ターゲットとなるシグナル経路が反映されていると考

えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、卵巣癌細胞株のマイクロアレイに基づき、以下のことを明らかにすることを目的とした。

(1) 明細胞腺癌細胞株と非明細胞腺癌細胞株を分ける遺伝子群を同定し、細胞株による組織型の違いと関連する遺伝子が、臨床サンプルにおける組織型の違いを予測するか検証する。

(2) チョコレートのう胞の内容液が、卵巣癌の遺伝子発現に与える変化を検討し、明細胞腺癌の生物学的特徴にもたらす影響を調べる。

(3) 明細胞腺癌の生物学的な意義付けを、シグナル伝達経路の観点から明らかにし、明細胞腺癌に対し有効な抗腫瘍薬を探す。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞株のマイクロアレイ解析

明細胞腺癌細胞株 13 種類を含む、38 種類の卵巣癌細胞株を用いて、Affymetrix 社の U133Av2 プローブでマイクロアレイ解析を施行した。

(2) Clear cell signature の遺伝子による、明細胞腺癌の生物学的な意義の検証

Clear cell signature に濃縮している Gene Ontology term, TRANSFAC を、ALLEZ という方法で調べた。

(3) 不死化 OSE 細胞株への鉄あるいはチョコレートとう胞内容液の添加による変化

熊本大学片淵教授より譲渡を受けた不死化 OSE 細胞株に、鉄あるいはチョコレートとう胞内容液を添加して、U133Av2 プローブを用いて、マイクロアレイを施行した。

(4) NCI60 細胞株との比較

他臓器癌と比較する為に、Website より入手した NCI60 細胞株のデータセットと、38 卵巣癌細胞株のデータセットを、COMBAT というソフトを用いてデータを merge させた。そのうえで、明細胞腺癌と他臓器の癌の類似性を検討した。

(5) 明細胞腺癌を特徴づけるシグナル経路の探索

発現マイクロアレイから、GSEA および、Binary regression によって、明細胞腺癌を特徴づけるシグナル経路を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 卵巣癌細胞株マイクロアレイデータセットの検証

Binary regression 法によって、卵巣明細胞腺癌細胞株 vs. 非明細胞腺癌細胞株の間で、「明細胞腺癌の probability」をスコア化し、そのスコアを臨床サンプルのデータセット GSE6008 にあてはめたところ、有意

( $p < 0.0001$ )に、明細胞腺癌サンプルで高いスコアとなることがわかった。したがって、今回作製した卵巣癌細胞株データセットは、卵巣明細胞腺癌の臨床サンプルデータセットと互換性が高いことがわかった。

(2) 明細胞腺癌を特徴づける遺伝子群” Clear cell signature” の同定

SAM (Significant analysis of microarrays) という方法で、明細胞腺癌細胞株とその他の細胞株を分ける遺伝子群を抽出した ( $FDR < 0.05$ )。一方、Website に公開されている、臨床サンプルのデータセット (GSE6008) を用いて、同様に SAM で明細胞腺癌を特徴づける遺伝子群を抽出した。それらの両方で共通する遺伝子群を、明細胞腺癌を特徴づける遺伝子群ということで、Clear cell signature と名付けた。Web 上の他のデータセットを用いて、Clear cell signature の再現性を検証した。さらに RT-PCR によって確認した。

(3) Clear cell signature の特徴

ALLEZ で、Clear cell signature 遺伝子に濃縮している gene ontology term を調べたところ、酸化ストレス、発生分化、糖代謝に関する term が濃縮していた。さらに転写因子結合モチーフを調べると、明細胞腺癌のマーカーとされている HNF1 $\beta$  の結合モチーフを持つ遺伝子が濃縮していた。なお、HNF1 $\beta$  遺伝子自体も、Clear cell signature の中に含まれていた。

(4) Clear cell signature と環境因子の関連

不死化 OSE 細胞株に鉄あるいはチョコレートとう胞内容液を添加すると、Clear cell signature の遺伝子群が有意に発現亢進することがわかった。すなわち、明細胞腺癌は生物学的に、チョコレートとう胞内の環境因子により特徴づけられていることが明らかになった。

(5) 明細胞腺癌と腎細胞癌の類似性

HNF1 $\beta$  の mutation は腎低形成を引き起こすことが知られている。COMBAT で、NCI60 と今回の 38 細胞株のデータセットを merge し、Clear cell signature でクラスタリングすると、明細胞腺癌と腎細胞癌がきわめて類似していることがわかった。

(6) 明細胞腺癌におけるシグナル伝達経路

マイクロアレイデータから、Binary regression によってシグナル伝達経路を調べると、卵巣明細胞腺癌では Ras 活性が高く、E2F 活性が低いことがわかった。Ras 活性はキナーゼ活性と関連が深く、E2F 活性は増殖能と関連が深いことから、卵巣明細胞腺癌では、増殖をターゲットとする抗がん剤よりも、キナーゼ活性を阻害する Sorafenib などの分子標的薬の方が有用と考えられた。

臨床的に、腎細胞癌や卵巣明細胞腺癌は、増殖が遅く抗がん剤抵抗性であることが知

られている。一方、腎細胞癌には Sorafenib などのキナーゼ阻害剤が有用であり、日本でも承認されている。腎細胞癌と明細胞腺癌との類似性という点からも、キナーゼ阻害剤を卵巣明細胞腺癌に試みるべきと思われる。

#### 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 8 件)

- ① Clinical significance of the NKG2D ligands, MICA/B and ULBP2 in ovarian cancer: high expression of ULBP2 is an indicator of poor prognosis. Li K, Mandai M, Hamanishi J, Matsumura N, Suzuki A, Yagi H, Yamaguchi K, Baba T, Fujii S, Konishi I. *Cancer Immunol Immunother.* 58: 641-52. 2009 査読有り
- ② Classification using hierarchical clustering of tumor-infiltrating immune cells identifies poor prognostic ovarian cancers with high levels of COX expression. Liu M, Matsumura N, Mandai M, Li K, Yagi H, Baba T, Suzuki A, Hamanishi J, Fukuhara K, Konishi I. *Mod Pathol.* 22: 373-84. 2009 査読有り
- ③ Yin yang 1 modulates taxane response in epithelial ovarian cancer. Matsumura N, Huang Z, Baba T, Lee PS, Barnett JC, Mori S, Chang JT, Kuo WL, Gusberg AH, Whitaker RS, Gray JW, Fujii S, Berchuck A, Murphy SK. *Mol Cancer Res.* 7: 210-20. 2009 査読有り
- ④ Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133+ ovarian cancer cells. Baba T, Convery PA, Matsumura N, Whitaker RS, Kondoh E, Perry T, Huang Z, Bentley RC, Mori S, Fujii S, Marks JR, Berchuck A, Murphy SK. *Oncogene.* 28: 209-18. 2009 査読有り
- ⑤ Immunostimulatory effect of Fms-like tyrosine kinase 3 ligand on peripheral monocyte-derived dendritic cells and natural killer cells: utilization for ovarian cancer treatment. Matsumura N, Mandai M, Hamanishi J, Yamaguchi K, Fukuhara K, Yagi H, Higuchi T, Takakura K, Fujii S. *Oncol Rep.* 19: 505-15. 2009 査読有り
- ⑥ Anatomic identification and functional outcomes of the nerve sparing Okabayashi radical hysterectomy. Fujii S, Takakura K, Matsumura N, Higuchi T, Yura S, Mandai M, Baba T, Yoshioka S. *Gynecol Oncol.* 107: 4-13. 2007 査読有り
- ⑦ Trophinin is a potent prognostic marker of ovarian cancer involved in platinum

sensitivity. Baba T, Mori S, Matsumura N, Kariya M, Murphy SK, Kondoh E, Kusakari T, Kuroda H, Mandai M, Higuchi T, Takakura K, Fukuda MN, Fujii S. *Biochem Biophys Res Commun.* 360: 363-9. 2007 査読有り

⑧ Neuropilin-1 promotes unlimited growth of ovarian cancer by evading contact inhibition. Baba T, Kariya M, Higuchi T, Mandai M, Matsumura N, Kondoh E, Miyanishi M, Fukuhara K, Takakura K, Fujii S. *Gynecol Oncol.* 105:703-11. 2007 査読有り

[学会発表] (計 20 件)

- ① 卵巣癌における化学療法感受性バイオマーカーの開発と組織型による分子標的の同定—治療個別化に向けた Bioinformatics の応用; 松村謙臣; 第 61 回日本産科婦人科学会学術集会 シンポジウム口演 H21 年 4 月 4 日, 国立京都国際会館
- ② 卵巣明細胞腺癌において、マイクロアレイ解析により特徴付けられる生物学的特性は特有の発癌環境を反映している; 山口建、万代昌紀、松村謙臣、山村省吾、濱西潤三、馬場長、藤井信吾、小西郁生; 第 61 回日本産科婦人科学会学術集会 婦人科腫瘍学部門優秀演題賞口演 H21 年 4 月 3 日, 国立京都国際会館
- ③ 卵巣癌腹膜播種の新生血管を標的として、ケモカイン CCL19 遺伝子導入胚性血管内皮細胞を用いて局所免疫賦活を目指した新規免疫療法開発の基礎的検討; 濱西潤三、万代昌紀、松村謙臣、馬場長、八木治彦、山口建、樋口壽宏、高倉賢二、小西郁生、藤井信吾; 第 61 回日本産科婦人科学会学術集会 高得点演題口演 H21 年 4 月 5 日, 国立京都国際会館
- ④ 卵巣癌大網転移におけるメチル化遺伝子群の発現と TGF- $\beta$  活性の亢進; 山村省吾、松村謙臣、山口建、濱西潤三、馬場長、万代昌紀、小西郁生; 第 61 回日本産科婦人科学会学術集会 H21 年 4 月 4 日, 国立京都国際会館
- ⑤ 免疫細胞の浸潤パターンに基づく階層的クラスター解析により、COX 高発現/予後不良の卵巣癌を同定できる; 吉岡弓子、松村謙臣、八木治彦、馬場長、鈴木彩子、濱西潤三、福原健、万代昌紀、小西郁生; 第 61 回日本産科婦人科学会学術集会 H21 年 4 月 5 日, 国立京都国際会館
- ⑥ Activated local immunity by chemokine CCL19-transduced embryonic endothelial progenitor cells suppresses lung metastasis of murine ovarian cancer; J. Hamanishi, M. Mandai, N. Matsumura, T. Higuchi, K. Takakura, K. Yamaguchi, S. Fujii, I. Konishi; 40th Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists. 2/5-2/8 2009, San Antonio, TX.
- ⑦ Gene signature specific for ovarian clear cell carcinoma is induced by the contents of endometriotic cysts;

K. Yamaguchi, M. Mandai, N. Matsumura, T. Baba, T. Oura, S. Matsui, S. K. Murphy, A. Berchuck, S. Fujii, I. Konishi; 40th Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists. 2/5-2/8 2009, San Antonio, TX.

⑧ 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) is effective in targeting ovarian cancer spheroids; E. Kondoh, T. Baba, N. Matsumura, I. Konishi, S. Fujii, A. Berchuck, S. K. Murphy; 40th Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists. 2/5-2/8 2009, San Antonio, TX.

⑨ The Characteristic Biology of Ovarian Clear Cell Ca. defined by Microarray Reflects the Specific Carcinogenetic Process; 山口建、万代昌紀、山村省吾、濱西潤三、馬場長、松村謙臣、豊國伸哉、藤井信吾、小西郁生; 第 67 回日本癌学会学術総会 ワークショップ口演 H20 年 10 月 28 日、名古屋国際会議場

⑩ BIGH3, target of methylation in ovarian cancer, is up-regulated in omental metastasis; 山村省吾、松村謙臣、万代昌紀、馬場長、濱西潤三、山口建、小西郁生、Susan Murphy, Zhiqing Huang, Andrew Berchuck; 第 67 回日本癌学会学術総会 ワークショップ口演 H20 年 10 月 29 日、名古屋国際会議場

⑪ Activated local immunity by CCL19-transfected embryonic endothelial progenitor cells suppresses lung metastasis; 濱西潤三、万代昌紀、松村謙臣、山口建、藤井信吾、小西郁生; 第 67 回日本癌学会学術総会 H20 年 10 月 29 日、名古屋国際会議場

⑫ 卵巣癌におけるメチル化は予後不良と関連し、TGFβ 経路の抑制をもたらす; 松村謙臣、Susan Murphy、万代昌紀、福原健、鈴木彩子、樋口壽宏、高倉賢二、藤井信吾; 第 60 回日本産科婦人科学会学術集会 H20 年 4 月 13 日、パシフィコ横浜

⑬ 卵巣癌の組織型によって特徴づけられる癌遺伝子シグナル伝達経路のマイクロアレイを用いた解析; 山口建、万代昌紀、松村謙臣、濱西潤三、鈴木彩子、八木治彦、福原健、高尾由美、巽啓司、樋口壽宏、高倉賢二、藤井信吾; 第 60 回日本産科婦人科学会学術集会 H20 年 4 月 13 日、パシフィコ横浜

⑭ 卵巣癌における NKG2D リガンド発現の臨床的意義; 濱西潤三、李奎、万代昌紀、樋口壽宏、松村謙臣、八木治彦、福原健、劉敏、山口建、高倉賢二、藤井信吾; 第 60 回日本産科婦人科学会学術集会 H20 年 4 月 15 日、パシフィコ横浜

⑯ Transcriptome analysis of DNA methylation status in ovarian cancer - Correlation of aggressiveness and TGFβ pathway; N. Matsumura, Z. Huang, T. Perry, D. Kroyer, T. Baba, S. Mori, M. Mandai,

I. Konishi, S. Fujii, A. Berchuck, S. K. Murphy; 39th Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists. 3/9-3/12 2008, Tampa, FL

⑰ Gene signature-based oncogene pathway analysis in ovarian cancer; difference by histologic subtypes; K. Yamaguchi, M. Mandai, N. Matsumura, J. Hamanishi, T. Higuchi, K. Takakura, I. Konishi; 39th Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists. 3/9-3/12 2008, Tampa, FL

⑱ Targeting dormant ovarian cancer cells; E. Kondoh, T. Baba, N. Matsumura, S. Fujii, A. Berchuck, S. K. Murphy; 39th Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists. Focused Plenary Session 3/10 2008, Tampa, FL

⑲ Microarray analysis identifies NSC668814 as a potentially active chemotherapeutic agent for platinum-resistant ovarian cancer cells with TP53 mutations; T. Baba, S. Mori, N. Matsumura, M. Bernardini, S. Fujii, A. Berchuck, S. K. Murphy; 39th Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists. 3/9-3/12 2008, Tampa, FL

⑳ Stem cell marker CD133 (PROMININ-1) is epigenetically regulated in ovarian cancer; T. Baba, P. A. Convery, N. Matsumura, R. S. Whitaker, T. Perry, Z. Huang, S. Mori, E. Kondoh, R. C. Bentley, S. Fujii, J. R. Marks, A. Berchuck, S. K. Murphy; 39th Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists. 3/9-3/12 2008, Tampa, FL

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 謙臣 (MATSUMURA NORIOMI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号: 20452336

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし