

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09798

研究課題名(和文) 卵巣癌における腹水中の微量銅元素増加の意義解明と新規銅制御治療法の開発

研究課題名(英文) Sure, here is your revised text: Elucidation of the Significance of Increased Copper in Ascites Fluid in Ovarian Cancer and Development of Novel Copper-Controlled Therapy

研究代表者

大沼 利通 (Onuma, Toshimichi)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：70620483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：良性腫瘍や境界悪性と比較して卵巣癌では腹水Cu濃度が有意に高値であった。腹水中Cu濃度は年齢、BMI、アルコール、喫煙、サプリメント使用を調整後も卵巣癌と関連していた。マイクロアレイ解析では、CuはOVCAR3、A2780、Met5A細胞の血管新生関連のbiological processを増加させていた。さらにCuはVEGF mRNA発現とタンパク質分泌を有意に増強することが示された。悪性卵巣腫瘍患者の腹水中Cu濃度はVEGFレベルおよび腫瘍の臨床病期と相関していた。腹水中のCu濃度を低下させる治療は、VEGF発現を抑制し卵巣癌の予後改善に寄与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹水は悪性腫瘍の予後不良に関連しているが、含まれる微量元素の種類についてや、その微量元素の生物学的意義は不明であった。本研究では、卵巣腫瘍患者の腹水中では銅が増加することを示した。さらに銅は卵巣癌と腹膜を構成する中皮細胞の血管新生に関連していることを示した。血管新生は癌の予後悪化に寄与している。実際に卵巣癌患者の腹水銅濃度は血管内皮増殖因子の濃度と相関していることを示した。銅キレート剤は既に他疾患で使用されて安価である。この研究は銅キレート剤を腹水が貯留した卵巣癌患者の治療に利用できる可能性があることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Ascites Cu concentrations were significantly higher in ovarian cancer than in benign or borderline malignant tumors. Ascites Cu concentrations were associated with ovarian cancer after adjustment for age, BMI, alcohol, smoking, and supplement use. Microarray analysis showed that Cu increased angiogenesis-related biological processes in OVCAR3, A2780, and Met5A cells. Furthermore, Cu significantly enhanced VEGF mRNA expression and protein secretion in VCAR3, A2780, and Met5A cells. Cu levels in the ascites fluid of patients with malignant ovarian tumors are correlated with VEGF levels and clinical stage. Treatment to reduce Cu levels in ascites fluid may contribute to the improvement of ovarian cancer prognosis by suppressing VEGF expression.

研究分野：産婦人科

キーワード：卵巣癌 腹水 微量元素 銅 血管新生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

微量元素は多様な生理作用を有し、生体内で重要な役割を担っているものの、婦人科疾患との関わりについては、未だ十分に解明されていない。申請者は、1pg/mL レベルまで高感度に検出可能な誘導結合プラズマ分析装置を用いて、腹水中微量元素の網羅的解析を行ってきた。その結果、卵巣癌腹水では銅元素(Cu)が高値であり、その濃度は卵巣癌の進行期と相関していた。これは、腹水中の Cu が、卵巣癌の予後悪化要因であることを示唆している。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、腹水中の Cu が卵巣癌の進展を増強するメカニズムを解明することである。

### 3. 研究の方法

#### 1. 腹水測定対象患者

2014 年から 2019 年にかけて福井大学病院で卵巣腫瘍の手術を受けた患者がこの研究に登録された。除外基準は、細菌性腹膜炎の存在、腎不全および肝硬変の存在、ステロイド治療中、免疫抑制剤の使用、サンプル採取前の化学療法、および転移性卵巣癌の存在とした。手術において、腹膜切開直後にダグラス窩から吸引チューブを用いて腹水を採取した。

#### 2. ICP-MS を用いた腹水多元素測定

2014 年から 2016 年の間に手術を受けた 22 人の良性腫瘍患者と 4 人の悪性/境界悪性腫瘍患者の腹水を 1 次スクリーニングとして誘導結合プラズマ分析装置(ICP-MS)で解析した。Al、Co、Ni、Cu、Zn、As、Se、Mo、Cd、Sb、Ba、および Pb 濃度測定した

#### 3. 卵巣腫瘍の腹水中測定

2016 年から 2019 年に手術を受けた患者の腹水中の Cu レベルは、原子吸光分光法(AAS)を使用して測定された。

#### 3. 細胞培養

細胞株 Met-5A (中皮細胞)、OVCAR3 (漿液性癌) および A2780 (類内膜癌) が使用された。

#### 4. マイクロアレイ解析

細胞は 0 または 200  $\mu$ M Cu で処理され、Clariom S Assay を使用してマイクロアレイ解析を行い発現変動遺伝子(DEG)を特定した。Gene Ontology 解析は PANTHER を使用して実施された。

#### 5. VEGF 発現

VEGF mRNA 発現はリアルタイム PCR で解析された。VEGF タンパク質分泌レベルは ELISA で測定された。

### 4. 研究成果

#### 卵巣癌患者の腹水では一部の微量元素の濃度上昇が認められた

ICP-MS による解析では Co、Ni、Cu、Zn、As、Se、Mo の濃度は、良性卵巣腫瘍と比較して境界悪性卵巣腫瘍/卵巣癌で有意に増加していた。

#### 腹水中の Cu 濃度上昇は独立して卵巣癌と関連していた

血清 Cu 濃度の上昇は、悪性卵巣腫瘍と関連していることが報告されている。私たちは Cu に関して解析を行う方針とした。AAS を用いた、卵巣腫瘍と腹水中の銅のより深い分析では、良性腫瘍患者と境界悪性腫瘍患者の間で、腹水の Cu 濃度に有意差はなかった。しかしながら、卵巣癌患者は、良性腫瘍患者と比較して腹水 Cu 濃度の有意な上昇を示した。多変量解析では年齢、BMI、アルコール、喫煙、サプリメント使用で調整後も卵巣癌が腹水中の Cu 濃度の上昇と独立して関連していることを示された(表 1)。

Patient characteristics and ascite Cu levels (measured using atomic absorption spectrometry) during validation analysis.

Disease groups	Benign	Borderline	Malignant	p value
n	88	11	26	
Age, years, mean (SD) <sup>a</sup>	40.9 (15.1)	54.9 (18.6)	52.9 (12.1)	<0.001
Menopause % (n) <sup>b</sup>	18.2 (16)	54.5(6)	57.7 (15)	<0.001
BMI, kg/m <sup>2</sup> , mean (SD) <sup>a</sup>	22.4	22.9	23.8 (4.6)	0.259
Smoking <sup>b</sup>				0.967
Never % (n)	76.1 (67)	81.8 (9)	84.6 (22)	
Current % (n)	11.4 (10)	9.1 (1)	7.7 (2)	
Past % (n)	12.5 (11)	9.1 (1)	7.7 (2)	
Alcohol % (n) <sup>b</sup>	43.2(38)	54.5 (6)	26.9 (7)	0.201
Supplement % (n) <sup>b</sup>	28.4 (25)	18.2 (2)	15.4 (4)	0.391
Ascites Cu, ppb, median <sup>c</sup>	596.6	720.0	878.1	<0.001
Range	12-141	28-186	24-139	

<sup>a</sup> One-way ANOVA adjusted using the Holm method was used for statistical analysis.

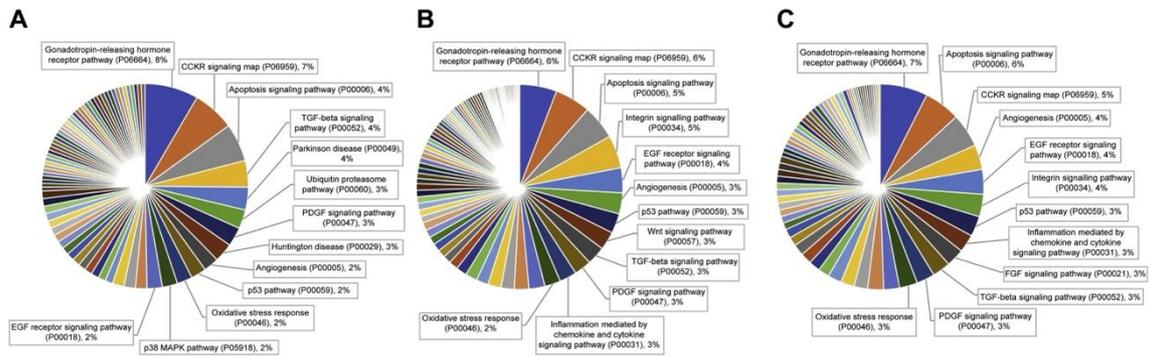
<sup>b</sup> Fisher's exact test adjusted using the Holm method was used for statistical analysis.

<sup>c</sup> Kruskal-Wallis rank-sum test adjusted using the Steel method was used for statistical analysis. BMI, body mass index; SD, standard deviation.

(表 1: 良性卵巣腫瘍、境界悪性卵巣腫瘍、卵巣癌の腹水中 Cu 濃度)

### Cu が誘導する DEG は卵巣癌および中皮細胞の血管新生促進に関与していた

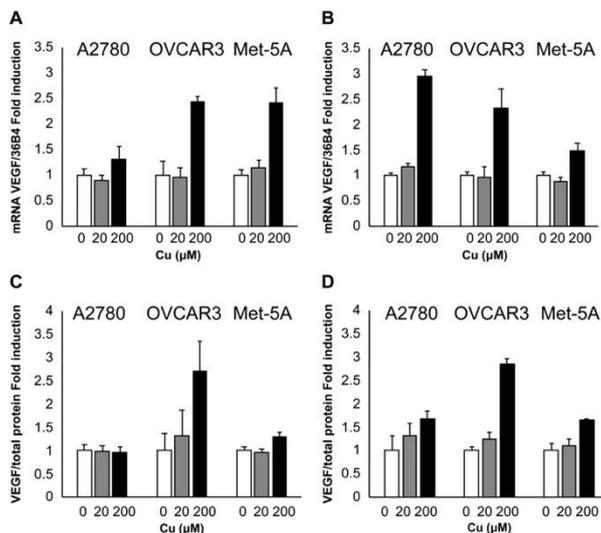
Met-5A、OVCAR3、A2780 細胞に Cu を添加してマイクロアレイ解析を行った。得られた DEG による Panther pathway 解析には angiogenesis が含まれていた。さらに GO-Slim Biological Processes では全ての細胞株で血管新生に関連した Biological process が含まれていた(図 1)。



(図 1: Cu 添加による Met-5A、OVCAR3、A2780 細胞の pathway 変化。A:A2780, B:OVCAR3, C:Met-5A)

### Cu は卵巣癌および中皮細胞において VEGF 発現を誘導する

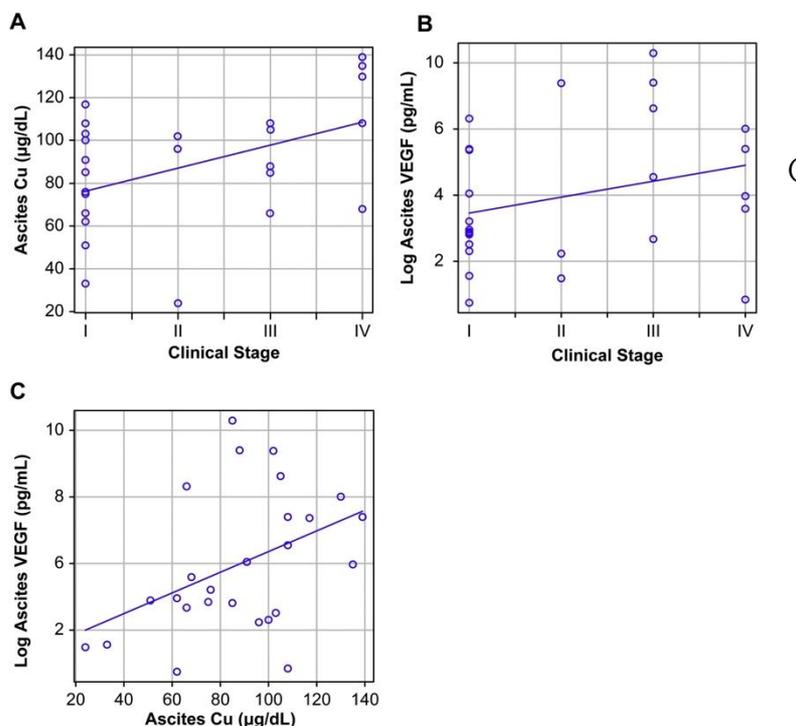
Panther pathway 及び GO-Slim Biological Processes 解析では血管新生が関連していた。そこで VEGF を解析する方針とした。Cu 200 μM で 24 時間処理した Met-5A、OVCAR3、A2780 細胞では、VEGF mRNA レベルおよび VEGF 蛋白分泌が有意に増加した(図 2)。



(図 2: Cu 添加と Met-5A、OVCAR3、A2780 細胞の VEGF mRNA 発現と蛋白分泌。A, C: Cu で細胞を 4 時間処理、B, D: Cu で細胞を 24 時間処理)

### 卵巣癌における腹水中 Cu 濃度と腹水中 VEGF 濃度は相関する

卵巣癌の腹水中 Cu 濃度と臨床進行期または VEGF 濃度との相関を解析した。腹水中 Cu 濃度は臨床進行期と有意に相関していた。腹水中 Cu 濃度は腹水中 VEGF 蛋白濃度と有意に相関していた(図 3)。



(図 3: 卵巣癌腹水中 Cu 濃度、VEGF 濃度、臨床進行期の関連。A: 腹水 Cu と臨床進行期、B: 腹水 VEGF 濃度と臨床進行期、C: 腹水 VEGF 濃度と腹水 Cu 濃度)

我々の解析は、腹水中 Cu 濃度が卵巣癌患者で有意に上昇していることを示した。Cu は卵巣癌において血管新生を促進する Biological process を活性化し、卵巣癌および腹膜細胞における VEGF 産生を増加させることが明らかにした。卵巣癌の腹水中 Cu 濃度は腹水中 VEGF 濃度とも関連していた。以上より腹水 Cu は卵巣癌の進行に寄与している可能性がある。銅キレート剤による治療は VEGF 産生を減少させ、卵巣癌の予後を改善する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Toshimichi Onuma, Tetsuji Kurokawa, Akiko Shinagawa, Yoko Chino, Yoshio Yoshida	4. 巻 25(10)
2. 論文標題 Evaluation of the concordance in HPV type between self- and physician-collected samples using a brush-based device and a PCR-based HPV DNA test in Japanese referred patients with abnormal cytology or HPV infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1854-1860
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-020-01727-5	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 -
1. 著者名 Onuma Toshimichi, Mizutani Tetsuya, Fujita Yuko, Yamada Shizuka, Yoshida Yoshio	4. 巻 68
2. 論文標題 Copper content in ascitic fluid is associated with angiogenesis and progression in ovarian cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Trace Elements in Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 126865 ~ 126865
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtemb.2021.126865	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toshimichi Onuma, Tetsuya Mizutani, Yuko Fujita, Nobutaka Ohgami, Shoko Ohnuma, Masashi Kato, and Yoshio Yoshida	4. 巻 13(3)
2. 論文標題 Zinc deficiency is associated with the development of ovarian endometrial cysts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1049-1066
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Onuma Toshimichi, Asare-Werehene Meshach, Yoshida Yoshio, Tsang Benjamin K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Exosomal Plasma Gelsolin Is an Immunosuppressive Mediator in the Ovarian Tumor Microenvironment and a Determinant of Chemoresistance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3305 ~ 3305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11203305	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大沼利通 黒川哲司 品川明子 知野陽子 吉田好雄
2. 発表標題 PCR法を用いたHPV自己採取と医師採取のHPV型一致率についての検討
3. 学会等名 福井県婦人科腫瘍研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大沼利通 山本真 津吉秀昭 品川明子 知野陽子 黒川哲司 吉田好雄
2. 発表標題 腹水中Mg, Fe, Cuと卵巣癌との関連についての検討
3. 学会等名 第61回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大沼利通 山本真 津吉秀昭 品川明子 知野陽子 黒川哲司 吉田好雄
2. 発表標題 腹水中Mg, Fe, Cuと卵巣癌との関連についての検討
3. 学会等名 第37回日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究分担者	吉田 好雄  (Yoshida Yoshio)  (60220688)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授    (13401)	

6. 研究組織（つづき）

	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 分担者	黒川 哲司  (Kurokawa Tetsuji)  (60334835)	福井大学・学術研究院医学系部門・客員准教授    (13401)	

	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	水谷 哲也  (Mizutani Tetsuya)	福井県立大学・看護福祉学部・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関