

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591935

研究課題名（和文）卵巣癌に対する新規抗腫瘍剤開発のための基礎的研究

研究課題名（英文）Development of new anti-cancer agents for ovarian cancer

研究代表者

横山 良仁（YOKOYAMA YOSHIHITO）

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90261453

研究成果の概要（和文）：クロフィブリン酸によって増加する carbonyl reductase 遺伝子を導入された卵巣癌細胞による腫瘍はある時点までは増殖するが、その後は自然に退縮した。アポトーシス細胞の発現増加と血管新生の抑制がおこるためである。また貪食細胞とアポトーシス細胞との間のファゴサイトーシスのためのネクローシスの増加が腫瘍の自然退縮する機序である。また、ヌードマウスに卵巣癌の皮下腫瘍を作製し、光感受性物質である 5-アミノレブリン酸メチルエステル塩酸塩による光線力学的療法を行ったところ有意な腫瘍縮小効果を得た。

研究成果の概要（英文）：Clofibric acid, a peroxisome proliferator-activated receptor α ligand, inhibits proliferation of ovarian cancer by decreasing prostaglandin (PG) E_2 activity through induction of carbonyl reductase (CR), a PGE_2 -converting enzyme, in tumor. The tumor volume of the CR induction group increased up to the 2nd week but then decreased continually until the 5th week of observation. Increased necrosis due to phagocytosis of apoptotic cells by phagocytes attracted by increased Milk fat globule EGF factor 8 was considered to be the mechanism of spontaneous tumor regression in the CR induction group. Also, photodynamic therapy of a methyl ester of 5-aminolevulinic acid significantly suppressed the growth of HTOA tumors as compared to control.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：卵巣癌、抗腫瘍剤、クロフィブリン酸、Carbonyl reductase、光線力学的療法、アミノレブリン酸メチルエステル塩酸塩、プロトポルフィリン IX、プロスタグランジン E_2

1. 研究開始当初の背景

クロフィブリン酸、シグリタゾン、ピオグリ

タゾン、メロキシカムともプロスタグランディン(PG) E_2 レベルの低下を介して血管新生抑制、アポトーシスの誘導により卵巣癌に対する抗腫瘍効果を発揮する。これらは卵巣癌の中でも担癌モデルと癌性腹膜炎モデルという癌の late stage での研究結果である。Mullerian inhibiting substance type II receptor に SV40 T Antigen を組み込んだ transgenic male mouse (*MISIR-Tag* transgenic mouse) と Wild type female mouse から生まれた female mouse からは自然発生的に発癌する卵巣癌は early stage に相当する。この遺伝子操作を施した卵巣癌の自然発癌マウスを用いクロフィブリン酸、シグリタゾン、ピオグリタゾン、メロキシカムの各単剤、あるいはコンビネーションにより発癌抑制効果、腫瘍抑制効果を証明することを目指す。一方、癌細胞を腹腔内に直接注入して作製した癌性腹膜炎マウスの場合、癌性腹膜炎が全例に発生するとはかぎらない、あるいは病状の進行に差がでる場合がありえることが弱点として挙げられる。それを解決するため microsurgery の手法により卵巣 intrabursa に卵巣癌細胞を移植することにより 100%の確率で癌性腹膜炎マウスモデルを作製することが可能であり、この手法を用いて卵巣癌 late stage でのクロフィブリン酸、シグリタゾン、ピオグリタゾン、メロキシカム単剤あるいはコンビネーションでの抗腫瘍効果を再検証する。

2. 研究の目的

(1) 遺伝子操作を施した卵巣癌の自然発癌マウスを用い、クロフィブリン酸、メロキシカム、シグリタゾン、ピオグリタゾンの抗腫瘍効果を確認することを最大の目的とする。クロフィブリン酸はプロスタグランディン(PG) E_2 を $PGF_2\alpha$ に変換する Carbonyl reductase (CR)の発現を増加させることで抗腫瘍効果を発揮する。そこで(2)CR 導入卵巣癌細胞を作製し in vitro での腫瘍細胞増殖の違いと in vivo での腫瘍形成・転移の違いを血管新生やアポトーシスの面からデータを集積する。臨床的側面からはクロフィブリ

ン酸に焦点を絞り(3)フィブラート系高脂血症剤内服患者からの各種癌発生率と死亡率を調べ、一般的に公表されている癌発生率と死亡率と比較し癌腫の違いで特徴がないかどうかの疫学調査を行う。クロフィブリン酸併用は相乗的にシスプラチンによる卵巣癌細胞の増殖を抑制することを in vitro で証明した。そこで(4)将来の臨床応用を目指し in vivo の実験系でシスプラチンとフィブラート系高脂血症剤を併用し、その抗腫瘍効果と安全性を検討する。

3. 研究の方法

(1)CR cDNA をリポフェクション法にてマウス卵巣癌細胞 T-Ag-MOSE に導入した。CR 導入 T-Ag-MOSE 細胞 (CR 導入群) とコントロールとして無処置 T-Ag-MOSE (コントロール群) を8週齢のヌードマウス背側に $0.5 \times 10^6/ml$ の濃度で移植した。その後両群の腫瘍増殖を5週間観察した。また観察3週目に両群の一部のマウスから腫瘍を摘出し病理学的、生化学的実験に供した。

(2)漿液性腺癌細胞 HTOA、HRA、DISS、粘液性腺癌細胞 MCAS、明細胞腺癌細胞 TOV21G の5種類を用い、ヌードマウスに皮下腫瘍を作りアミノレブリン酸塩酸塩を用いた光線力学的療法(Methyl-ALA-PDT)を施行した。

(3) 卵巣癌細胞株 DISS 細胞を用いた癌性腹膜炎ラットを作製し、開腹後光照射のみ(コントロール) 対 Methyl-ALA-PDT、Debulking surgery (DS) 対 DS+Methyl-ALA-PDT の生存期間を比較した。

(4) DISS (PDT 感受性) と MCAS (PDT 不応性) のヘム合成と分解経路の変換酵素群の遺伝子プロファイルをマイクロアレイで解析した。

4. 研究成果

(1)CR 遺伝子を導入された卵巣癌細胞による腫瘍はある時点までは増殖するが、その後は自然に退縮していった。CR 導入群の腫瘍はネクローシスと炎症性細胞浸潤が顕著であった。さらにアポトーシス細胞の出現頻度はコントロール群に比べ CR 導入群で有意に増加していた。マクロファージなどの貪食細胞を引き寄せる Eat-me-signal である milk fat

globule EGF factor 8 (MFG-E8)はCR 導入群で明らかに増加していた。MFG-E8 はCR 導入群の腫瘍細胞質内あるいは間質細胞内に広く分布し、マクロファージがアポトーシス細胞を貪食している像が蛍光二重染色で確認された。腫瘍組織内の VEGF 発現はコントロール群に比べ CR 導入群で減少していた。以上の結果から CR 導入細胞の腫瘍内ではアポトーシス細胞の発現増加と血管新生の抑制が引き起こされることが示唆された。さらに、増加した MFG-E8 によって引き寄せられた貪食細胞とアポトーシス細胞との間のファゴサイトーシスのためのネクローシスの増加が CR 導入細胞の腫瘍が自然退縮する機序と考えられた。

(2) Methyl-ALA-PDT の腫瘍増殖は HTOA、HRA、DISS の皮下腫瘍で有意に抑制された。これらの腫瘍内ではアポトーシス細胞が有意に増加しかつアポトーシス細胞の貪食に関与する MFG-E8 の発現が増加していた。さらに Methyl-ALA-PDT の効果のあった腫瘍内では血管新生因子の VEGF と CD34 陽性の微小血管密度が有意に減少していた。5.5 μ M の Methyl-ALA を 5 種類の卵巣癌細胞に添加すると、細胞内プロトポルフィリン IX (PpIX) 量は HTOA、HRA、DISS (PDT 感受性) において MCAS、TOV21G (PDT 不応性) に比べ有意に高値であった。Methyl-ALA-PDT で抗腫瘍効果を発揮するためには細胞内 PpIX 量が重要であることが示唆された。

(3) Methyl-ALA-PDT、DS+Methyl-ALA-PDT で有意に生存期間の延長が得られた。

(4) MCAS ではヘム合成経路の δ ALA 合成酵素 (3 倍)、ヘム分解経路の Heme oxygenase 2 (10 倍) と Biliverdin reductase B (7 倍) の遺伝子発現が DISS に比べ増加していた。この結果はヘム合成・分解とも活発な細胞では外因性のアミノ酸誘導体を取り込んでも PpIX が細胞内に蓄積されにくいことが示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 33 件)

- ① Yokoyama Y, Mizunuma H. Peroxisome proliferator-activated receptor and epithelial ovarian cancer. Eur J Gynaecol Oncol 査読あり 2010; 31: 612-615.
- ② Wakui M, Yokoyama Y, Wang H, Shigeto T, Futagami M, Mizunuma H. Efficacy of a methyl ester of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy for ovarian cancers. J Cancer Res Clin Oncol 査読あり 2010; 136: 1143-1150.
- ③ Shigeto T, Yokoyama Y, Wakui M, Mizunuma H. Endostatin inhibits xenografted human ovarian cancer growth. Cancer Therapy 査読あり 2009; 7: 347-353.
- ④ 横山良仁、辛兵、二神真行、梅本実香、葛西亜希子、重藤龍比古、水沼英樹 PPAR と卵巣癌 青森臨産婦誌 査読あり 24: 49-55, 2009

[学会発表] (計 20 件)

- ① 泉井もえ他、卵巣癌に対する光線力学的療法の有効性、第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会、2010 年 4 月 23 日、東京
- ② 横山良仁、生涯研修プログラム クリニカルカンファレンス：女性のライフステージにおける健康管理 婦人科腫瘍手術後の問題点と健康管理、第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会、2010 年 4 月 23 日、東京
- ③ 横山良仁、東北婦人科腫瘍研究会 (多施設共同試験) 婦人科悪性腫瘍術後の健康維持管理についての意識調査 第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会、2010 年 4 月 25 日、東京
- ④ 横山良仁他、卵巣癌に対する光線力学的療法とクロフィブリン酸の同時療法の有効性の検討 第 47 回日本婦人科腫瘍学会公募研究報告、2009 年 11 月 21 日、東京
- ⑤ 横山良仁、血管新生阻害を標的とする進

行卵巢癌の新規治療法の開発 第 13 回
弘前大学医学部学術特別賞受賞記念講演
第 146 回弘前医学例会、2009 年 1 月 30
日、弘前

- ⑥ 横山良仁 シンポジウム PPAR の臨床
卵巢癌 第 9 回関東ホルモンと癌研究会、
2009 年 1 月 24 日、東京
- ⑦ 横山良仁他、Carbonyl reductase 強発現
卵巢悪性腫瘍は自然退縮する 第 60 回
日本産科婦人科学会学術講演会、2008 年
4 月 14 日、横浜
- ⑧ Yokoyama Y, et al. A phase II
multicenter trial of concurrent
chemoradiotherapy with weekly
nedaplatin in advanced uterine
cervical carcinoma: Tohoku
Gynecologic Cancer Unit (TGCU) Study.
12th Biennial Meeting of International
Gynecological Cancer Society, Bangkok
2008.
- ⑨ Matsuki M, et al. Efficacy of
Photodynamic Therapy in Ovarian
Cancers. 12th Biennial Meeting of
International Gynecological Cancer
Society, Bangkok 2008.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 良仁 (YOKOYAMA YOSHIHITO)

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号 : 90261453

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :