

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2009～2010
課題番号：	21791578
研究課題名(和文)	プロモーターマイクロアレイを用いたトポテカンの新たな分子標的作用の解析
研究課題名(英文)	Analysis of a new molecule target action of topotecan using a promoter microarray
研究代表者	
	佐々木 浩 (Sasaki Hiroshi)
	大阪医科大学・医学部・助教
	研究者番号： 80432491

研究成果の概要(和文)：白金製剤耐性の再発卵巣癌の key drug であるトポテカンの白金製剤感受性獲得メカニズムはシスプラチンによりリン酸化された Akt がトポテカンにより解除されることによるものであることを in vitro および in vivo を用いて解明した。さらに白金耐性卵巣癌細胞株におけるシスプラチン添加により引き起こされる血管新生反応のメカニズムは Akt の下流にある HIF-1 $\cdot$  が VEGF のプロモータ領域に結合し血管新生が引き起こされていることを解明した。

研究成果の概要(英文)： We revealed the mechanism that Topotecan reacquire the effect of cisplatin in platinum resistance ovarian cancer. Furthermore we revealed the mechanism of angiogenesis by cisplatin in platinum resistance ovarian cancer.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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

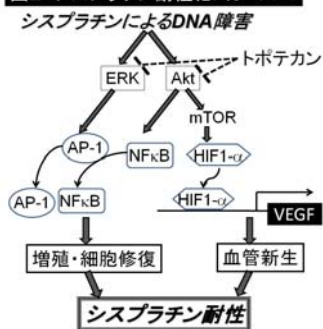
キーワード：(1)シスプラチン (2)トポテカン (3)プラチナ耐性 (4)Akt (5)NF $\cdot$ B (6)VEGF (7)卵巣癌

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は初回腫瘍減量術と術後化学療法が基本的治療であるが、生存率が最も低い婦人科癌である。その理由として、当初抗がん剤に感受性を示していても次第に耐性を示す場合が多いことが考えられる。1st line の key drug である白金製剤耐性の再発卵巣癌は一時期抗癌剤治療により寛解してもすぐに再増殖や転移をみることが多い。このような難治性卵巣癌の治療として、トポテカン・ドキシ

ル・ジェムシタピンが欧米では使用されているが、本邦ではまだ認可されていない。本邦でも認可されているイリノテカンは、トポテカンと同様にカンプトテシン誘導体であり、白金製剤耐性の再発卵巣癌に対する治療効果が期待される。しかしながら、トポテカンも含めドキシル・ジェムシタピンがなぜ白金製剤耐性の再発卵巣癌に効果が期待されるのかの科学的なメカニズムは全く不明である。我々は、卵巣癌において、白金製剤であ

図2 シスプラチン耐性化メカニズム



移に関与する転写因子 nuclear factor κB (NFκB) (Ref.4,5) が関与し、それらの分子をブロックすればシスプラチンの感受性が増強することを *in vitro* および *in vivo* において明らかにしてきた(Ref.6) (図1)。すなわち、卵巣癌の薬剤耐性化に対する分子標的治療として、シスプラチンの耐性化に関与するAkt および ERK 両経路をブロックする事は極めて重要でその効果が期待される。近年、トポテカンが肺癌において、Akt 経路をブロックすることが報告された (Ref.7)。すなわち、トポテカンが白金製剤耐性の主要な経路である Akt 経路をブロックすることにより、耐性解除につながる事が期待される。我々は、DNA マイクロアレイには遺伝子のプロモーター領域を含んでいないため、それを進化させたプロモーターマイクロアレイを開発し、シスプラチンにより誘導される JNK の標的遺伝子解析に成功し (Ref.8)、特許を得ている。本研究では、その技術を応用し (Ref.9)、トポテカンの白金製剤感受性獲得メカニズムをプロモーターマイクロアレイを用い解析したい。また、卵巣癌を含む固形癌は、腫瘍および転移病巣から分泌されるサイトカイン類により栄養血管が形成されるが、その血管新生メカニズムの主要な因子である VEGF は Akt 経路の標的遺伝子である (図1) ので、トポテカンの白金製剤により引き起こされる血管新生反応への影響をも解明したい。

## 2. 研究の目的

我々はシスプラチン耐性卵巣癌にシスプラチンを添加すると細胞内での VEGF 発現が増加し、血管新生反応が引き起こされる可能性があることを基礎実験にて確認している。そしてトポテカンは Akt, ERK 経路の下流にある転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF)-1α を制御し VEGF 発現を抑制することも示唆された。VEGF は腫瘍細胞より産生され、局所の血管新生に重要な分子のひとつである (図1)。よって、シスプラチン耐性卵巣癌のトポテカンによる耐性解除のメカニズムを解析するとともに、シスプラチンにより増強した血管新生反応がトポテカンに

るシスプラチンの耐性化機構に生存シグナルである ERK 経路 (Ref.1) と Akt 経路 ( Ref. 2,3) およびその下流にあり薬剤耐性化のみならず、がんの浸潤・転

より抑制されるメカニズムを明らかにしたい。さらに複数の卵巣癌種と複数の抗癌剤においても同様に検討し、Akt/ERK の活性化の違い、HIF-1α/VEGF の発現の違いによる抗癌剤耐性メカニズムと耐性解除メカニズムを明らかにし、患者を個別化したオーダーメイド治療の確立に貢献したい。

### ②-2 プロモーターマイクロアレイを用いたシスプラチン耐性遺伝子の検索

さらにシスプラチン耐性化に関与する転写因子を含む標的遺伝子を解析する。Akt 下流の転写因子 NFκB, HIF-1α, ERK 下流の転写因子 AP-1 蛋白の結合部位を含むプロモーターマイクロアレイを作成し、シスプラチンにより発現が誘導され耐性化に関与する遺伝子を同定し、トポテカンによりその発現誘導が抑制されシスプラチンの感受性が増強するか否かを解析する。

### ②-3 解析された標的遺伝子の *in vitro* および *in vivo* における検証

シスプラチン耐性卵巣癌細胞株を用いて、シスプラチン耐性化遺伝子の発現がシスプラチンにより増加し、トポテカンにより抑制されるか否かを *real-time PCR* にて確認する。さらにシスプラチン耐性化遺伝子の siRNA を遺伝子導入し発現を抑制することによりシスプラチン耐性が解除され感受性を獲得するか否かを MTS assay にて検討する。次にシスプラチン耐性化遺伝子をクローニングしたアデノウイルス発現ベクターを作成し、そのベクターをシスプラチン感受性卵巣癌モデルマウスに腹腔内投与しシスプラチン耐性を示すか否かを検討する。逆にシスプラチン耐性化遺伝子の siRNA を含むアデノウイルス発現ベクターを作成し、シスプラチン耐性卵巣癌モデルマウスに腹腔内投与し、感受性を再獲得するか否かを検討する。以上のモデルマウスより摘出した腫瘍のパラフィン切片を作成し、Akt, ERK のリン酸化や、VEGF の発現レベルの検討そして血管新生の分布を免疫染色し、シスプラチン耐性・感受性の評価を総合的に確認する。

### ③本研究の意義

トポテカンが転写因子 HIF-1α を抑制することは、グリオーマや神経芽細胞腫で報告されているが、卵巣癌での報告はなく、特にシスプラチン耐性癌の耐性解除メカニズムを検討した報告は全くない。細胞株を用いた *in vitro* 実験と、ヌードマウスを用いた *in vivo* 実験により、シスプラチン耐性卵巣癌と感受性卵巣癌両者における、トポテカン添加後の細胞内シグナル伝達の相違を明らかにし、耐性化メカニズムと耐性解除・感受性獲得メカニズムを解明したい。そして腫瘍内の血管新生制御にも着目し、抗がん剤の殺細胞効果のみならず腫瘍周囲環境への影響を検討し解明していくことは、分子標的治療を開発する

上で大きな手がかりとなるはずである。

#### References

1. Hayakawa J, Ohmichi M et al. J. Biol. Chem. 1999 274: 31648
2. Hayakawa J, Ohmichi M et al. Cancer Res. 2000 60: 5988
3. Mabuchi S, Ohmichi M et al. J. Biol. Chem. 2002 277: 33490
4. Mabuchi S, Ohmichi M et al. J. Biol. Chem. 2004 279: 23477
5. Mabuchi S, Ohmichi M et al. Clin. Cancer Res. 2004 10: 7645
6. Ohmichi M et al. Trends Pharmacol.Sci. 2005 26, 113
7. Nakashio A, Tsuruo T et al. Cancer Res. 2000 15 60: 5303
8. Hayakawa J, Ohmichi M et al. Molecular Cell 2004 16, 521
9. Sasaki H, Ohmichi M et al. Oncogene. 2008 27:2737

#### 3. 研究の方法

##### ① トポテカンの Akt/ERK 両経路への影響

###### 1) シスプラチン耐性ヒト卵巣癌細胞株

Caov-3 細胞(Hayakawa J, Ohmichi M, Tanabe (Kimura) A et. al. J. Biol.Chem. 1999 274: 31648)、RMG-1, Skov-3, およびシスプラチン感受性株 A2780 にシスプラチンを添加し、Akt および ERK 両経路への影響を、Akt および ERK のリン酸化を認識する抗体を用いた Western Blotting 法にて確かめる。(担当 佐々木、田辺、金村)

2) トポテカン添加によりシスプラチンによる Akt および ERK のリン酸化が抑制されるかどうかを検討する。(担当 佐々木、大道)

3) トポテカン添加によりそれぞれの細胞においてシスプラチンによる耐性が解除され、感受性を取り戻すかどうかを MTS を用いた Cell viability assay にて検討する。

##### ② トポテカンの Akt/ERK-HIF-1 $\alpha$ -VEGF 経路への影響

1) Caov-3, RMG-1, Skov-3, および A2780 にシスプラチンを添加し、腫瘍より VEGF 産生が上昇するかどうかを real time PCR 法により mRNA 量を、Western blotting 法により蛋白質量を、ELISA 法により培地中に分泌された VEGF 蛋白質量を定量する。

2) トポテカン添加によりシスプラチンによる VEGF 産生増加が抑制されるかどうかを検討する。

3) シスプラチンによる VEGF 発現増加が Akt/ERK-HIF-1 $\alpha$  を介しているかどうかは、HIF-1  $\alpha$  の siRNA の遺伝子導入、Akt, ERK, mTOR の抑制剤を添加することにより検討する。

4) HIF-1  $\alpha$  の VEGF 転写活性への影響を見るために、VEGF のプロモーターを有する luciferase reporter 遺伝子を導入し、

luciferase assay にて検討する。

##### ③ *In vivo*におけるトポテカンの薬剤感受性に対する効果の検討

1) 5~7 週令のメスヌードマウスの腹腔内に Caov-3, RMG-1, Skov-3 細胞を注入しマウス卵巣癌モデルを作成する (Mabuchi S, Ohmichi M et al. J. Biol. Chem. 2004 279: 23477, Mabuchi S, Ohmichi M et al. Clin. Cancer Res. 2004 10: 7645)。(担当 佐々木、金村)

2) 投与 2 週間して腫瘍が形成された後に、①vehicle (PBS) ②トポテカン (2 mg/kg) ③シスプラチン (5 mg/kg) ④シスプラチン (5 mg/kg) + トポテカン (2 mg/kg) を週 1 回 4 週間腹腔内投与する。その間、腹囲と体重を週 2 回測定する。その後炭酸ガスにて安楽死させ開腹し、腹水量および腫瘍の大きさを計測する。腫瘍は 4% paraformaldehyde で固定し、パラフィン切片を作成し、TUNEL 法にてアポトーシスを定量化する。血清中の VEGF 濃度は ELISA 法にて定量する。またトポテカンにより Akt および ERK のリン酸化が抑制されていることを、Akt および ERK のリン酸化特異的抗体を用いた免疫組織染色にて確認する。また、トポテカンにより血管新生が抑制されていることを、血管内皮細胞に特異的な CD34 抗体を用いた免疫組織染色にて確認する

3) それぞれのマウス卵巣癌モデルのシスプラチンに対する感受性を、腫瘍の大きさ、腹水量、アポトーシス細胞の割合にて評価・確認する。

##### ①プロモーターマイクロアレイの作成

1) 1~1.5 kb 上流に HIF-1 $\alpha$ , AP-1 蛋白および NF $\kappa$ B の結合部位を含むプロモーターを有する遺伝子をコンピューターリサーチする。(担当 佐々木、大道)

2) その中で、アポトーシス関連遺伝子などの腫瘍関連の遺伝子のプロモーター領域を PCR 法にて増幅、精製した後、ハイブリスライド上にアレイプリンティングし、プロモーターマイクロチップを作成する (Hayakawa J, Mittal S, Wang Y, Korkmaz KS, Adamson E, English C, Ohmichi M et al. Molecular Cell 2004 16, 521)。

##### ② CHIP およびプロモーターマイクロアレイによるシスプラチン耐性化遺伝子解析

###### 1) シスプラチン耐性ヒト卵巣癌細胞株

Caov-3, RMG-1, Skov-3 細胞にシスプラチンを添加し、HIF-1 $\alpha$  や AP-1 を認識する抗体、および NF $\kappa$ B は (inhibitor of NF $\kappa$ B (I $\kappa$ B) がリン酸化されると核内に移行し転写活性が亢進するので) I $\kappa$ B のリン酸化特異的抗体を用い chromatin immuno-precipitation (CHIP) を施行することによって、細胞内で活性化された HIF-1 $\alpha$ , AP-1 および NF $\kappa$ B が結合している DNA-protein complex

(cross-linked DNA)を選択的に抽出する。その後、cross-linkingを解除し、活性化状態の転写因子が結合しているDNA (active DNA)のみを精製・抽出する。そのDNAを蛍光色素 (Cye-dye) にてラベルし、プロモーターマイクロチップ上でハイブリダイゼーションする。尚、positive controlとしてCHIPを施行しないDNAゲノムを、negative controlとしてnon-immune rabbit IgGでCHIPを施行したDNAを使う。

2) Quality controlされた(positive controlが蛍光を発し、negative controlが蛍光を発しない) 遺伝子のなかで、シスプラチン投与群と無投与群をそれぞれ異なった色素

(Dye-3とDye-5)でラベルし、比較実験を行い、HIF-1 $\alpha$ 、AP-1およびリン酸化I $\kappa$ Bに結合し、シスプラチンにより活性化されるシスプラチン耐性化標的遺伝子を解析する。

### ③ 解析されたシスプラチン耐性化遺伝子の *in vitro*での確認

1) 解析された遺伝子の発現がシスプラチンにて誘導され、トポテカンにより抑制されるか否かを、腫瘍細胞株からRNAまたは蛋白を抽出し、mRNAレベルはQuantitative PCR、蛋白発現はWestern Blotting法にて確認する。

2) さらに、シスプラチン耐性化遺伝子に対するsiRNAをデザイン作成し、Lipofectamin法を用いてシスプラチン耐性卵巣癌Caov-3、RMG-1、Skov-3細胞に遺伝子導入し、シスプラチンに対する耐性が解除され、感受性を獲得するか否かをMTS assayにて検討する。

### ④ 解析されたシスプラチン耐性化遺伝子の *in vivo*での確認

1) 卵巣癌モデルマウスにおいても、シスプラチン耐性化遺伝子を強発現するとシスプラチン耐性となり、トポテカン投与によりシスプラチン感受性となるか否かを、シスプラチン耐性化遺伝子をpAd/CMV/V5-DESTにクローニングし、アデノウイルス発現ベクターを作成する。

2) 5~7週齢のメスヌードマウスの腹腔内にシスプラチン感受性A2780をそれぞれ5X10<sup>6</sup>個移植し、腹腔内播種モデルを作成する

(Mabuchi S, Tanabe (Kimura) A, Ohmichi M et al. J. Biol. Chem. 2004 279: 23477)。移植後2週間して腫瘍が形成された後に①vehicle(PBS)、②シスプラチン(5mg/kg)、③シスプラチン+シスプラチン耐性化遺伝子アデノウイルスベクター、④シスプラチン+emptyウイルスベクターを週1回4週間腹腔内投与する。その間、腹囲と体重を週2回測定する。その後、炭酸ガスで安楽死させ開腹し、腹水量および腫瘍の大きさ、転移病巣の総重量を測定する。腫瘍は4%

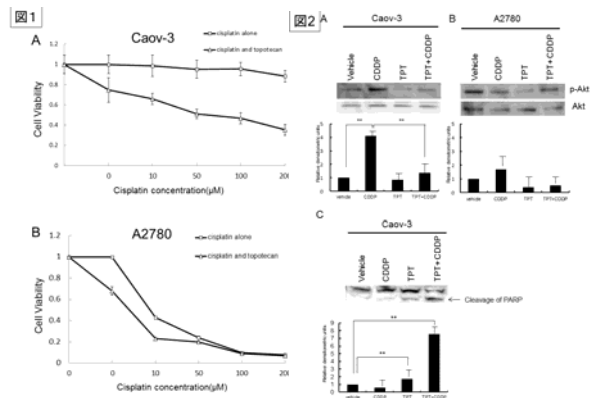
paraformaldehydeで固定し、パラフィン切片を作成し、TUNEL法にてアポトーシスを定量

化する。血清中のVEGF濃度はELISA法にて定量する。またAktおよびERKのリン酸化が抑制されていることを、AktおよびERKのリン酸化特異的抗体を用いた免疫組織染色にて確認する。また、浸潤転移能を検討するために、血管新生の程度を、血管内皮細胞に特異的なCD34抗体を用いた免疫組織染色にて確認する。

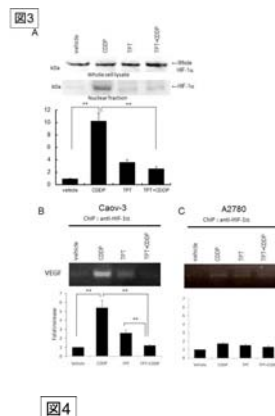
## 4. 研究成果

### トポテカンのAkt/ERK両経路への影響および *In vivo*におけるトポテカンの薬剤感受性に対する効果の検討

シスプラチン耐性ヒト卵巣癌細胞株(Caov-3)にシスプラチンにトポテカンを同時投与すると耐性が解除された。そのメカニズムとしてシスプラチンによるAktのリン酸化がトポテカンによりリン酸化が抑制されることを発見した(図1、2)。



さらに耐性卵巣癌細胞にシスプラチンを添加するとHIF-1 $\alpha$ が核内に移行しVEGFのプロモーターに結合しVEGF発現が増加した。トポテカン添加によりVEGFが減少することより耐性卵巣癌におけるシスプラチンおよびトポテカンの血管新生のメカニズムの一つを解明した。(図3、4)。



トポテカンによりシスプラチンの感受性が再獲得されることが *in vivo* においても確認できた(図5、6)。以上よりトポテカ

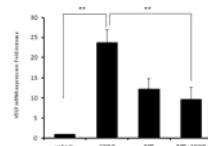


図5

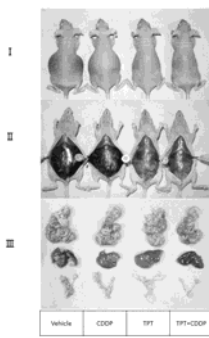
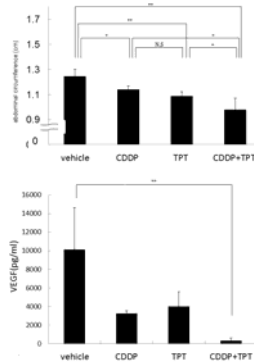


図6



ンによる薬剤感受性の再獲得のメカニズムを総合的に解明した。上記の内容を論文に報告した (Cancer Biol Ther. 2010 Dec 1;10(11):1137-46.)。

#### 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 6 件)

1. Tanaka Y, Sasaki H, Ohmichi M. Prognostic effect of epidermal growth factor receptor gene mutations and the aberrant phosphorylation of Akt and ERK in ovarian cancer. Cancer Biol Ther. 2011 Jan 1;11(1):50-7.

2. Tsunetoh S, Sasaki H, Ohmichi M. Topotecan as a molecular targeting agent which blocks the Akt and VEGF cascade in platinum-resistant ovarian cancers.

Cancer Biol Ther. 2010 Dec 1;10(11):1137-46 (すべて査読あり)

[学会発表] (計 12 件)

1. 恒遠啓示、佐々木浩 「topoisomerase I inhibitor である topotecan は in vivo において CDDP 耐性を解除するか？」：第 60 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 平成 20 年 4 月 12 日～15 日

2. 佐々木浩 「Topoisomerase I inhibitor である topotecan の CDDP 耐性解除機構」第 60 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 平成 21 年 4 月 12 日 (土)～15 日 (火)

3. 佐々木浩 「子宮内膜癌に対する medroxyprogesterone acetate (MPA) の作用機序」第 61 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 平成 22 年 4 月 3 日～5 日

田中良道、佐々木浩、大道正英 「卵巣癌にお

ける EGFR 遺伝子変異とその下流シグナル分子の発現解析」

4. 佐々木浩 「卵巣癌における抗癌剤感受性に基づいた新規 molecular marker としての NF $\kappa$ B の意義」第 62 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 平成 22 年 4 月 23 日～25 日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐々木 浩 (Sasaki Hiroshi)  
大阪医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80432491