

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19566

研究課題名（和文）卵巣癌における核酸代謝メカニズムの探求と、新規治療基軸への応用

研究課題名（英文）Investigation of the mechanism of nucleic acid metabolism to establish a new therapeutic strategy.

研究代表者

北村 幸子 (Kitamura, Sachiko)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10846140

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：研究室で所有するqPCR測定機器を使い、実績のある研究室と協力してdNTPの検量線を作成を試みた。再現性に問題があり予定より時間を要したが、最終的に半定量的に評価できるようになった。5-FU使用でOVCAR5, OVCAR3細胞株のdTTP濃度が低下したことは確認できた。臨床サンプルの測定は難しいが、in vitroでの条件変化を把握するには有効で、dNTP測定を続ける予定。代謝の世界の探索としては、脂肪酸変化による細胞増殖抑制効果を見出し、学会発表や論文発表に繋げた。qPCRを用いた研究の基礎を築き、今後は核酸代謝が婦人科悪性腫瘍に及ぼす影響を探索し、新たな治療法提案を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

dNTPの代謝動体の変化を詳細に探索する当初の研究目標は、期限内に達成することができなかったが、測定方法の基礎を築くことはできた。今後は、核酸代謝（dNTP）の動態評価を加えることが可能になったので、より深く代謝が受ける影響を探索できると考えている。また、核酸ではなく脂肪という側面ではあるが、Oncogenic pathwayに直接影響を及ぼす薬剤を使わずとも、周囲からの代謝への影響で、がん細胞の増殖を抑制できうることも本研究の派生で示すことができた。今後も引き続き、核酸代謝が特に婦人科悪性腫瘍に及ぼす影響を探索し、新たな切り口からの治療法提案につなげたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：We used our lab's qPCR equipment and collaborated with an experienced laboratory to attempt creating a calibration curve for dNTP. Although there were issues with reproducibility and it took longer than expected, we eventually managed to evaluate it semi-quantitatively. It was confirmed that the dTTP concentration in OVCAR5 and OVCAR3 cell lines decreased with the use of 5-FU. Measuring clinical samples is challenging, but this method is effective for understanding condition changes in vitro, and we plan to continue measuring dNTP. In exploring the world of metabolism, we discovered that changes in fatty acids inhibit cell growth, leading to conference presentations and paper publications. Having established the foundation for research using qPCR, we aim to further explore the impact of nucleic acid metabolism on gynecological malignancies and propose new therapeutic approaches.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：卵巣癌 核酸 dNTP

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は腹膜播種を伴う進行した状態になって判明することが多い。そのため手術と薬物療法を組み合わせた集学的治療が必須であり、特に薬物加療の果たす役割は大きい。しかし、当初はシスプラチン製剤に対する感受性が高いものの、再発を繰り返すにつれて薬剤耐性を容易に獲得することが特徴である。近年登場した PARP 阻害剤も抜本的な解決策とはならず、引き続き、新規治療基軸が求められていた。

卵巣癌の遺伝子学的特徴として、TP53 変異の頻度が高いこと、それによりコピー数変化を伴うことが非常に多いことが挙げられる。そのため、単一の Oncogenic pathway に依存していることはなく、いわゆる小分子化合物による効果は限定的なことが、肺がんや乳がんなど Common な悪性腫瘍と卵巣がんの大きな違いであり、課題である。そのため pathway に依存しない治療基軸が求められていて、その中で注目されている切り口が、代謝に関連した治療戦略である。細胞は生きていくために脂質代謝、糖代謝など様々な代謝経路を制御する必要があるが、その一種として核酸代謝が存在する。核酸は細胞にとって必須な RNA, DNA の原料であるため、その代謝メカニズムは癌細胞の生存にとって非常に重要であり、増殖能力が基本的に高いとされるがん細胞では、特に重要な代謝経路である。抗がん剤の中にも核酸代謝経路を標的としたものは存在していて、卵巣癌に承認されているものも存在する(ジェムシタピン: GEM)。しかし単剤での効果は、期待するほど高くないのが背景として知られていた。その理由として、さまざまな核酸代謝経路の全てを阻害できるわけではないため、他の経路から容易にサルベージされて医ししまう可能性が懸念されていた。また、核酸代謝が特に鍵となる集団を判別するバイオマーカーが存在しないことも、臨床上の課題であった。

2. 研究の目的

第一の目的は、「がん細胞(特に婦人科悪性腫瘍)におけるダイナミックな核酸代謝の動態を、まず詳細に把握すること」とした。加えて、どのような経路を阻害すると、最も細胞に対する効果が得られるかも検討に加えた。そして、例えば低酸素環境、あるいはシスプラチン暴露下、など様々な環境に置いた上で、核酸代謝経路がどのように変化するか探索することも目的に加えた。

加えて、そもそも、「がん患者は、特殊な代謝環境にあるのかどうか」をきちんと示すことも重要である。そこで第二の大きな目的として、臨床サンプルや患者情報から、がん患者で生じた代謝面やがんの性質を反映した特異的な変化につき、探索を行なった。

3. 研究の方法

元来、核酸は LC-MS を用いて測定する必要があるが、測定に高額な費用を要し、簡便に測定できるものではない。そこで我々は、qPCR の手法を応用した測定方法の導入を試みた。

既報に習ってプローベを設計・購入し、細胞内の核酸測定をおこなった。核酸には様々な種類があるが、我々の中でも、直接 RNA, DNA の材料となるデオキシ拡散 (dNTP) の測定を試みた。

ついて、核酸合成阻害を標的とした抗がん剤 (5-FU やジェムシタピン) を投与した際に、dNTP の濃度がどのように変化するか検証することとした。核酸合成はまた、大きく二つの経路 (de novo 経路、salvage 経路) により合成される。特に前者については、Brequinar や Leflunomide など臨床応用されている核酸合成阻害剤があるため、これを投与した際にがん細胞における核酸代謝動態の変化を探索した。そして salvage 経路については TEAD4 をカスケードの頂点とする制御機構があるため、TEAD4 を阻害した際にどの程度変化するか探索した。

第2の目的については、当科が所有する臨床サンプルや臨床データをふんだんに用いて、後方視的検討を行なった。特に核酸経路阻害剤が使用される卵巣明細胞癌、それが属する内膜症関連の卵巣がんに着目して解析した。

4. 研究成果

まず当研究室が所有している qPCR 測定機器を用いて、すでに経験のあるハンガリーの研究室と密に連携しながら導入を進めた。dNTP (dUTP, dCTP, dTTP, dATP) を異なる濃度で含んだ溶液を作成して検量線を描いたところ、それなりの精度で検量線を描くことができた (AUC=0.80 程度)。ただ再現性を得るステップで、想定以上の問題に直面した。

共通機器室に存在する qPCR 機器の使用でも、根本的な改善には至らなかったことから、やむなく、ハンガリーの研究室が使用しているものと同様の qPCR 測定機器を購入した。その結果、完全に定量化するには至らないものの、ある条件に暴露した際に核酸の量が増加したか、減ったかを、半定量的に評価できる程度には、改善することができた。これにより、有名な葉酸経路阻害剤である 5-FU を使用すると、OVCAR5, OVCAR3 細胞株にて、dTTP のみ濃度が低下することが確認

でき、この計測法の信頼性が確認できた。

またこの経験を通じて、さまざまな不純物が含まれる臨床サンプルを用いた核酸量を、本手法で測定は難しいことも明らかとなった。それでも、in vitro の特殊な環境ではあるが、様々な条件を変化させた際の前後変化を把握するにおいては、都度 LC-MS を提出するのではなく、本方法（qPCR を用いた方法）でスクリーニングのように dNTP の動態変化を探索することができる、とわかった。当初の予定よりは時間を要したが、今後、in vitro の系で、dNTP の測定を様々な条件で行い、変化が大きい条件（抗がん剤の前後、低酸素の前後など）を探索したい。

他方、細胞内のシグナル経路を変えずとも、周囲の環境が変えて核酸も含めた様々な代謝経路が変化することで、がん細胞の増殖抑制効果が出るかもしれない、という着想がそもそも正しいのか、臨床面での検討も同時に行なった。まず、特定の脂肪酸を変化させるだけで、卵巣がん細胞については明らかな細胞増殖抑制効果をもたらすことを見出し、複数の学会発表と、論文発表につなげた。また実臨床において、核酸合成経路が標的に含まれる抗がん剤：ジェムシタピンは特に卵巣明細胞癌に対して使われることが多い。卵巣明細胞癌は、異所性子宮内膜を由来とする悪性疾患であるが、異所性子宮内膜は明細胞癌以外の悪性腫瘍の発癌母地であることも知られて、具体的には、類内膜がん、漿液粘液性境界悪性腫瘍という組織型も内膜症に由来する。ただこれらは明細胞癌とは違い、ジェムシタピンが頻用されるとは言い難い。同じ母地にも関わらず異なる性質を有することが、症状の面でも明らかとなるか探索した。その結果、類内膜がんでは炎症を背景とした症状が多い一方、明細胞癌では嚢胞の大きさに起因する症状が多いことがわかった。これについては学会発表並びに論文報告をおこなっている。明細胞癌はより、細胞の増殖という側面が強いと推測され、それがために核酸を多く要し、核酸合成阻害剤が比較的奏功しているのかもしれない。

さらに、日常臨床診療の中にこそ病態解明のヒントがあると考え、日常診療で経験した、異所性子宮内膜症が絡んだ稀有な悪性疾患について一例ずつ検討し、学会発表をおこなった。内膜症は非常に多彩な発癌経路を示しており、臨床的には腹膜癌のように発癌する症例や、時間的空間的に異なるタイミングで、同様の腫瘍が発生する場合もあり、いずれも我々の常識をこえる事象があることがわかった。これらと代謝能に相関がある可能性はもちろんあるため、本研究で確立した核酸測定手法を用いて、深く探索していきたいと考えている。

以上、qPCR 機器をふんだんに用いて、dNTP の代謝動体の変化を詳細に探索する当初の研究目標は、期限内に達成することができなかったが、測定方法の基礎を築くことはできた。これからの我々の検討により、核酸代謝（dNTP）の動態評価を加えることが可能になったので、より深く代謝が受ける影響を探索することができると考えている。また、核酸ではなく脂肪という側面ではあるが、普通に生体内にありうる産物でも（Oncogenic pathway に直接影響を及ぼす薬剤を使わずとも）、周囲からの代謝への影響で、がん細胞の増殖を抑制できうることも本研究から派生した検討で示すことができた。今後も引き続き、核酸代謝が特に婦人科悪性腫瘍に及ぼす影響を探索し、新たな切り口からの治療法提案につなげたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 YAMAOKA YUSUKE, TAMURA SAYA, YAMANOI KOJI, TAKI MANA, MURAKAMI RYUSUKE, YAMAGUCHI KEN, HAMANISHI JUNZO, MANDAI MASAKI	4. 巻 44
2. 論文標題 Clinical Significance of Serum SCC Levels Before Treatment for Locally Advanced Cervical Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2009 ~ 2019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.17004	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 Ono Maaya, Fukuda Mayu, Yamanoi Koji, Sunada Masumi, Kitamura Sachiko, Taki Mana, Horie Akihito, Yamaguchi Ken, Hamanishi Junzo, Mandai Masaki	4. 巻 21
2. 論文標題 Clinical significance of initial symptoms in endometriosis-associated ovarian cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Turkish Society of Obstetric and Gynecology	6. 最初と最後の頁 28 ~ 36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4274/tjod.galenos.2024.59019	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tomo Yamagata, Koji Yamanoi, Koichi Watanabe, Jumpei Ogura, Mana Taki, Ryusuke Murakami, Ken Yamaguchi, Junzo Hamanishi and Masaki Mandai.
2. 発表標題 A case of HRD-positive HGSC derived from ectopic endometrium glands in the peritoneum.
3. 学会等名 the 8th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長浜 美瑛, 渡部 光一, 山ノ井 康二, 北村 幸子, 滝 真奈, 村上 隆介, 山口 建, 濱西 潤三, 田中 洋子, 宮野 悟, 垣内 伸之, 小川 誠司, 万代 昌紀
2. 発表標題 子宮内膜症関連腹膜癌に対して全エクソン解析を行い、子宮体癌の腹膜播種が疑われた2例
3. 学会等名 第44回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山ノ井康二	4. 発行年 2021年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 6
3. 書名 産婦人科の実際	

〔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	三瀬 名丹 (Mise Natan) (00360644)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	
研究分担者	山ノ井 康二 (Yamanoi Koji) (70868075)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	滝 真奈 (Mana Taki) (20898077)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	

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
---------	---------