

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591865

研究課題名（和文） 細胞アレイによる卵巣癌抗癌剤効果予測システムの構築と分子標的薬の探索

研究課題名（英文） Establishment of gene scoring model to predict the effect of anticancer drug in ovarian cancer and the screening of the new molecular target

研究代表者

津田 浩史 (TSUDA HIROSHI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00423880

研究成果の概要（和文）：

本研究では、上皮性卵巣癌の標準化学療法である TC 療法 (CBDCA+PTX) の効果を予測できる遺伝子を決定した。上皮性卵巣癌で初回手術時に評価可能病変を認めた症例で、TC 療法の効果を予測できる遺伝子をスクリーニングし、そのスクリーニングした遺伝子のうち 155 遺伝子により siRNA の設計をしトランスフェクションプレートを作成した。トランスフェクションプレート上で、TU-OS-4 細胞を 10000 個を播種し、CDDP、PTX 濃度を各 13 μ M、45nM で 48 時間暴露して Cell Counting Kit-8 にて IC50 を算出した。そして TC 療法細胞死阻害遺伝子および TC 療法細胞死誘導遺伝子を選別した。さらにトランスフェクションプレートを構成した 155 個の遺伝子により、カスタムアレイ（発現解析）を作成した。上皮性卵巣癌で初回手術時に評価可能病変を認めた TC 療法を施行し CR であった症例 6 例 NC/PD であった症例 7 例を新たに集積し、作成したカスタムアレイを施行し、各遺伝子の効果を予測できる精度を算出した。TC 療法細胞死阻害遺伝子および TC 療法細胞死誘導遺伝子を選別した。TC 療法で CR か NC/PD を判別できる精度を、各遺伝子毎に ROC 曲線を作成して検証したところ 15 遺伝子で ROC 曲線の AUC>0.7 となった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we determined the genes to predict the effect of TC regimen (CBDCA+PTX) in epithelial ovarian cancer. At first, we screened 155 genes to predict the effect of TC regimen for 25 ovarian cancer patients with measurable disease, and made the transcription plate composed of 155 siRNA. We performed the transfection array analysis using TU-OS-4 ovarian cancer cell line, and calculated the IC50 to CBDCA and PTX using Cell Counting Kit-8 and determined the genes related with the sensitivity to TC regimen. Furthermore, we performed the expression profile for 13 ovarian cancer cases

using the custom array composed 100 genes. The area under the curve (AUC) of receiver operating characteristics of 15 gene used to predict the effect of TC regimen was 0.7

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：婦人科腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

上皮性卵巣癌は増加傾向にあるが早期発見が難しく、半数以上が III/IV 期で診断され予後不良である。carboplatin+paclitaxel(TC)療法の導入により予後は改善されたが、III/IV期の予後は38%、25%と十分とは言えない。標準治療である TC 療法の効果を規定する分子ターゲットを発見する事で、予後の予測が可能になるばかりでなく新しい治療ターゲットの発見にもつながる。

近年、マイクロアレイ技術の進歩により癌の薬物治療効果を規定する候補遺伝子の選定が可能になり、様々な癌種で実用化が試みられている。しかし実際に臨床応用にまでいたったのは乳癌に対するマンマプリントおよびオンコタイプ DX だけである。卵巣癌においても、いくつかのモデルが提唱されたが、各モデル間で重複する遺伝子が異なり、再現性にも問題があり、実用化にはいたっていない (Spentzos D, 2004, 2005; Birrer MJ, 2007)。その一因として従来の統計学的解析

に依存した（遺伝子機能を考慮しない）手法では、真のターゲットを同定することが難しいことがあげられる。

2. 研究の目的

トランスフェクションアレイを用いて、上皮性卵巣癌の標準化学療法である TC 療法の効果を予測できる真のターゲット遺伝子を発見しキットの作成に取り組むとともに、新しい分子標的としての可能性につき検討する。

3. 研究の方法

- (1) 上皮性卵巣癌で初回手術時に評価可能病変を認めた症例のうち、TC療法の効果を予測できる遺伝子をスクリーニングしていたので、そのスクリーニングした遺伝子のうち、155 遺伝子により siRNA の設計をし、トランスフェクションプレートを作成した。

- (2) 卵巣癌細胞株 TU-OS-3, TU-OS-4, KF, KF Tx, KFrTx, SKOV3 細胞を細胞アレイの候補細胞として検証した。すなわち 96 穴プレートの 1000-10000 個の細胞を培養し、CDDP および PTX をそれぞれ 0-100uM、0-50nM の濃度で 24-72 時間暴露し、Cell Counting Kit-8 にて IC50 を算出した。
- (3) 2 の結果より、TU-OS-4 細胞は両薬剤に耐性であることが判明したので本細胞株をトランスフェクションプレートの実験に使用することとした。そして作成したトランスフェクションプレートでのトランスフェクション条件を検証した。
- (4) 1 で作成したトランスフェクションプレート上で、3 の条件で各 well に TU-OS-4 細胞 10000 個を播種し、CDDP、PTX 濃度を各 13uM、45nM で 48 時間暴露して Cell Counting Kit-8 にて IC50 を算出した。そして抗癌剤添加による細胞死をコントロールに対して 20%以上誘導できた遺伝子を TC 療法細胞死阻害遺伝子、細胞生存率をコントロールに対し 150%以上亢進した遺伝子を TC 療法細胞死誘導遺伝子とする。
- (5) トランスフェクションプレートを構成した 155 個の遺伝子により、カスタムアレイ（発現解析）を作成した。上皮性卵巣癌で初回手術時に評価可能病変を認めた TC 療法を施行し CR であった症例 6 例 NC/PD であった症例 7 例を新たに集積し、

作成したカスタムアレイを施行し、各遺伝子の効果を予測できる精度を算出した。

4. 研究成果

- (1) TU-OS-4 細胞の CDDP、PTX、CDDP+PTX の IC50 はそれぞれで 13uM、45nM、PTX/CDDP-IC50: 85%であった。
- (2) トランスフェクションにより TC 療法細胞死阻害遺伝子および TC 療法細胞死誘導遺伝子、を選別した。
- (3) TC 療法で CR か NC/PD を判別できる精度を、各遺伝子毎に ROC 曲線を作成して検証したところ 15 遺伝子で ROC 曲線の AUC >0.7 となった。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 浩史 (TSUDA HIROSHI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00423880

(2) 研究分担者

三木 義男 (MIKI YOSHIO)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：10281594

(3) 連携研究者

なし