

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592443

研究課題名(和文) 卵巣癌におけるHIFによる癌幹細胞誘導機構の解明と治療戦略への応用

研究課題名(英文) Hypoxic cytotoxin TX-402 might inhibit the expansion of cancer stem cells in ovarian cancer.

研究代表者

森重 健一郎 (MORISHIGE, Ken-ichirou)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90283788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：癌組織内の低酸素環境には治療抵抗性の癌幹細胞が維持されている可能性がある。我々は卵巣癌細胞で低酸素環境下にHIF蛋白発現に伴って幹細胞因子・癌幹細胞マーカーが発現亢進していることを見出した。また卵巣癌の場合はHIF2を介していることが示唆された。更にHIF阻害薬TX-402によってHIF2の発現と癌幹細胞が抑制されることを見出した。次いで卵巣癌細胞株によるスフェロイド(三次元低酸素モデル)を用いて、低酸素領域に幹細胞因子高発現細胞の出現を確認した。TX-402処理によりこの癌幹細胞が死滅した。よってHIF阻害薬は腫瘍組織内部の癌幹細胞を死滅させ、治療感受性を向上させる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In the solid tumor, the region away from the vasculatures are hypoxic and recent studies have revealed that hypoxia inducible factor (HIF) increases the fraction of cancer stem cells (CSCs). TX-402, developed as a hypoxic cytotoxin, inhibited the expression of HIF. We supposed that TX-402 might be a possible candidate as a molecular-targeted drug for ovarian cancer by inhibiting CSC expansion. Hypoxia induced the expression of HIF, stem cell factors, and putative CSC markers. Furthermore, TX-402 inhibited these stem cell factors and CSC markers, dose-dependently. Next, we constructed the spheroids of ovarian cancer cell line, as a 3D hypoxia model, in which the internal hypoxic region contained CSCs. These hypoxic regions containing CSCs was disappeared by the treatment with TX-402. In conclusion, hypoxia might promote the expansion of CSCs, and TX-402 could be useful for ovarian cancer by inhibiting the hypoxia-induced CSC expansion.

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 癌幹細胞 低酸素 HIF がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

癌細胞が Hypoxia-inducible factor (HIF) という転写因子を活性化し低酸素環境への適応を図ることが明らかになってきた。そして VEGF をはじめとする遺伝子群の発現を誘導して血管新生をおこし、酸素環境の改善を図る。また低酸素環境下での効率よい ATP の生成、低酸素からの癌細胞の回避 (転移・浸潤) などの重要な生物作用が HIF の制御遺伝子に依存していることが分かってきた。癌組織内の低酸素領域の癌細胞はこのように転移能が亢進し化学療法・放射線療法に抵抗性を示すことが知られている。これらの低酸素環境下の癌細胞は脱分化しており、その性質は現在注目されている癌幹細胞とかなり類似するという知見が蓄積されつつある。癌幹細胞は幹細胞に類似した特徴 (自己複製能・分化能:stemness) を持ち、造腫瘍性および転移能が高く、抗がん剤抵抗性を示す。腫瘍内の低酸素環境が“癌幹細胞 like な細胞”のニッチになっていることは十分考えられる。

2. 研究の目的

卵巣癌における抗がん剤抵抗性のメカニズムとして、HIF による癌幹細胞 (あるいは“癌幹細胞 like な細胞”) の誘導が関与しているかどうかを検討し、もし関与があるなら HIF 阻害剤を用いて抗がん剤感受性改善を図ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 卵巣癌の手術検体から Tissue Micro Array を作成

手術時に採取され、保存された卵巣癌標本を用いて Tissue Micro Array を作成する。それぞれの検体についてはその患者の臨床情報が患者のインフォームドコンセントのもとにデータとして蓄積されている。

(2) HIF-1、HIF-2 の発現と抗がん剤感受性・予後との関連について検討

(1) で準備した Tissue Micro Array を用

いて抗 HIF-1、HIF-2 抗体で免疫染色を行う。タンパク発現については、染色強度、細胞比率を histoscore で判定する。

の結果とそれぞれの患者の進行期分類、化学療法に対する反応、再発の有無、生命予後について後方視的に検討する。

(3) 卵巣癌幹細胞マーカーの発現および予後との関連について検討

Tissue Micro Array を用いて癌幹細胞マーカー (CD133、CD44 あるいは ALDH1) の抗体でそれぞれの発現を検討する。

また癌幹細胞の全体に占める割合と進行期分類、化学療法に対する反応、再発の有無、生命予後について後方視的に検討する。

(4) 低酸素環境が HIF 発現を介して癌幹細胞を誘導するか

細胞株としては serous type (SKOV3, Caov3), mucinous type (RMUG), clear cell type (RMG1, OVISE, KOC7C) を使用する。

1%酸素条件下で培養し幹細胞マーカーによる FACS で、20%酸素条件下と比較してマーカー陽性細胞数の変化を検討する。HIF 阻害剤 (PX-478, acriflavine, TX402) あるいは siRNA 導入により HIF 活性を抑制してマーカー陽性細胞数の変化を検討する

1%酸素条件下で培養したマーカー陽性細胞で抗がん剤感受性実験を行う (陰性細胞と比較)。主な抗癌剤 (シスプラチン、パクリタキセル、ドキシソルピシン、エトポシド、トポテカン、ドセタキセル) との併用効果を、MTS assay (細胞増殖抑制効果) もしくは Western Blotting 法による PARP の Cleavage (アポトーシス誘導の評価) にて評価する。

~ の実験により低酸素により誘導される“癌幹細胞 like な細胞”が癌幹

細胞かどうかを確認する。

(5) 卵巣癌におけるHIF 阻害剤の抗腫瘍効果を検討

卵巣癌細胞株を用いたスフェロイドを作製し、このスフェロイドの中央部に低酸素領域が形成される(三次元低酸素モデル)。この低酸素領域に出現する“癌幹細胞 like な細胞”に対する HIF 阻害剤の効果を検証する。

5-7 週齢のメスヌードマウスの腹腔内に卵巣明細胞癌細胞株を注入する。投与2週間して腫瘍が形成された後に、Control (PBS)、 HIF 阻害剤を5 週間投与する。HIF 阻害剤は週2 回尾静脈を介した静脈内投与とする。また研究2B において、mTOR 阻害剤が既存の抗癌剤の抗腫瘍効果を増強する事を確認できれば、その併用効果を同じくヌードマウスを用いた in vivo の実験により検討する。

各治療法の抗腫瘍効果は各投与群における 腫瘍の大きさ、 腹水量、 腫瘍の Ki-67抗体による免疫染色(細胞増殖抑制効果)、 腫瘍のTunel 染色及びCleaved Caspase-3 抗体による免疫染色 (アポトーシスの評価)、 腫瘍のCD31 抗体による免疫染色および同標本からのMicro Vessel Density の算出(血管新生抑制効果)により多角的に評価し、各治療法間でその効果を比較検討し、HIF 阻害剤単独、もしくは抗癌剤との併用効果を評価する。

4 . 研究成果

- (1) 卵巣癌の手術検体から Tissue Micro Array を作成した。
- (2) HIF1 の発現をヒストスコアで評価して、生命予後との相関を調べたが統計学的に優位な相関は認めなかった。HIF2 の発現増強は患者の無増悪生存期間を短縮させる傾向があった。

(3) 癌幹細胞マーカー (CD133、CD44 あるいは ALDH1) について、発現を検討した。その結果卵巣癌全体としては、それぞれのマーカー高発現群と低発現群とで予後に差はなかった。ただし明細胞癌に限ってみると ALDH1 高発現群と低発現群で有意に高発現群のほうが予後不良 (無増悪生存期間) であった。

(4) 卵巣癌細胞株において低酸素環境下で HIF 1 、 HIF2 の発現が亢進していることを観察した。また HIF の発現に伴って幹細胞因子(oct3/4, nanog, lin28, sox2)や癌幹細胞マーカー (CD133、CD44) が発現亢進していた。また siRNA によって HIF 1 、 HIF2 それぞれの発現を抑制すると、HIF2 の発現抑制特異的に癌幹細胞因子・マーカーの発現が抑制されていた。つまり卵巣がんにおける低酸素微小環境での癌幹細胞発現誘導は HIF2 を介したものであることが示唆された。さらに低酸素細胞毒 TX-402 によって HIF2 の発現抑制を介して癌幹細胞増殖が抑制されることを見出した。

(5) 卵巣癌細胞株を用いたスフェロイド(三次元低酸素モデル)の中央部は低酸素領域となつて oct3/4 高発現細胞が出現する。TX-402 で処理するとこのスフェロイドは増殖が抑制され中央部の低酸素領域の細胞が死滅している。同時に oct3/4 高発現細胞が消失していた。

次いで卵巣癌移植ヌードマウス実験系では TX-402 の効果を検証できていない。卵巣癌細胞株の移植が安定的に行えるところまで至っていないからである。細胞株によって移植効率に差があり、とくに幹細胞マーカー (ALDH1) と予後との関連が明確な卵巣癌のサブタイプである明細胞腺癌において、細胞株は移植効率が悪く TX402 の効果を検証するところまで至っていない。今後移植効率を改善して、結果を出したい。

このように HIF 阻害剤 TX-402 は腫瘍組織内部の癌幹細胞を含む低酸素領域の癌細胞を

死滅させうることが示唆され、治療感受性を向上させるうる可能性が示された。

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 9 件)

1. Adachi Y, Iso H, Shen J, Ban K, Fukui O, Hashimoto H, Nakashima T, Morishige K, Saijo T. An Impact of the Specialization in gynecology and obstetrics departments on pregnant women's choice for maternity institutions. Health Economics Review、査読有、23 ; 3(1)、2013、31
DOI: 10.1186/2191-1991-3-31.
2. Kato H, Kanematsu M, Ono H, Yano R, Furui T, Morishige KI, Hatano Y: Ovarian fibromas: MR imaging findings with emphasis on intratumoral cyst formation. Eur J Radiol、査読有、82(9)、2013、e417-e421
DOI: 10.1016/j.ejrad.2013.04.010.
3. Ohyagi-Hara C, Sawada K, Kamiura S, Tomita Y, Isobe A, Hashimoto K, Kinose Y, Mabuchi S, Hisamatsu T, Takahashi T, Kumasawa K, Nagata S, Morishige KI, Lengyel E, Kurachi H, Kimura T: miR-92a Inhibits Peritoneal Dissemination of Ovarian Cancer Cells by Inhibiting Integrin 5 Expression. Am J Pathol、査読有、182 (5) 2013、1876-1889
DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.01.039.
4. Kato H, Kanematsu M, Furui T, Morishige KI, Hirose Y: Ovarian mucinous cystadenoma coexisting with benign Brenner tumor: MR imaging findings. Abdom Imaging ,査読有、38(2)、2012、412-416
DOI: 10.1007/s00261-012-9887-1.
5. Shen J, Fukui O, Hashimoto H, Nakashima T, Kimura T, Morishige K, Saijo T: A cost-benefit analysis on the specialization in departments of obstetrics and gynecology in Japan. Health Economics Review, 査読有、2(1)、2012、2
DOI: 10.1186/2191-1991-2-2.
6. Sawada K, Ohyagi-Hara C, Kimura T Morishige K-I: Integrin Inhibitors as a Therapeutic Agent for Ovarian Cancer. J Oncol, 査読有、2012
DOI:10.1155/2012/915140.
7. Kanematsu M, Watanabe H, Kondo H, Goshima S, Kato H, Furui T, Toyoki H, Morishige K: Postpartum hemorrhage in coagulopathic patients: preliminary experience with uterine arterial embolization with N-butyl cyanoacrylate. J Vasc Interv Radiol, 査読有、22(12)、2011、1773-1776
DOI: 10.1016/j.jvir.2011.08.016.
8. Egawa-Takata T, Ueda Y, Kuragaki C, Miyake T, Miyatake T, Fujita M, Yoshino K, Nakashima R, Okazawa M, Tsutsui T, Morishige KI, Kimura T, Yamasaki M, Nishizaki T, Nagamatsu M, Ito K, Asada M, Ogita K, Wakimoto A, Yamamoto T, Nishio Y, Enomoto T: Chemotherapy for endometrial carcinoma (GOGO-EM1 study): TEC (paclitaxel, epirubicin, and carboplatin) is an effective remission-induction and adjuvant therapy. Cancer Chemother Pharmacol, 査読有、68(6)、2011、1603-1610
DOI:10.1007/s00280-011-1638-4.
9. Mabuchi S, Okazawa M, Isohashi F, Ohta Y, Maruoka S, Yoshioka Y, Enomoto T, Morishige K, Kamiura S, Kimura T:

Postoperative whole pelvic radiotherapy plus concurrent chemotherapy versus extended-field irradiation for early-stage cervical cancer patients with multiple pelvic lymph node metastases. *Gynecol Oncol*, 査読有、120(1)、2011、 94-100
DOI:10.1016/j.ygyno.2010.09.016.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Kawashima E, Sugiyama M, Misao A, Fujimoto J, Morishige K-I: Relationship between therapy for uterine cervical cancer and body composition on premenopausal women. The 5th Scientific Meeting of the Asia Pacific Menopause Federation (Japan, Tokyo) Oct. 18- 20, 2013
2. 水野智子、牧野弘、鈴木紀子、小倉寛則、森重健一郎：卵巣明細胞がんにおける癌幹細胞マーカーALDH1 の関与 .第 50 回日本癌治療学会学術集会 (横浜)H24.10.25-27
3. 鈴木紀子、小倉寛則、永澤秀子、森重健一郎：卵巣癌における HIF-1 阻害剤による cancer stem cell-like cell の増大抑制効果に関する検討 . 第 71 回日本癌学会学術総会(札幌)H24.9.19-21
4. 牧野弘、小倉寛則、森重健一郎：当科における上皮性卵巣癌の再発後長期生存例の検討 . 第 52 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会(東京)H24.7.19-21
5. Ohyagi C, Sawada K, Morishige K-I, Lengyel E, Kimura T: Identification of microRNA which regulates peritoneal dissemination of ovarian cancer. American Association for Cancer Research 102nd Annual Meeting 2011 (Orlando, USA) April 2-6, 2011

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森重 健一郎 (MORISHIGE, Ken-ichirou)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90283788

(2)研究分担者

伊藤 直樹 (ITO, Naoki)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30184675

古井 辰郎(FURUI, Tatsuro)
岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00313883

豊木 廣(TOYOKI, Hiroshi)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40402169

早崎 容(HAYASAKI, You)
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20566492