

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592449

研究課題名(和文) 卵巣癌において異常活性化したリン酸化酵素の同定とその特異的阻害剤の開発

研究課題名(英文) Identification of "oncogenic kinase" in ovarian cancer

研究代表者

須藤 保 (Sudo, Tamotsu)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・医学研究員

研究者番号：50397824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)： 卵巣癌におけるリン酸化酵素PTK6：卵巣癌において高発現しているリン酸化酵素を同定することを目的とし、その結果PTK6を同定した。卵巣癌進行期III-IV期(進行例)においてPTK6発現陽性群において全生存期間に関して予後不良の傾向が見られた。

初代三次元培養法と薬剤感受性評価系の確立：株式会社トランスバレント社と共同で新規初代三次元培養プレートを開発したEpCAM陽性細胞がspheroidを形成し、EdUの取り込み試験から約1週間の培養が可能であることが明らかとなった。また薬剤感受性の評価としてEdUの取り込みならびにCaspase 3/7の細胞染色が有効であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： We clarified that PTK6, protein-tyrosine kinase-6, is over-expressed in ovarian cancers through demethylation of PTK6 gene. Ovarian cancer patients with over expression of PTK6 tend to have poor prognoses.

We developed a novel 3D cell culture system named Cell-able. The spheroids derived from ovarian cancer tissues could be grown on Cell-able. The incorporation of EdU and staining with Caspase 3/7 were useful for evaluating the sensitivity for chemotherapeutic agents and molecular targeting agents.

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 リン酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

細胞内の様々な現象はリン酸化・脱リン酸化によって精密に制御されているが、リン酸化酵素活性の異常亢進により細胞の癌化、悪性化が生ずることが知られている。近年次々と分子標的薬が開発され癌治療において標準治療の一角を占めるようになってきているが、多くの分子標的薬はリン酸化酵素を標的としている。肺癌における EGFR 阻害剤、乳癌における HER2 阻害剤の例からも分かるように、どのリン酸化酵素が異常亢進し発癌に関与しているかを同定することが治療法の開発ならびに適応症例の選択に極めて重要である。

ところで卵巣癌は女性の癌死の原因として第5位に位置づけられている癌である。初期症状が乏しく発見された時にはすでに手術不能の進行癌として発見されることが多く抗がん剤治療が選択されることが多いが、多くの症例で再発再燃を来すため予後不良である。分子標的薬を始め新たな治療法の開発が望まれているが他癌種に比べ遅れているのが現状である。今回我々は「卵巣癌発癌ならびに悪性化に寄与するリン酸化酵素 (Oncogenic Kinase) を同定するために 卵巣癌において過剰発現しているリン酸化酵素の探索(分子の視点から) リン酸化酵素阻害剤の阻害効果からその癌が依存しているリン酸化酵素の同定(薬剤の視点から)を行い、それらを標的とした新規治療方法の開発」を計画するに至った。

2. 研究の目的

上皮性卵巣癌における発癌、悪性化に寄与するリン酸化酵素群 (Oncogenic Kinase) を同定し、それらを標的とした新たな治療方法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 卵巣癌においてタンパク発現亢進 (メチル化解析)、酵素活性亢進 (non-RI-in column) を示すリン酸

化酵素の同定

- (2) (1) で同定したリン酸化酵素のうち、その活性を阻害することで (siRNA、阻害剤) 癌細胞の増殖抑制、細胞死誘導が見られるものの Oncogenic Kinase とする。
- (3) 多数の卵巣癌臨床検体で Oncogenic Kinase の活性と臨床病理学的因子との相関性の解析
- (4) 個々の症例のがん組織におけるリン酸化酵素阻害剤に対する増殖抑制効果を評価するため初代三次元培養法の確立

4. 研究成果

- (1) 網羅的メチル化解析から見出したリン酸化酵素 PTK6 は卵巣癌進行例において予後不良因子である：卵巣癌臨床検体4症例と正常組織4症例から抽出したゲノムを用いメチル化スクリーニングを行った結果、卵巣癌に特異的に脱メチル化しているリン酸化酵素 PTK6 を同定した。卵巣がん細胞 10 株中全例に発現が見られた。また卵巣がん臨床検体 69 例 (粘液性 15 例、漿液性 24 例、明細胞 14 例、類内膜 17 例) のうち 63.8% の症例に発現亢進が観察された。組織型別では明細胞 (28.6%) に比べ、漿液性 (66.7%)、類内膜 (82.7%) で有意に高かった。全症例において PTK6 発現と予後に関して統計的な有意差は見られなかったが、進行症例である病期 III, IV 期で検討を行ったところ、PTK6 陽性例において有意に全生存率について予後不良の傾向があることが分かった ($p=0.07$)。

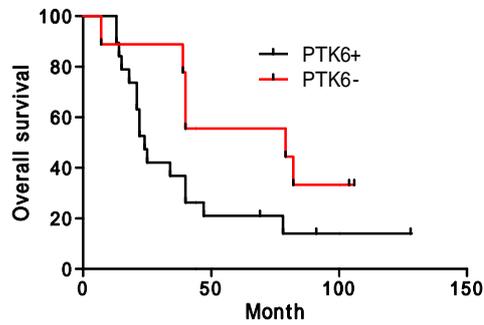


図1：卵巣癌 III-IV 期における PTK6 発現と全生存率(Overall survival)

(2) 初代三次元培養法と薬剤感受性評価系の確立

卵巣がん組織から 新規初代三次元培養法 薬剤感受性評価系の確立を行った。 に関して株式会社トランスパレント社と共同で 新規初代三次元培養プレートを開発した。 本法により上皮マーカーである EpCAM 陽性細胞が spheroid を形成し、EdU の取り込み試験から約 1 週間の培養が可能であることが明らかとなった。 薬剤感受性の評価として、EdU の取り込みならびに Caspase 3/7 の細胞染色が有効であることを明らかにした。

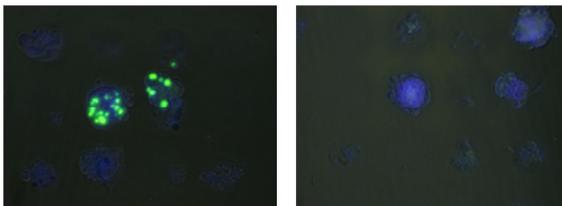


図2：spheroid 形成後の EdU 取り込み(緑)と DNA 染色(青)：増殖を行っている細胞群により spheroid が形成されている(左図)。薬剤添加後増殖が停止し EdU 取り込みは失われている(右図)。

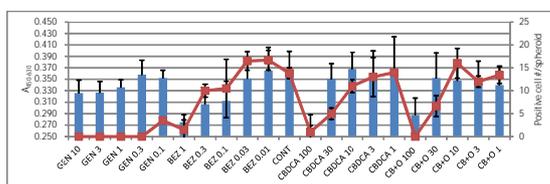


図3：卵巣がん初代三次元培養を用いた各種薬剤(ゲムシタピン GEN、カルボプラチン CBDCA、mTOR 阻害剤 BEZ、PARP 阻害剤 O)に対する増殖抑制効果：GEN (0.1, 0.3, 1, 3 and 10 μ M), BEZ (0.01, 0.03, 0.1, 0.3 and 1 μ M),

CBDCA (1, 3, 10, 30 and 100 μ M) ならびに CBDCA (1, 3, 10, 30 and 100 μ M) (+ OLA (1 μ M)の併用) を添加し 72 時間後の EdU 取り込みで評価を行った。

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 23 件)

Unique roles of estrogen-dependent Pten control in epithelial cell homeostasis of mouse vagina. Miyagawa S, Sato M, Sudo T, Yamada G, Iguchi T. *Oncogene*. 2014 Mar 17. 【査読有】

Alpha-fetoprotein-producing ovarian clear cell adenocarcinoma simulating fetal gut in a postmenopausal woman Akemi Morimoto, Tamotsu Sudo, Toshiko Sakuma, Masanori Yasuda, Kiyoshi Fujiwara *Gynecologic Oncology Reports* 8 2014 24-26. 【査読有】

Boron neutron capture therapy as new treatment for clear cell sarcoma: Trial on different animal model. Andoh T, Fujimoto T, Sudo T, Suzuki M, Sakurai Y, Sakuma T, Moritake H, Sugimoto T, Takeuchi T, Sonobe H, Epstein AL, Fukumori Y, Ono K, Ichikawa H. *Appl Radiat Isot*. 2014 Jun;88:59-63. 【査読有】

Histopathology predicts clinical outcome in advanced epithelial ovarian cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy and debulking surgery. Muraji M, Sudo T, Iwasaki S, Ueno S, Wakahashi S, Yamaguchi S, Fujiwara K, Nishimura R. *Gynecol Oncol*. 2013 Dec;131(3):531-4. 【査読有】

VAV1 represses E-cadherin expression through the transactivation of Snail and Slug: a potential mechanism for aberrant epithelial to mesenchymal transition in human epithelial ovarian cancer. Wakahashi S, Sudo T, Oka N, Ueno S, Yamaguchi S, Fujiwara K, Ohbayashi C, Nishimura R. *Transl Res*. 2013 Sep;162(3):181-90. 【査読有】

Absence of human papillomavirus infection and activation of PI3K-AKT pathway in cervical clear cell carcinoma. Ueno S, Sudo T, Oka N, Wakahashi S, Yamaguchi S, Fujiwara K, Mikami Y, Nishimura R. *Int J Gynecol Cancer*. 2013 Jul;23(6):1084-91. 【査読有】

Boron neutron capture therapy (BNCT) selectively destroys human clear cell sarcoma in mouse model. Fujimoto T,

Andoh T, Sudo T, Fujita I, Moritake H, Sugimoto T, Sakuma T, Akisue T, Kawabata S, Kirihata M, Suzuki M, Sakurai Y, Ono K, Fukumori Y, Kurosaka M, Ichikawa H. *Appl Radiat Isot*. 2013 Mar;73:96-100. 【査読有】

Endometrial stromal sarcoma: clinicopathological and immunophenotypic study of 16 cases. Shin-ichi Iwasaki, Tamotsu Sudo, Maiko Miwa, Masayo Ukita, Akemi Morimoto, Masaru Tamada, Sayaka Ueno, Senn Wakahashi, Satoshi Yamaguchi, Kiyoshi Fujiwara, Yoshiko Sakuma, Yoshiki Mikami, Ryuichiro Nishimura *Arch Gynecol Obstet* 2013 Aug;288(2):385-91. 【査読有】

L1 gene methylation in high-risk human papillomaviruses for the prognosis of cervical intraepithelial neoplasia. Oka N, Kajita M, Nishimura R, Ohbayashi C and Sudo T *Int J Gynecol Cancer*. 2013 Feb;23(2):235-43. 【査読有】

Molecular-targeted therapies for ovarian cancer: prospects for the future. Sudo T. *Int J Clin Oncol*. 2012 Oct;17(5):424-9 (Invited review) 【査読有】

Potential role of LMP2 as an anti-oncogenic factor in human uterine leiomyosarcoma: morphological significance of calponin h1. Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kasai M, Ichimura T, Sudo T, Nishimura R, Ishiko O, Shiozawa T, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Konishi I. *FEBS Lett*. 2012 Jun 21;586(13):1824-31. 【査読有】

High -risk ovarian cancer based on 126-gene expression signature is uniquely characterized by down regulation of antigen presentation pathway. Yoshihara K, Tsunoda T, Shigemizu D, Fujiwara H, Hatae M, Fujiwara H, Masuzaki H, Katabuchi H, Kawakami Y, Okamoto A, Nogawa T, Matsumura N, Udagawa Y, Saito T, Itamochi H, Takano M, Miyagi E, Sudo T, Ushijima K, Iwase H, Seki H, Terao Y, Enomoto T, Mikami M, Akazawa K, Tsuda H, Moriya T, Tajima A, Inoue I, Tanaka K. *Clin Cancer Res*. 2012 Mar 1;18(5):1374-85. 【査読有】

The effect of abdominal radical trachelectomy on ovarian reserve: serial changes in serum anti-müllerian hormone levels. Muraji

M, Sudo T, Iwasaki S, Ueno S, Wakahashi S, Yamaguchi S, Fujiwara K, Nishimura R. *Journal of Cancer*. 2012;3:191-5. 【査読有】

Potential role of LMP2 as tumor-suppressor defines new targets for uterine leiomyosarcoma therapy. Takuma Hayashi, Akiko Horiuchi, Kenji Sano, Nobuyoshi Hiraoka, Mari Kasai, Tomoyuki Ichimura, Tamotsu Sudo, Nobuo Yaegashi, Hiroyuki Aburatani, Tanri Shiozawa, Ikuo Konishi *Scientific Reports* 2011;1:180. 【査読有】

Endometrioid adenocarcinoma with high-grade transformation with serous and choriocarcinomatous differentiation - a case report. Senn Wakahashi, Tamotsu Sudo, Chiho Ohbayashi *Journal of Cancer* 2012;3:14-8. 【査読有】

Type II versus Type III fertility-sparing abdominal radical trachelectomy for early stage cervical cancer: a comparison of feasibility of surgical outcomes. Miho MURAJI, Tamotsu SUDO, Ryuichiro NISHIMURA *Int J Gynecol Cancer*. 2012 Mar;22(3):479-83. 【査読有】

Boron neutron capture therapy for clear cell sarcoma (CCS): Biodistribution study of p-borono-L-phenylalanine in CCS-bearing animal models. Andoh T, Fujimoto T, Sudo T, Fujita I, Imabori M, Moritake H, Sugimoto T, Sakuma Y, Takeuchi T, Kawabata S, Kirihata M, Akisue T, Yayama K, Kurosaka M, Miyatake S, Fukumori Y, Ichikawa H. *Appl Radiat Isot*. 2011 Dec;69(12):1721-4. 【査読有】

Evaluation of BPA uptake in clear cell sarcoma (CCS) in vitro and development of an in vivo model of CCS for BNCT studies. Fujimoto T, Andoh T, Sudo T, Fujita I, Imbabura M, Moritake H, Sugimoto T, Sakuma Y, Takeuchi T, Sonobe H, Epstein AL, Akisue T, Kirihata M, Kurosaka M, Fukumori Y, Ichikawa H. *Appl Radiat Isot*. 2011 Dec;69(12):1713-6. 【査読有】

The direct PAK1 inhibitor, TAT-PAK18, blocks preferentially the growth of human ovarian cancer cell lines in which PAK1 is abnormally activated by autophosphorylation at Thr 423 Hashimoto H, Sudo T, Maruta H, Nishimura R. *Drug Discov Ther*. 4(1):1-4. 2010. 【査読有】

Absence of high-risk human papillomavirus (HPV) detection in endocervical adenocarcinoma with gastric morphology and phenotype. Kusanagi Y, Kojima A, Mikami Y, Kiyokawa T, Sudo T, Yamaguchi S, Nishimura R. Am J Pathol. 2010 Nov;177(5):2169-75. Epub 2010 Sep 9. 【査読有】

- 21 Relationship between ABCF2 expression and response to chemotherapy or prognosis in clear cell adenocarcinoma of the ovary. Tsuda H, Ito K, Yaegashi N, Hirasawa A, Sudo T, Kita T, Terai Y, Kigawa J, Sugiyama T, Aoki D. Int J Gynecol Cancer. 2010 Jul;20(5):794-7. 【査読有】
- 22 Shinichi Miyagawa, Yoshinao Katsu, Yasuhiko Ohta, Tamotsu Sudo, Dennis B. Lubahn and Taisen Iguchi. Estrogen Receptor ESR1 Is Indispensable for the Induction of Persistent Vaginal Change by Neonatal 5alpha-Dihydrotestosterone Exposure in Mice. Biology of Reproduction 2010 Mar;82(3):497-503. 【査読有】

〔学会発表〕(計12件)

若橋宣・中村幸司・岩崎真一・植野さやか・連美穂・山中薫・須藤保・山口聡・藤原潔・西村隆一郎 卵巣癌における VAV1-Rac1-PAK1 シグナル経路の活性化 第63回日本産科婦人科学会学術講演会(平成23年8月30日 大阪)

連美穂・中村幸司・岩崎真一・植野さやか・若橋宣・山中薫・須藤保・山口聡・藤原潔・西村隆一郎 上皮性卵巣癌再発症例における予後不良因子の検討 第63回日本産科婦人科学会学術講演(平成23年8月30日 大阪)

若橋宣・連美穂・須藤保 VAV1は E-cadherin を制御することで上皮性卵巣癌の上皮間葉移行に關与する 第70回日本癌学会学術総会(平成23年10月3日 名古屋)

連美穂・若橋宣・須藤保 術前化学療法を施行した上皮性卵巣癌症例での予後規定因子 第70回日本癌学会学術総会(平成23年10月3日 名古屋)

Muraji M・Wakahashi S・Sudo T Prognostic factors of advanced ovarian cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy 2nd Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology(平成23年11月3日 韓国)

連美穂・植野さやか・岩崎真一・若橋宣・山中薫・須藤保・山口聡・藤原潔・西村隆一郎 漿液性腺癌前駆病変の一つとされる卵管上皮内癌(STIC)は浸潤能の高

い細胞集団である 第64回日本産科婦人科学会学術集会(平成24年4月13日 神戸)

川崎薫・池田智明・西村隆一郎・須藤保 悪性卵巣腫瘍合併妊娠の全国調査第64回日本産科婦人科学会学術集会(平成24年4月13日 神戸)

連美穂・森本明美・植野さやか・岩崎真一・若橋宣・須藤保・山口聡・藤原潔・西村隆一郎 卵巣癌に対する術前化学療法の組織学的効果判定基準は予後規定因子となりえるか 第52回日本婦人科腫瘍学会学術講演会(平成24年7月20日 東京都)

森本明美・岩崎真一・植野さやか・若橋宣・須藤保・山口聡・藤原潔・西村隆一郎・佐久間淑子・伊丹弘恵・安田政実 Germ cell differentiationを伴うAFP産生卵巣癌の一例 第52回日本婦人科腫瘍学会学術講演会(平成24年7月21日 東京都)

若橋宣・植野さやか・連美穂・須藤保 Vav1は E3 ligaseである HAKAI を介して E-cadherin を抑制し上皮性卵巣癌の上皮間葉移行に關与する 第71回日本癌学会学術総会(平成24年9月20日 北海道)

Ueno S, Sudo T, Miwa M, Morimoto A, Ukita M, Iwasaki S, Wakahashi S, Yamaguchi S, Fujiwara K, Nishimura N and Mikami Y Activation of EGFR-PI3K-Akt pathway in cervical clear cell carcinoma. 14th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS) (2012 Oct 13 Vancouver, Canada)

〔図書〕(計1件)

須藤保 卵巣癌における

PTEN/PI3K/AKT/mTOR シグナル 医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社 Vol.248 No.2, 2014年1月11日号 141-145

〔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

須藤 保 (TAMOTSU SUDO)
神戸大学・医学系研究科・医学研究員
研究者番号：50397824

(2) 研究分担者

井口 泰泉 (TAISEN IGUCHI)
大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(共通施設)・岡崎統合バイオサイエンス
センター・教授
研究者番号：90128588