

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592470

研究課題名(和文) 卵巣原発の難治性明細胞腺癌治療における HB - EGF の標的分子としての意義

研究課題名(英文) Biological significance of HB-EGF targeted therapy under development for advanced ovarian cancer patients

研究代表者

宮本 新吾 (MIYAMOTO, Shingo)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40209945

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)：本研究は難治性卵巣癌に対する新たな治療戦略として開発を進めている、HB-EGFを標的とした分子標的治療薬のより詳細な生物学的な意義を明らかにすることを目的としています。HB-EGFは直接癌の増殖を増強するだけでなく、血管新生や脂質代謝などに関わる遺伝子とお互いに調節し合うことで、増殖・浸潤能を強くすることがわかりました。この結果は、HB-EGFを標的とした新たな癌治療に対する感受性の診断薬を作成することに寄与します。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate biological significance of HB-EGF targeted therapy under development for advanced ovarian cancer patients. We found HB-EGF had interaction with angiogenesis- and lipid metabolism-related gene and others to increase tumor growth and invasion, not only increase growth activity of cancer directly. These results contributed to create diagnostic method of sensitivity against HB-EGF targeted therapy.

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 HB-EGF DNAマイクロアレイ 血管新生 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

EGF Family (上皮系増殖因子ファミリー) は、がんの増殖・進展の中心的役割を果たし、EGFR(ErbB1)と HER2(ErbB2)ががん治療の標的分子として注目されるなか、これまでの標的治療薬では臨床的に有効性が乏しく、その原因としてEGFRが形成するErbB受容体や他の受容体との結合体からのシグナルや生存シグナルであるAKTシグナルを抑えることができないことが指摘されています(Nature Reviews Cancer 9; p167-p181; p415-428, 2009)。このような背景から、新たな標的治療薬の開発が切望されています。申請者らは、EGFRに結合する増殖因子であるHB-EGFは、卵巣癌、乳癌、胃癌などの悪性腫瘍の治療の標的分子であり、その選択的阻害薬であるCRM197により既存の標的治療薬では有効でないEGFRと異種受容体によるシグナルやAKTを完全に抑制することができることを明らかにしてきました(Cancer Res. 2004, Miyamoto et al, Biochem Biophys Res Commun. Yotsumoto, 2008. Mol Cancer Therap, Yagi, Int J Cancer Yotsumoto 2010)。文部科学省がんトランスレーショナル・リサーチ事業および橋渡し研究事業の業務の委託を受け、平成19年12月より「治療不能な進行・再発卵巣癌を対象としたHB-EGF特異的抑制剤BK-UM(CRM197)の第I相臨床試験」を福岡大学病院で医師主導治験を開始しました。生体内の標的分子HB-EGFの発現を抑制する中で期待通りの安全性・有効性から、がん治療に対する新規治療薬として国内外で高く評価されその開発に期待が高まっています。また、申請者らは、HB-EGFは血中や腹水などの体液中に発現し、卵巣癌、乳癌、胃癌症例の血中などに高い濃度で発現していることを明らかにしています。特に明細胞卵巣癌の症例では、血中HB-EGF値が著明に高いことから卵巣癌のなかでCRM197は明細胞腺癌治療の有効な治療薬となることが期待されます。基礎研究成果では、現在までCGHアレイやmicroRNAアレイによりHB-EGF発現亢進に関わる3つの転写因子と5つのmicroRNAを漿液性卵巣癌細胞株より探索・同定しています。

2. 研究の目的

明細胞性腺癌は、卵巣癌のなかでも最も難治性の高い疾患です。これまでの研究成果から、明細胞性卵巣癌のなかにHB-EGFを治療の標的とする症例群としない群が含まれていると考えられます。本研究の目的は、組織・腹水・血清中のHB-EGFとともにBK-UMの感受性の指標となる因子をin vivo およびin vitro のモデルを用いて抽出するとともに、明細胞性卵巣癌の治療においてHB-EGFが有効な標的分子であることを同定します。

3. 研究の方法

(1) 明細胞性卵巣癌モデルを用いた明細胞性卵巣癌におけるCRM197の効果の検証

明細胞性卵巣癌の培養細胞または皮下腫瘍モデルマウスにCRM197を投与し、抗腫瘍効果を検証します。

(2) 培養環境によるHB-EGFの発現亢進に寄与する因子の同定

二次元培養と比較して三次元培養ではHB-EGFの発現が亢進することが知られています。これらのサンプルでマイクロアレイによる網羅的スクリーニングを行います。結果より得られた遺伝子群のHB-EGFの発現や癌増殖への寄与を検討します。

(3) 患者血清を用いたHB-EGF関連マイクロRNAの探索

初発卵巣癌患者血清やBK-UM投与症例の血清におけるマイクロRNAの発現を検討します。

4. 研究成果

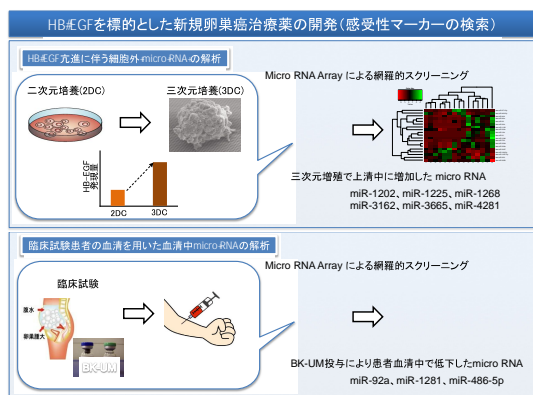
(1) 明細胞性卵巣癌モデルを用いた明細胞性卵巣癌におけるCRM197の効果の検証

有する11種類の明細胞性卵巣癌の細胞株を用いて、EGFファミリーの発現解析を行ったところ、HB-EGFおよびAmphiregulinの発現が高い細胞が多く見られました。このうち2種類のHB-EGFのみが高度に発現している細胞株ではCRM197の投与により有意にアポトーシスを起こすことがわかりました。4種類の細胞株で作製した皮下腫瘍モデルマウスでの検証においても、CRM197は濃度依存性に抗腫瘍効果を認めました。

(2) 培養環境によるHB-EGFの発現亢進に寄与する因子の同定

2種類の卵巣癌細胞株で二次元および三次元培養を行った後に、HB-EGFの発現が亢進していることを確認した後に、環境の変化に伴い発現が変動する遺伝子の網羅的スクリーニングをマイクロアレイを用いて行いました。この結果、HB-EGFの発現亢進に伴い、脂質代謝異常関連遺伝子であるCD36の発現が亢進していました。卵巣癌組織中のCD36の発現は亢進しており、腹水においてはCD36のリガンドである酸化LDLががん患者で高値であることを同定しました。その後の機能解析においては、酸化LDLによるCD36のシグナルは転写因子NRF2を介してHB-EGFの発現を亢進させることがわかりました。これらの結果から、HB-EGFおよびCD36のシグナルは自身の発現を亢進させるのみではなく、お互いのシグナルを賦活するように機能していることが考えられました。さらに、CD36のシグナル伝達をピオグリタゾンで阻害することにより、CRM197の抗腫瘍効果が増強されることがわかりました。今後はHB-EGFを標的とした治療と併せて、CD36を標的とした抗腫瘍効果の同定とメカニズムも解明を行って行きたいと考えています。

(3) 患者血清を用いた HB-EGF 関連マイクロ RNA の探索



難治性卵巣癌を対象としたBK-UM臨床試験において、治療によりHB-EGFが低下した症例において、血清中のマイクロRNAをマイクロアレイにて評価しました。HB-EGFの減少に伴い、同じように減少した血清中マイクロRNAとしてmiR-1281、miR-92a、miR-486-5p、miR-575、miR-3195が同定できました。また、BK-UMを投与後の評価で腫瘍が増大しなかった比較的效果があったと考えられる症例においては、miR-1207、miR-483-5pが高値であることがわかりました。このうち、miR-1207はHB-EGFの発現を抑制することが知られています。以上の結果を踏まえ、今後は症例数の蓄積と各マイクロRNAの機能解析を行います。

明細胞性卵巣癌は本邦に比較的多く、化学療法の効果が薄い組織型であるため、新たな治療戦略を確立することは急務です。今年度までの本研究の結果から明細胞性卵巣癌の治療においてはHB-EGFを標的とした分子標的治療が有効であることがわかりました。一方で、その治療の感受性診断薬や有効な併用薬も同時に確立することで、より卵巣癌患者の予後の改善に寄与できると考えます。

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 7件)

(1) Yotsumoto F, Tokunaga E, Oki E, Miyamoto S, et al. Molecular hierarchy of heparin-binding EGF-like growth factor-regulated angiogenesis in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Res.* 査読有り 11(5), 2013, 506-517, 2013. doi: 10.1158/1541-7786

(2) Kasai N, Kobayashi K, Miyamoto S, et al. Soluble heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) detected by newly developed immuno-PCR method is a clear-cut serological biomarker for ovarian cancer. *Am J Transl Res.* 査読有り 4(4), 2012, 415-421.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3493029/>

(3) 南星旭、四元房典、黒木政秀、宮本新吾 : HB-EGFを標的とした卵巣癌治療法の開発。産婦人科の実際、査読有り、61(2)、2012、215-222。

(3) Miyamoto S, Iwamoto R, Furuya A, et al. A novel anti-human HB-EGF monoclonal antibody with multiple antitumor mechanisms against ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res.* 査読有り 17(21), 2011, 6733-6741.

doi: 10.1158/1078-0432

(4) Hikita S, Yotsumoto F, Miyamoto S. Assessment of HB-EGF levels in peritoneal fluid and serum of ovarian cancer patients using ELISA. *Anticancer Res.* 査読有り 31(7), 2011, 2553-2559

<http://ar.iiarjournals.org/content/31/7/2553.long>

〔学会発表〕(計 25件)

南星旭、四元房典、宮田康平、黒木政秀、宮本新吾 : HB-EGF特異的抑制剤CRM197腹腔内投与の抗腫瘍効果の検討。第17回バイオ治療法研究会学術集会、平成25年12月7日、福岡

Miyata K, Yotsumoto F, Nam SO, Yagi H, Kobayashi H, Fumihiko S, Otsuki T, Kato K, Yaegashi N, Kuroki M, Miyamoto S: Study on serum HB-EGF as a prognostic biomarker in ovarian cancer patients. 第72回日本癌学会学術集会総会、平成25年10月3-5日、横浜

宮田康平、南星旭、四元房典、黒木政秀、目加田英輔、宮本新吾 : micro RNA arrayを用いたHB-EGF標的治療反応性の血中マーカーの探索。第12回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会、平成25年7月5-6日、奈良

勝田隆博、四元房典、植田多恵子、前原都、近藤晴彦、八木裕史、小林裕明、高野忠夫、大槻健郎、加藤聖子、八重樫伸生、宮本新吾 : 卵巣癌における化学療法反応性予測バイオマーカーとしてのheparin-binding epidermal growth factor-like growth factorの意義。第65回日本産科婦人科学会学術講演会、平成25年5月10-12日、札幌

宮田康平、四元房典、南星旭、宮本新吾 : CD36による卵巣癌標的分子heparin-binding epidermal growth factor-like growth factorの発現制御機構。第65回日本産科婦人科学会学術講演会、平成25年5月10-12

日、札幌

南星旭、四元房典、宮田康平、山田博美、黒木政秀、宮本新吾：脂質代謝異常関連遺伝子による卵巣癌標的分子 HB-EGF の発現制御機構。第 71 回日本癌学会，札幌，平成 24 年 9 月 19-21 日

宮田康平、四元房典、南 星旭、板持広明、紀川純三、宮本新吾：塩酸イリノテカン療法に対する卵巣明細胞腺癌の耐性機構への HB-EGF の関与とその発現機構の解明。第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会、平成 24 年 4 月 13-15 日、神戸

南星旭、四元房典、宮田康平、宮本新吾：脂質代謝異常関連遺伝子による卵巣癌標的分子 heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor(HB)の発現制御機構。第 64 回日本産科婦人科学会学術講演、平成 24 年 4 月 13-15 日、神戸

南星旭、四元房典、宮田康平、徳永えり子、秋吉清百合、沖英次、前原喜彦、黒木政秀、宮本新吾：乳癌の造腫瘍能に寄与する血管新生関連分子のヒエラルキー。第 70 回日本癌学会、名古屋、平成 23 年 10 月 3~5 日

Miyata K, Yotsumoto F, Nam SO, Itamochi H, Kigawa J, M. Kuroki M, Miyamoto S: Regulation of HB-EGF expression by transcriptional mechanism contributes to chemoresistance of ovarian clear cell carcinoma. International Society of Oncology and BioMarker 2011 Annual Meeting. October 15~19, 2011, Firenze, Italy

Nam SO, Yotsumoto F, Miyata K, Tokunaga E, Akiyoshi S, Oki E, Kuroki M, Miyamoto S: HB-EGF regulates angiogenesis-related molecules in mammary tumorigenesis. International Society of Oncology and BioMarker 2011 Annual Meeting. October 15 ~19, 2011, Firenze, Italy

宮本新吾：がん標的治療薬の開発～HB-EGF を標的とした卵巣癌治療薬の開発を目指して～。第 17 回癌治療増感研究会、平成 23 年 6 月 24-25 日、仙台

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮本 新吾 (MIYAMOTO, Shingo)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40209945

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：