

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590424

研究課題名(和文) 治療の観点からみた卵巣癌の特徴付け：低酸素関連因子の発現に基づいた治療の個別化

研究課題名(英文) Individualization of ovarian tumors for approaching new strategy associated with hypoxia-associated factors

研究代表者

安田 政実 (Yasuda, Masanori)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：50242508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞腺癌(Clear Cell Carcinoma, CCC)において、HIF関連因子Histone Deacetylase 7, HDAC7)の発現を予後との関連において免疫組織化学的に検討した。CCCの38%にHDAC7が陽性で、分子標的治療の可能性が示されたが予後との相関を明らかではなかった。2) CCCにおいてHDAC7の発現動態とHDAC阻害剤を用いた新しい治療の可能性について検討した。HDAC阻害剤はCCCの新たな治療戦略に加えられる可能性がある。3) HIF-1 遺伝子にはexon12にpolymorphic変異型(C1772T)が存在する。遺伝子変異と予後について検討した。

研究成果の概要(英文)：1) The aim of this study was to clarify the expression profile of HDAC7 in CCC. As a result, we concluded that HDAC7 may fail to become an indicator of the clinical outcome. 2) Lately, HDAC attracts the attention as target molecule of the cancer therapy. In this theme, we assessed mRNAs expression of HDAC in variable cultured ovarian cancer cell lines. HDAC inhibitor (HDI)-induced changes in the expression of mRNAs for HDAC7, HIF-1 and VEGF were also attempted to assess the potential of HDI as anti-cancer drug. As a result, it was supposed that the response to HDI may vary greatly among the ovarian carcinomas but may be a suitable candidate for HDI treatment. 3) High frequency of polymorphic variants of HIF-1 gene (C1772T) has been reported in variable malignancies. It was carried out to demonstrate HIF-1 gene polymorphic variation in CCC, by HIF-1 sequence analysis. HIF-1 gene variation was detected in 23.6%.

研究分野：人体病理(形態と機能)

キーワード：卵巣明細胞癌 治療の個別化 低酸素関連因子

1. 研究開始当初の背景

HIF-1 は、低酸素環境に応じて血管新生因子である Vascular endothelial growth factor (VEGF) やグルコースの能動輸送に関わる Glucose transporter-1 (GLUT-1) などを誘導し、個々の細胞の微小環境への適応を図っている。現在、VEGF、GLUT-1 など含めて約 100 種類の遺伝子が HIF-1 によって惹起されることが報告されてきている。これらの遺伝子は、プロモーター、エンハンサー領域に HIF-1 結合配列 hypoxia responsive elements (HREs) を持っており、HIF-1 が p300/CBP とユニットを作って HREs に結合し種々の遺伝子の転写を促す。HIF-1 は subunit・subunit から構成され、subunit は恒常的に核内に発現している。subunit は酸素依存性に細胞質に発現し、通常の酸素濃度下では E3 ユビキチンリガーゼが p-VHL を介して結合することでユビキチン化が起こる。その結果、不要な HIF-1 はプロテアソームにより速やかに分解されるため、免疫組織化学的にはほとんど捉えることはできない。

これまで我々は、上皮性卵巣腫瘍において GLUT-1 の発現は HIF-1 によって制御を受け、両者の発現は乳頭状増殖を特徴とする漿液性癌および明細胞癌で顕著であることを明らかにした。また、HIF-1 と GLUT-1 の発現は、腺腫・境界悪性・悪性へと腫瘍が進展するにしたがって増強し、その程度が粘液性腫瘍に比べて明らかに漿液性腫瘍で強いことを報告した。これらは悪性化の指標であり、低酸素への順応性は、腫瘍形質（組織型や組織構築）に依存していることが示唆される。HIF-1 の定量的解析から明細胞癌は他の組織型よりも多いことが証明された。昨今、マクロライド系抗生物質であるラパマイシンに抗腫瘍効果があることが明らかにされたからは臨床応用が検討されてきた。実際、我々が行った卵巣明細胞癌再発株を用いた

予備実験および動物モデル実験で、ラパマイシンによる HIF-1 の抑制と VEGF の抑制が連動することが確認された。すなわち、低酸素下での HIF-1 の活性化には mTOR が正の調節因子として機能していることから、mTOR を阻害することによる HIF-1 の抑制作用が期待される。また、明細胞癌ではリン酸化された p-mTOR が優勢に発現していることが明らかにされたことから、mTOR 阻害剤の臨床応用に対し p-mTOR が biomarker 治療選択のための指標になることが推察された。

2. 研究の目的

本研究は、平成 21～23 年度・基盤研究(C)「治療の個別化を視野においた、卵巣腫瘍における低酸素関連因子の解析」の本旨を引き継ぎ、治療の観点から緻密で実践性の高い情報が臨床現場にもたらされるよう努めていくことにある。加えて、とりわけ進行癌の予後良好群と初期癌の予後不良群を対象に、それらを決定する要因の解明を低酸素関連分子に主眼をおいて、**治療の観点からみた腫瘍の特徴付け**を研究目的としてきた。

現在、我々は「**卵巣癌における HDAC の免疫組織化学的発現、各種卵巣癌培養株を用いた HDACs mRNA の発現**」の解析に着手しつつあり、以下のような結果を得てきている：明細胞腺癌では他の組織型に比して HDAC7 の核内発現を示す例が多く、これらは陰性例に比して予後不良の傾向がある；明細胞腺癌株の方が漿液性腺癌株と比較してみると、種々の HDAC mRNA 発現がより顕著である。以上の予備的データを踏まえて更なる展開を次のような課題において計りたい HIF-1 と HDACs との関係性については、HDAC1, 3, 4, 6 は HIF-1 の安定化に HDAC7 は HIF-1 の核内移行と活性化を制御することが近年報告されている。即ち、今回 HDACs の発現ならびに HIF-1 の発現、定量的に得られた活性型 HIF-1 量の三者との相関について解析することで、卵巣癌における HIF-1 と HDACs の関係

性を以下の視点から明らかにすることに目的を置いた。1. HDAC は組織型特異的に発現するのか、および同一組織型間で相同性または乖離がどの程度存在するのか、2. これらの差異は予後影響因子としての重みを持ち得るのか、3. HDAC 阻害 HIF-1 核内移行抑制は、HIF-1 の下流分子抑制にどれ程の効果をもたらすのか、4. 臨床的に近い将来において治療戦略の標的要因になり得るのか、などを明らかにしたい。

本邦と諸外国との比較において、明細胞癌の頻度が有意に高い。明細胞癌は通常の化学療法に対し漿液性腺癌と比べると耐性があるとされているが、期では種々の組織型間で比べても大きな予後の違いはない。しかしながら、期症例でみると、漿液性癌の生存率が 50%であるのに対して明細胞癌の生存率は 30%とかなり低い。予後良好と不良の転帰を生む因子を、後方視的解析を行う。昨今、遺伝子的な背景や腫瘍の成り立ち（前駆病変）を基に、卵巣腫瘍は型・型に区分けされるようになり、これまでの形態学的分類をより深めた腫瘍特性に注目が注がれてきている。我々は、加えて治療の観点からみた腫瘍の個別化に主眼を置いた研究を目指している。すなわち、本研究の意義は「**本来、個別に行われるべき治療戦略の選択・決定に対しての病理的情報提供**」にあり、国際的臨床研究に資する成果を目指すと同時に、日常レベルに応用可能なバイオマーカーの発掘を目的とした。

3. 研究の方法

1) HIF-1 α 核内移行分子 HDAC7 の臨床病理学的解析

当院を含む 4 施設において、施設 IRB の承認のもとに検討を行った。1985 年から 2011 年 4 月までに外科的に切除された卵巣腫瘍で、組織学的に CCC と診断された 188 例における HDAC7 の発現を免疫組織学的に検討した。さらに、HDAC7 発現の

有無により 2 群に分け、患者背景、病期、予後につき比較した。

2) HIF-1 α の核内移行シグナルにおける HDACs の役割・機能解析

HDAC サブタイプの阻害効果により HIF-1 の活性化を抑制するのかを検証した。解析手法：in vitro において、既に我々が入手している HDI, シリピニンの 2 種類の阻害剤候補を用いて、濃度ならびに反応時間依存的に HDAC7 の発現を抑制し、HIF-1 の安定化ならびに活性化を阻害するのかを検討する。併せて、HIF-1 の下流因子へ与える影響、細胞周期への影響、アポトーシス誘導効果についても検討し、HIF-1 活性化の阻害を通じた新たな抗腫瘍薬としての可能性に着目した。

3) HIF-1 α exon12 C1772T 多型と予後

本学で卵巣癌の診断にて手術を受け、明細胞癌と診断され倫理委員会の承認を得た 89 人の患者の手術検体に対して HIF-1 α 配列分析を行った。また、診療録から患者の年齢、臨床病期、無病生存率および全生存率を抽出し解析した。手術検体の CCC 組織における HIF-1 α 遺伝子配列を直接配列決定法により解析し、変異について検討した。プライマーは、ヒト HIF-1 α 遺伝子 C1772T 変異の判定に必要な 178 塩基対の断片を増幅するために、HIF-1 α forward (5'GCTCCCTATATCCCAATGGA-3') および HIF-1 α reverse (5'-CAGTGGTGGCAGTGGTAGTG-3') を作成した。PCR は AccuprimeTaq DNA polymerase system を用い標準的な反応条件にて行った。PCR 産物を ExoSAP-IT PCR Product Clean-up (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) にて精製、標識し、非標識塩基を除去した後、Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用してシーケンシングを行った。解析は sequencing

analysis software 3.4 versionを用いて行った。

4. 研究成果

1) HIF-1 核内移行分子HDAC7の臨床病理学的解析

HDAC7が陽性であったのは72例(38.1%)であった(図1)。HDAC7陽性群と陰性群の年齢,子宮内膜症合併の有無,III/IV期の割合,5年生存率につき比較したが,今回検討した範囲では有意差はみられなかった。肝細胞癌,ホジキンリンパ腫においてHDAC7陽性群は予後不良であることが示されている。HDAC7がCCCの分子標的治療の可能性が示されたものの,HDAC7と予後の関係については(図2),今後,条件を揃えた前方視的研究により更に検討したい。

図1

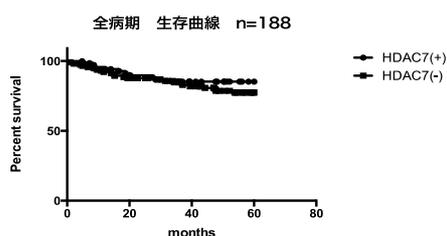
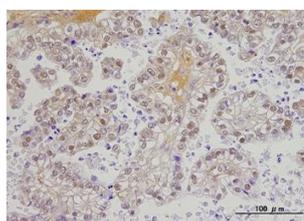


図2

2) HIF-1の核内移行シグナルにおけるHDACsの役割・機能解析

HDAC7は他の組織型に比して明細胞癌で高発現しており(図3),HDAC7陽性例では予後不良な傾向が認められた。また,invitroにおける解析でも明細胞腺癌株でHDAC7の高発現を認め,HDAC7,HIF-1,VEGFの発現には一定の相関を認めた。一方でHDIの投与によりすべての細胞株でHDAC7の阻害効果を認め,一部の細胞株ではVEGFの抑制も認めた。さらにHeLa細胞にシリビニン投与後2h,6hにおいて,シリビニン濃度依存的にHIF-1の

タンパク発現の減少が認められた(図4)。

HDAC7の抑制はHIF-1の発現抑制を通じた新たなHIF-1阻害剤として有効である可能性が期待されたが,HDAC阻害剤の選定には更に検討が必要であるものと思われた。また,いくつかの細胞において,HDAC阻害剤の投与によりHDAC7,HIF-1およびVEGFのmRNA発現に減少を認めたが,HDAC7とHIF-1の核移行のシリビニンとの関連や,HIF関連因子への影響については,HDAC7をロックアウトし解析する必要があると考えられた。

シリビニンはHIF-1タンパクの発現抑制をすることから,新たなHIF-1活性化阻害剤としての有効性が期待される。シリビニンはドイツでは「レガロン」という名で肝炎や肝硬変の治療に長年使用されてきており副作用も少ない。抗腫瘍の観点からも副作用の軽減された抗腫瘍薬として検討したい。

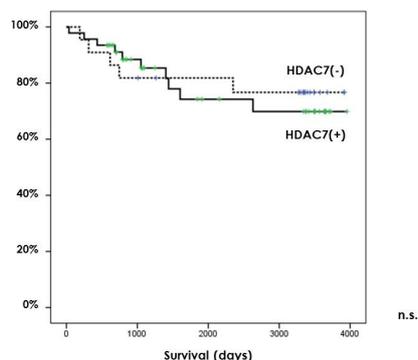


図3

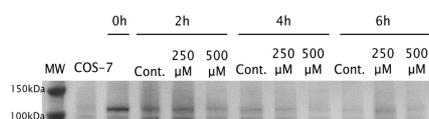


図4

3) HIF-1 exon12 C1772T多型と予後

CCCにおけるHIF-1遺伝子C1772T変異の頻度は23.6%で,これは他臓器の癌におけるHIF-1遺伝子変異の頻度と比較しても高いものといえる(図5)。I期とII-IV期におけるHIF-1変異陽性例はそれぞれ65例中14例(21.5%),24例中7例(29.1%)であった。5年生存群のHIF-1変異頻度は76例中18例(23.6%),5年以内に死亡した群のHIF-1変異頻度は13例中3例(23.0%)であり,有

有意差はなかった。5年無病生存で比較してもHIF-1 変異頻度に有意差はなかった。いずれの病期においても両群間に有意な差は認められなかった(図6)。

本研究はCCCにおけるHIF-1 遺伝子変異についての最初の報告で、CCCの発癌因子として、PI3キナーゼ-AKT-mTOR経路とRAS-MEK-ERK経路の2経路のクロストークが重要であると推定されている。我々が検討したHIF-1はmTORにより発現が促進されMEKを抑制することから、両経路を結ぶ重要な分子であることが知られている。CCCにおける遺伝子変異と患者予後の関係については、ホスファチジルイノシトール3'-キナーゼ(PI3KCA)遺伝子に関して、PI3KCA遺伝子変異はCCCの57%に認められ、I期の患者においてPI3KCA変異を有する患者群のほうが予後良好であったと報告している。

悪性腫瘍においては、しばしば同一腫瘍内に複数の遺伝子変異が存在し、腫瘍の進行を加速することが知られている。我々は現在、同じ患者検体におけるPI3KCAとK-RAS変異に関して追加の解析を予定しており、これらの変異と患者の予後の相関関係を再評価することを計画している。

	all	mutation(+)	mutation(-)
n	59	21	58
age(±median)	54±9.89	54±9.23	54±10.0
stage I	65	14	51
II	5	1	4
III	17	5	12
IV	2	1	1
operation			
complete	50	11	39
incomplete	39	10	29
chemotherapy			
TJ	10	4	6
CAP	9	6	3
OPT-P	14	3	11
TC	30	3	27
DC	2	0	2
none	17	4	13
other	7	1	6

図5

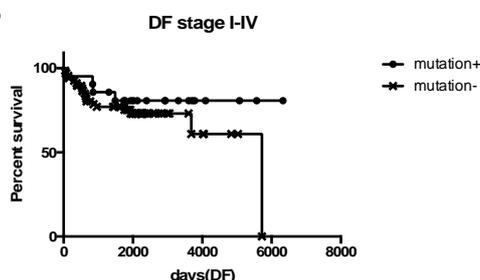


図6

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 10件)

- Ikeda Y, Yasuda M, et al. (2/6 番目): Synchronous mucinous metaplasia and neoplasia of the female genital tract with external urethral meatus neoplasm: A case report. *Gynecol Oncol Rep.* 査読有 2015 Feb 17;12:27-30. doi: 10.1016/j.gore.
- Yasuda M. (1/1 番目) Immunohistochemical characterization of endometrial carcinomas: endometrioid, serous and clear cell adenocarcinomas in association with genetic analysis. *J Obstet Gynaecol Res.* 査読有 40(12):2167-76. 2014. doi:10.1111/jog.12564.
- Hasegawa K, Nagao S, Yasuda M, et al. (3/15 番目) Consensus Review for Clear Cell Carcinoma of the Uterine Corpus and Cervix. *Int J Gynecol Cancer.* 査読有 24(9 Suppl 3): S90-5. 2014. doi: 10.1097/IGC.0000000000000297.
- Matsuo K, Yoshino K, Yasuda M, et al. (6/16 番目) Effect of lymphovascular space invasion on survival of stage I epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* 査読有 123(5):957-965. 2014. doi: 10.1097/AOG.0000000000000240.
- Morimoto A, Sudo T, Yasuda M, et al. (4/5 番目) Alpha-fetoprotein-producing ovarian clear cell adenocarcinoma simulating fetal gut in a postmenopausal woman. *Gynecol Oncol Case Rep.* 査読有 12;8:24-6. 2014. doi: 10.1016/j.gynor.2014.03.001.
- Kozawa E, Inoue K, Yasuda M, et al. (5/6 番目) Diffusion-weighted MR imaging findings of ovarian adenocarcinofibromas and adenofibromas. *Clin Imaging.* 査読有 38(4):483-9. 2014. doi: 10.1016/j.clinimag.2014.01.014. 6.
- Ohta S, Tanaka M, Yasuda M, et al. (6/6) Pseudotuberculous pyelonephritis with caliceal diverticulum: a case report and review of literature. *泌尿器外科.* 査読有 27(3): 417-420. 2014.
- Hirasawa T, Miyazawa M, Yasuda M, et al. (3/10 番目) Alterations of hypoxia-induced factor signaling pathway due to mammalian target of rapamycin (mTOR) suppression in ovarian clear cell adenocarcinoma: in vivo and in vitro explorations for clinical trial. *Int J Gynecol Cancer.* 査読有 23(7):1210-8. 2013.
- Ogane N, Yasuda M, Kameda Y, et al.

(2/9 番目) Prognostic value of organic anion transporting polypeptide 1B3 and copper transporter 1 expression in endometrial cancer patients treated with paclitaxel and carboplatin. Biomed Res. 査読有 34(3):143-51. 2013.

10. **Yasuda M**, Katoh T, Hori S, et al. (1/10 番目) Endometrial intraepithelial carcinoma in association with polyp: review of eight cases. Diagn Pathol. 査読有 15;8:25. 2013.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. **Yasuda M**, Katoh T, Ogane N, Nakayama H: Reconsideration of FIGO IIIA, “positive peritoneal cytology alone”, in endometrial carcinoma: significance of immunocytochemistry. 15th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society 8-11 November 2014 Melbourne, Australia.
2. **Yasuda M**, Katoh T, Kikuchi J, Shimizu M, Hasegawa K, Hatanaka K, Kajiwara H: Endometrial polyp-associated carcinomas: review of 22 cases. The 18th Japan-Korea-Taiwan Joint Conference for Gynecological Pathology May 24th, 2014 Taipei, Taiwan.
3. Kikuchi J, Takayanagi N, Chihping Li, Masaoka A, Yamaguchi H, Nagata K, Hujino T, Hasebe T, **Yasuda M**, Shimizu M, Kozawa E, Hasegawa K: A case of atypical lipoleiomyoma. The 18th Japan-Korea-Taiwan Joint Conference for Gynecological Pathology May 24th, 2014 Taipei, Taiwan.
4. Katoh T, **Yasuda M**, Nagata K, Shimizu M, Shintani D, Ikeda Y: A case of synchronous mucinous metaplasia and neoplasia of the female genital tract (SMMN-FGT). The 18th Japan-Korea-Taiwan Joint Conference for Gynecological Pathology May 24th, 2014 Taipei, Taiwan.
5. **Yasuda M**: Significance of Peritoneal Cytology in Endometrial Cancer: Reconsideration of Revised Figo Classification. 18th International Congress of Cytology Scientific Committee. 26-30 May 2013 Paris, France.

〔図書〕(計 0 件)

〔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
安田 政実 (YASUDA, Masanori)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：50242508

(2) 研究分担者 ()
研究者番号：

(3) 連携研究者 ()
研究者番号：