

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592515

研究課題名(和文) 卵巣癌細胞が分泌する胎盤増殖因子に焦点をあてた新規抗血管新生治療の可能性の検討

研究課題名(英文) Developing a novel anti-angiogenic therapy focused on placental growth factor secreted by ovarian cancer cells

研究代表者

坂田 正博 (Sakata, Masahiro)

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10260639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年卵巣癌において抗 VEGF-A 抗体による抗血管新生療法が新たな治療選択肢として確立したが、その有効性は限定的であった。本研究では新規抗血管新生療法の開発を目的とし、種々の血管新生因子を制御する転写因子 Nuclear factor-kappa B (以下 NF- κ B) に着目した。卵巣癌の大半で NF- κ B シグナルは活性化しており、これは独立予後不良因子であることを見出した。特異的 NF- κ B 阻害剤は In vitro、In vivo において抗血管新生作用を示し、顕著に卵巣癌腹膜播種を抑制した。即ち NF- κ B が卵巣癌の新たな抗血管新生療法の分子標的となる可能性を提示した。

研究成果の概要(英文)：The improvement of outcome in patients with ovarian cancer by an anti-angiogenic therapy has been shown in large clinical trials. However, the only option currently available is the anti-VEGF-A antibody, which efficacy is limited. Therefore, we aim to develop a new anti-angiogenic drug for ovarian cancer. As NF- κ B signaling has the potential to regulate several angiogenic factors including VEGF-A, we determined to identify the significance of NF- κ B activation in ovarian cancer and to investigate the possibility of a novel NF- κ B inhibitor as an anti-angiogenic drug. Immunohistochemical analyses using ovarian cancer tissues showed that NF- κ B activation is an independent prognostic factor. A specific NF- κ B inhibitor led to the inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo. In a xenograft model, the treatment of NF- κ B inhibitor significantly suppressed peritoneal dissemination. Anti-angiogenic therapy targeting NF- κ B signaling is a potential future option to treat ovarian cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：卵巣癌 抗血管新生療法 NF- κ B シグナル VEGF

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は近年本邦での罹患数・死亡数が増加している予後不良な疾患であるが、その治療成績はこの20年間においてほとんど改善していない。その理由は卵巣癌は約半数が腹膜播種や遠隔転移を伴う進行癌で発見されるため、最大限の腫瘍減量手術 (Debulking surgery) とタキサン系・プラチナ系を組み合わせた抗癌剤治療からなる標準治療を完遂しても、多くが再発をきたし致命的な経過を辿るためである。2011年以降、欧米を中心に初発・再発卵巣癌に対する抗血管新生療法の有用性を示す大規模第三相臨床試験の成果が報告された (初発卵巣癌: GOG0218, ICON7, 再発卵巣癌: OCEANS, AURELIA)。この新規の治療法である抗血管新生療法は、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) に対するモノクローナル抗体である Bevacizumab を従来の抗癌剤治療との併用またはその後の維持投与をすることで無病生存期間を延長させた。我々は以前から Bevacizumab の維持療法が卵巣癌モデル動物において有効であること (Mabuchi S. et al. Clin. Cancer Res. 2008;14:7781-9)、VEGF が特に卵巣明細胞腺癌では病期を問わず強発現しており、Bevacizumab が特に再発明細胞腺癌の治療に有効である可能性を報告してきた (Mabuchi S. et al. Mol. Cancer Ther. 2010;9:2411-22)。即ち、我々の基礎的な検討が遂に臨床レベルで追認されたといえる。しかしながら、Bevacizumab を用いた臨床試験の成績は良好であったとはいえ、長期間の併用・維持療法を施行することで数か月だけの無病生存期間の延長に留まり、全生存期間には有意な影響を与えないという限定的な効果に過ぎなかった。即ち、抗血管新生治療は卵巣癌に対し有効だが、現行の VEGF のみを標的とする Bevacizumab では限界があるということも同時に示されたと考える。更に、抗体製剤である Bevacizumab は非常に高価な薬であるために医療経済学的観点からも、新規の抗血管新生療法の開発が切望されているのが現状である。

「なぜ、Bevacizumab の有効性には限界があるのか？」について我々は考察を行った。その要因の一つとしては、血管新生因子は勿論 VEGF のみではなく、他に、胎盤増殖因子 (PlGF)、Interleukin-8 (IL-8)、Angiopoietin、線維芽細胞増殖因子 (FGF) などがあるため、Bevacizumab により VEGF の作用を阻害しても、最終的にはこれらを迂回して血管新生が行われることにある (Genes & Cancer 2010;1: 12-25)。そこで我々は当初、VEGF ファミリーに属し、低酸素状態において強力に血管新生を誘導する PlGF に焦点を絞って研究を開始した。しかしながら、特異的な PlGF 阻害剤が存在しないため機能抑制の検討を行うことが困難であったため、VEGF をはじめとする種々の血

管新生因子を上流にて制御する転写因子である NF- κ B (Nuclear factor-kappa B) シグナルに着目して検討を行った。NF- κ B が、VEGF 単独ではない抗血管新生療法の標的分子として有望であれば、卵巣癌のみならず、既に抗血管新生療法が有効だとされている肺癌、大腸癌、悪性神経膠腫などにも広く応用され、予後改善に寄与するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、卵巣癌において NF- κ B シグナルを標的とした新規抗血管新生療法の可能性を明らかにするために、まず臨床検体組織における NF- κ B の活性化とこれが予後に与える影響について検討した。さらには、NF- κ B シグナルを標的とした抗血管新生療法による癌治療の可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 卵巣癌臨床検体における NF- κ B の活性化についての検討

まず卵巣癌臨床組織において NF- κ B が活性化されているかどうかについて、岐阜大学産婦人科・森重健一郎らとの共同研究で、同大学において初回手術を行った卵巣癌検体94例を用いて免疫組織化学染色を施行した。そして、その卵巣癌における NF- κ B の活性化が臨床病理学的意義に与える影響を Kaplan-Meier 法ならびに Cox proportional-hazards regression model を用いた多変量解析にて検討した。NF- κ B シグナルの中で最も主要である NF- κ B classical pathway においては、不活性化状態では NF- κ B (p50-RelA) は細胞質に存在し、Inhibitor κ B (I κ B) と結合することによりその活性を抑制されている。TNF- α や LPS 等の刺激因子が細胞に加わると、I κ B キナーゼ (IKK) はリン酸化され、活性型 (p-IKK) になる。続いて p-IKK は I κ B をリン酸化し、p-I κ B はタンパク質分解酵素複合体であるユビキチン・プロテアソーム系により分解される。この結果 I κ B により抑制されていた NF- κ B は核内へ移行できるようになり、核内で転写因子として働き、各種の遺伝子発現を調節する。今検討では、NF- κ B の活性化の指標として抗 p-IKK α/β 抗体を用いた。

(2) 卵巣癌臨床検体における VEGF-A 発現についての検討

次に同卵巣癌臨床検体を用いて、重要な血管新生因子として知られている VEGF-A の発現について、抗 VEGF-A 抗体を用いた免疫組織化学染色で検討した。また、VEGF-A 発現と NF- κ B の活性化に相関関係が存在するかどうかについても検討した。

(3) 新規低分子化合物 IKK β 阻害剤 (IMD-0354) が卵巣癌細胞の増殖、接着、浸

潤に与える影響の検討

NF-κB 阻害薬のがんに対する臨床応用については、これまでも多くの固形がん、血液がんにおいて活性化されている NF-κB シグナルは治療標的として注目されてきたが、現在までに開発されてきた NF-κB 阻害薬は、その選択性が低く、毒性・副作用などが懸念されるため、未だ臨床応用には至っていない。そこで我々は、NF-κB 阻害薬を臨床へ応用することを念頭において、新規低分子化合物である IMD-0354 に着目した。IMD-0354 は IKKβ 阻害薬であり NF-κB シグナルを負に制御する薬剤であり、本研究では分子医薬研究所（株）より無償提供を受けた。IMD-0354 は、その高い親和性と ATP 非競合性の作用部位によって、高い特異性と薬効を発揮する。また、炎症性疾患を対象とした第二相臨床試験は既に終了しており、ヒトに対して重篤な副作用は認めず、高い安全性が期待できる薬剤である。我々は、まずこの IKKβ 阻害薬が卵巣癌細胞の NF-κB シグナルを抑制するかどうかについて、抗 p-IKKα/β 抗体を用いた Western Blot 法と、免疫蛍光染色による NF-κB p65 の細胞質から核内への移行の観察によって検討した。次に、IMD-0354 が増殖能、接着能、浸潤能に与える影響を *In vitro* proliferation、adhesion、invasion assay にて検討を行った。

(4) IMD-0354 が抗血管新生阻害作用を示すかどうかの検討

IMD-0354 の抗血管新生作用の是非について、まずは VEGFA promotor 領域を含む vector を用いた Luciferase reporter gene assay によって、IMD-0354 が VEGFA 遺伝子の転写を抑制するかどうかを検討した。続いて、卵巣癌培養上清を用いた ELISA 法によって、IMD-0354 が VEGF-A タンパク発現を抑制するかどうかを検討した。さらには、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) を用いて *In vitro* scratch assay を施行し、卵巣癌細胞より分泌される血管新生因子を IMD-0354 が阻害することで HUVECs の遊走が抑制できるかどうか検討した。

(5) IKKβ 阻害剤が抗血管新生薬として卵巣癌腹膜播種を抑制しうるかどうかの検討

我々は免疫不全マウスに卵巣癌細胞株 (SKOV3-ip1 1×10^6 cells、ES-2 2×10^6 cells) を腹腔内投与することにより進行卵巣癌に準じた腹膜播種を生じるモデルマウス実験系を確立している。この *In vivo* の系を用いて、IMD-0354 単剤腹腔内投与による腫瘍抑制効果の検討を行った。具体的には腹膜播種成立後に数週間 IMD-0354 30mg/kg を連日投与したのちにマウスを安楽死させ (SKOV3-ip1 Day 42、ES-2 Day 14)、その腫瘍重量・腹膜播種腫瘍数・腹水量について検討した。さらに腫瘍を摘出し、免疫組織化学染色によって *in vivo* における IMD-0354

の作用機序を検討した。

4. 研究成果

(1) 卵巣癌の 86% に NF-κB の活性化を認め、p-IKKα/β は卵巣癌における独立予後不良因子である

卵巣癌臨床検体 94 例を抗 p-IKKα/β 抗体にて免疫染色を施行し、染色強度により 0、1、2 とスコア化し、1 と 2 を Positive 群に、0 を Negative 群に分類した。実に卵巣癌の 86% (81/94 例) が Positive 群であり、卵巣癌の大多数において NF-κB シグナルが活性化されていることを同定した。また、Kaplan-Meier 法による生存率解析において p-IKKα/β positive 群は無増悪生存率において有意に予後不良であり ($p=0.001$ 、Log-rank test)、全生存率において予後不良な傾向を認めた ($p=0.073$ 、Log-rank test)。

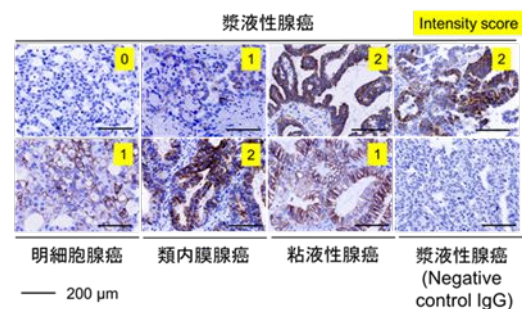


図1 卵巣癌組織における NF-κB の活性化についての検討 (抗 p-IKKα/β 抗体を用いた免疫染色)

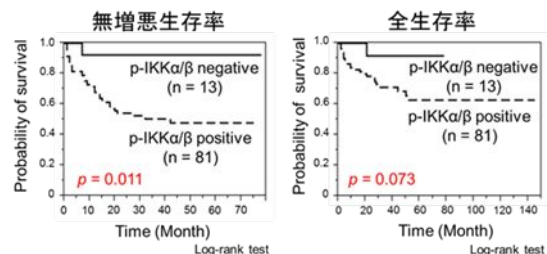


図2 卵巣癌において NF-κB の活性化は予後不良である

続いて、無増悪生存率において年齢、進行期、組織型、初回手術時最大残存腫瘍径、p-IKKα/β 染色の因子にて多変量解析を行った。p-IKKα/β 染色は、卵巣癌の無増悪生存率において独立予後因子であった (Hazard ratio 5.853、 $p=0.019$)。

	Hazard ratio	95% confidence interval	p value
年齢			
< 70 歳 vs ≥ 70 歳	0.620	0.270-1.297	0.212
進行期			
I-II 期 vs III-IV 期	14.536	4.678-63.729	< 0.001
組織型			
非漿液性腺癌 vs 漿液性腺癌	1.107	0.560-2.226	0.771
初回手術時最大残存腫瘍径			
< 1 cm vs ≥ 1 cm	2.063	1.043-4.282	0.037
p-IKKα/β staining			
Negative vs Positive	5.853	1.256-104.258	0.019

図3 卵巣癌において NF-κB の活性化は独立予後不良因子である (無増悪生存率に対する多変量解析)

(2) 卵巣癌において VEGF-A の高発現は予後不良因子であり、これは p-IKKα/β positive と有意な相関関係を認めた

同卵巣癌組織を抗 VEGF-A 抗体にて免疫染色を施行し、染色強度と染色陽性細胞の割合により高発現群と低発現群に分類した。卵巣癌の 50% (47/94 例) は VEGF-A の高発現を示し、これは無増悪生存率において有意に予後不良であり ($p=0.014$, Log-rank test)、全生存率においては予後不良な傾向を認めた ($p=0.086$, Log-rank test)。

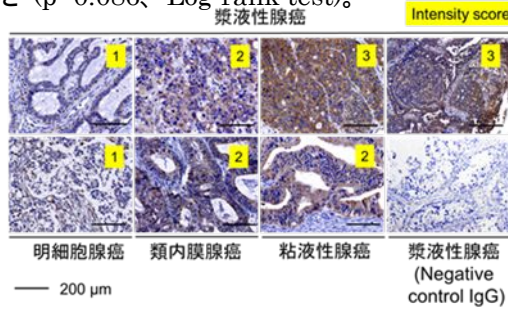


図4 卵巣癌組織における VEGF-A の発現についての検討 (抗 VEGF-A 抗体を用いた免疫染色)

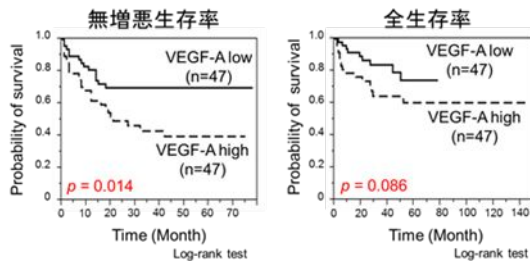


図5 卵巣癌において VEGF-A の高発現は予後不良である

さらに IKKα/β のリン酸化と VEGF-A の発現との相関をカイ 2 乗検定にて検討すると、両者に有意な正の相関関係があることを証明した ($p=0.037$)。即ち、NF-κB シグナルの活性化が VEGF-A の発現を制御することにより、卵巣癌患者の予後を規定している可能性を示唆することができた。

(3) IMD-0354 は In vitro において卵巣癌細胞の接着能と浸潤能を低下させる

二種類の卵巣癌細胞株 SKOV3-ip1 と RMUG-S を実験に用いた。IKKβ 阻害薬である IMD-0354 が卵巣癌細胞の NF-κB シグナルを抑制するかどうかについて、抗 p-IKKα/β 抗体を用いた Western Blot 法にて検討を行ったところ、濃度依存的に NF-κB シグナルを抑制した。また、免疫蛍光染色法による NF-κB p65 の観察によっても、IMD-0354 1 μM 投与によって TNF-α にて誘導された NF-κB p65 の核内移行の大部分は阻害された。

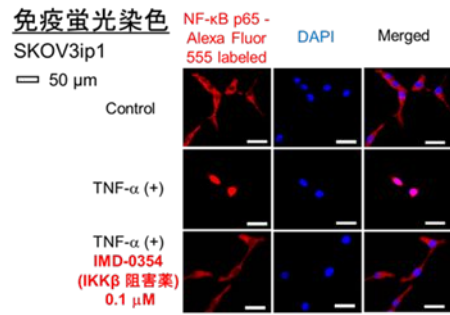


図6 IKKβ 阻害薬は NF-κB p65 の核内移行を阻害する

次に、IMD-0354 が増殖能に与える影響を検討したところ、IMD-0354 は卵巣癌細胞の増殖能に有意な影響を与えなかった。一方、接着能に与える影響を検討した結果、Fibronectin あるいは Collagen type 1 を coating した plates のいずれにおいても、IMD-0354 濃度依存的に接着能は低下を認めた。

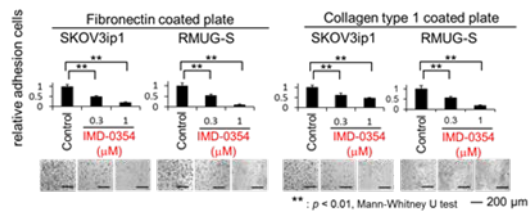


図7 IKKβ 阻害により卵巣癌細胞の接着能は低下する

さらに、浸潤能に与える影響を invasion assay にて検討したところ、IMD-0354 濃度依存的に浸潤能は低下した。

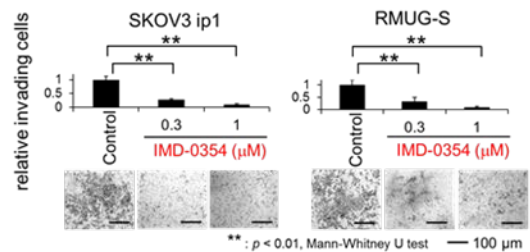


図8 IKKβ 阻害により卵巣癌細胞の浸潤能は低下する

これらの接着能・浸潤能の低下に関わる分子を検討したところ、IMD-0354 投与によって Integrin β1 と MMP-2 が顕著に低下していた。IMD-0354 はこれらの分子の発現制御を介して卵巣癌の接着・浸潤を阻害することが示唆された。

(4) IMD-0354 は VEGF 産生阻害を介して In vitro において抗血管新生作用を示す

IMD-0354 の NF-κB シグナルの活性化阻害作用により抗血管新生作用を示すかどうかについて検討した。まず、Luciferase reporter gene assay において、IMD-0354 が濃度依存的に VEGFA 遺伝子の転写抑制を示すことを認めた。次に ELISA 法でも同様に、IMD-0354 が濃度依存的に SKOV3ip1 が分泌する VEGF-A タンパクを抑制することを同定した。

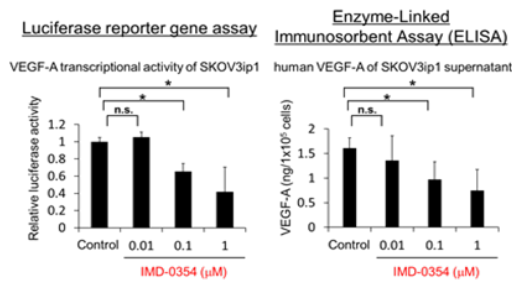


図9 IKKβ 阻害により NF-κB による VEGF-A の転写が抑制され、VEGF-A タンパク発現も抑制される

そして、HUVECs を用いた Scratch assay による *In vitro* angiogenesis model において検討を行った。IMD-0354 は HUVECs の遊走に対して直接影響を与えなかった。卵巣癌 SKOV3ip1 培養上清を添加した場合は、Positive control の VEGF-A 5 ng/mL 添加と同様に HUVECs の遊走を誘導した。IMD-0354 存在下で培養した SKOV3ip1 の培養上清では、IMD-0354 の濃度依存的に HUVECs の遊走を阻害し、ここにさらに VEGF-A を添加することで HUVECs の遊走能は回復した。即ち、IMD-0354 による NF-κB シグナル抑制が癌細胞からの VEGF-A 産生を抑制し、これが新規の血管新生抑制治療になりうる可能性を示した。

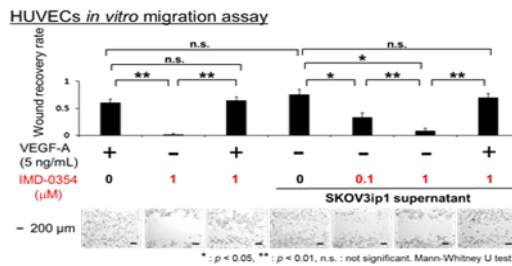


図10 IMD-0354 は卵巣癌からの VEGF-A 産生阻害を介して HUVECs の 遊走を抑制する

(5) 卵巣癌腹膜播種モデルマウスにおいて IMD-0354 は抗血管新生作用を示し、腹膜播種を抑制する

In vivo model において、IMD-0354 連日投与を行った群は、コントロール群に比して卵巣癌の腫瘍重量、腹膜播種腫瘍数ともに有意に抑制されていた。

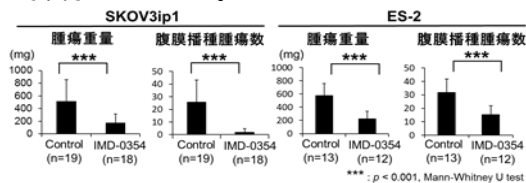


図11 IKKβ 阻害により 卵巣癌の 腹膜播種が抑制される

摘出した腫瘍の免疫染色を施行すると、IMD-0354 投与群では IKKα/β のリン酸化ならびに VEGF-A 発現は顕著に抑制され、抗 mouse CD31 抗体で染色された腫瘍内血管数も有意に減少していた。一方、細胞増殖のマーカーである Ki-67 とアポトーシスのマーカーである Cleaved Caspase-3 の免疫染色では有意差を認めなかった。以上より、

IMD-0354 は抗血管新生作用を示し、*In vivo* において卵巣癌の腹膜播種を有意に抑制した。本研究の成果により、NF-κB シグナルを標的とした新規抗血管新生療法は卵巣癌において有望であることが強く示唆された。

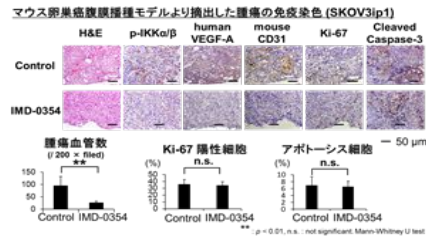


図12 *In vivo* においても IKKβ 阻害により 抗血管新生作用を示す

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 1 件)

Kinose Y, Sawada K, Makino H, Ogura T, Mizuno T, Suzuki N, Fujikawa T, Morii E, Nakamura K, Sawada I, Toda A, Hashimoto K, Isobe A, Mabuchi S, Ohta T, Itai A, Morishige K, Kurachi H, Kimura T. IKKβ Regulates VEGF Expression and Is a Potential Therapeutic Target for Ovarian Cancer as an Antiangiogenic Treatment. *Mol Cancer Ther.* 2015;14:909-19. doi: 10.1158/1535-7163.

(学会発表)(計 3 件)

Yasuto Kinose, Kenjiro Sawada, Kae Hashimoto, Seiji Mabuchi, Ken-ichirou Morishige, Tadashi Kimura. A novel IKKβ inhibitor, IMD-0354, inhibits ovarian cancer dissemination by inhibiting VEGF production from cancer cells - the potential for a novel anti-angiogenic therapy. AACR Annual Meeting 2013. Apr 10, 2013. Washington, DC (U.S.A.)

木瀬 康人、澤田 健二郎、磯部 晶、橋本 香映、澤田 育子、馬淵 誠土、坂田 正博、木村 正。NF-κB シグナルを標的にした新規抗血管新生治療薬の開発とその可能性の検討。第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会。2013 年 5 月 12 日。ロイトン札幌、ホテル さっぽろ芸文館、札幌プリンスホテル、札幌市教育文化会館(北海道札幌市)。

Yasuto Kinose, Kenjiro Sawada, Kae Hashimoto, Hiroshi Makino, Tomoko Mizuno, Noriko Suzuki, Koji Nakamura, Seiji Mabuchi, Masahiro Sakata, Ken-ichirou Morishige, Tadashi Kimura. A novel IKKβ inhibitor, IMD-0354, suppresses ovarian cancer dissemination

by inhibiting VEGF production : a potential for an anti-angiogenic therapy. The 3rd Biennial Meeting of ASGO, The 55th Meeting of JSGO. Dec 15, 2013. The Westin Miyako Kyoto (Kyoto city, Kyoto).

〔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：
出願年月日：
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 坂田 正博
(Sakata Masahiro)
大阪大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10260639

(2)研究分担者 澤田 健二郎
(Sawada Kenjiro)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：00452392

研究分担者 馬淵 誠士
(Mabuchi Seiji)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：00452441

研究分担者 磯部 晶
(Isobe Aki)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：60397619

研究分担者 橋本 香映
(Hashimoto Kae)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：90612078

(3)連携研究者

()

研究者番号：