

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293362

研究課題名(和文) HB-EGF標的治療薬適応のコンパニオン診断薬作製を目指した遺伝子探索

研究課題名(英文) Searching gene to manufacture the companion diagnostic agent targeting the HB-EGF.

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) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌は婦人科悪性腫瘍の中で最も予後不良です。様々な分子標的治療薬の開発されてはきましたが、未だ発展途上です。今回、卵巣癌のバイオマーカーの開発を目的として、microRNAに着目し解析しました。卵巣癌患者の血清をマイクロアレイ解析し、miR-135a-3pを同定しました。さらに、卵巣癌、卵巣腫瘍、正常卵巣患者の血清をPCR法で解析し、miR-135a-3pの臨床的意義を確認しました。そして、細胞株へ遺伝子導入し、腫瘍増殖抑制の確認を行うことで生物学的意義も明らかにしました。miR-135a-3pは卵巣癌の予後を予測するバイオマーカーであり、治療標的分子である可能性も示唆されました。

研究成果の概要(英文)：Ovarian cancer is the most lethal gynecologic malignancy. Recently, several molecularly targeted anticancer agents have been developed for ovarian cancer; however, its prognosis has remained extremely poor. In this study, to identify microRNAs involved in the progression of ovarian cancer we analyzed serum microRNAs in patients with ovarian cancer using microRNA array and qRT-PCR and examined the anticancer properties of microRNA expression in ovarian cancer cells. In patients with ovarian cancer, high amount of miR-135a-3p in serum samples was significantly associated with favorable clinical prognosis. In SKOV-3 and ES-2 human ovarian cancer cells, enhanced expression of miR-135a-3p induced drug sensitivity to cisplatin and paclitaxel and suppressed cell proliferation and xenograft tumor growth. These findings suggest that miR-135a-3p may be considered as a biomarker and a therapeutic agent in ovarian cancer.

研究分野：医学、分子生物学

キーワード：卵巣癌 バイオマーカー HB-EGF BK-UM miRNA miR-135a-3p

1. 研究開始当初の背景

近未来、本邦では男性の2人に1人、女性の3人に1人が悪性腫瘍で死亡することが報告されています。このように急増する悪性腫瘍の撲滅に向けて、悪性腫瘍発症予防や早期診断法の確立とともに標的治療薬の開発に大きな期待が寄せられています。標的治療薬は、血液腫瘍の場合には治療症例における治療標的分子の評価が容易なことから臨床的に著効を示す場合が数多く報告されています。一方、固形腫瘍における標的治療の場合には、症例における標的分子の評価が困難であることから、治療の適応の診断が困難となり、十分な有効性を示すことが難しくなっています。このような背景から、標的治療薬による創薬開発には、その治療適応を診断する方法の開発が必須です。悪性腫瘍の一つである卵巣癌は、近年急増している腫瘍で、手術療法とタキサン系とプラチナ系抗癌剤による化学療法が標準治療です。しかし、卵巣癌はその70%が再発し死亡する致死性の高い疾患で、現行の核酸アナログに代表される抗癌剤や近年開発された標的治療薬では予後の改善は期待できず新たな治療薬とともにその治療適応を診断する検査法の開発が切望されています。

HB-EGF は上皮系増殖因子ファミリーに属する細胞増殖因子です。近年、申請書からは HB-EGF が卵巣癌・乳癌・胃癌などの悪性腫瘍で発現が亢進し、その発現を抑制することで腫瘍形成能が著明に抑えられることから、これらの悪性腫瘍の治療の標的分子であること報告しています。現在、申請者らを含め幾つかの製薬企業により世界的に創薬開発が行われています。申請者らは、HB-EGF 抑制標的治療薬 BK-UM (CRM197) を用いた第 I 相臨床試験及び臨床研究より、血中 HB-EGF 高値の症例は抗がん剤耐性で予後不良で BK-UM 投与

により血中 HB-EGF 値は抑制され、抗がん剤による抗腫瘍効果が増強することを明らかにしています。一方で、血中 HB-EGF 値が低値にもかかわらず BK-UM が有効に作用する症例が存在することも認めています。また、HB-EGF の組織内 mRNA 発現量や血中 HB-EGF 値は、卵巣癌症例の臨床的予後とも相関することが明らかとなっています。このような研究背景から、HB-EGF とともに患者の血清や組織内の HB-EGF 関連分子を測定することができれば、BK-UM 治療により著明な抗腫瘍効果を示す症例を診断することが可能となります。すなわち、手術前や化学療法などの治療経過において BK-UM の治療適応を診断する検査法が確立できれば、悪性腫瘍患者の予後改善とともに医療経費削減を目指す医療イノベーションを推進できると期待できます。

2. 研究の目的

本邦では悪性腫瘍は急増し、国民の健康を守るため、新たな治療の開発は急務です。このような社会背景のなか、申請者らは、ヘパリン結合型増殖因子 HB-EGF が卵巣癌、乳癌、胃癌などの治療標的分子であることを世界で初めて証明し、HB-EGF 特異的抑制剤 BK-UM の創薬開発を行っています。BK-UM は、第 I 相臨床試験より高い安全性と POC(Proof Of Concept)を示し有効性が期待できる薬剤として、現在全国5大学で第 II 相臨床試験を行っています。これまでの臨床研究より、血中や組織で発現する HB-EGF は、臨床的予後を大きく反映することを証明してきました。したがって、BK-UM の治療効果を診断することは可能で、治療診断薬の開発は癌患者の予後改善とともに医療経費削減を齎せます。そこで、本研究の目的は BK-UM による創薬開発にともなう治療適応を診断するミニアレイ(コンパニオン診断薬)を作製し医療

イノベーションを推進することです。

3. 研究の方法

本研究では、期間中に卵巣癌発症により獲得する生体内の分子情報を全て治療前に把握して、BK-UM 治療の選択を診断する検査方法の確立を目指すことです。そのために、研究を二つの方向から研究を推進します。一つは、血清中に発現する microRNA をアレイ解析を通して HB-EGF と関連する分子を探索・同定します。もう一つは、細胞株を用いて HB-EGF 発現亢進するストレス環境下で作用する HB-EGF 関連遺伝子をアレイ解析にて探索・同定します。同定された遺伝子群の発現を血清や組織で確認して、臨床的予後、HB-EGF 発現量と比較検討して BK-UM 治療の選択を診断する検査方法としてミニアレイ作製に選定します。

HB-EGF の発現亢進に関与する分子は、十分に解明されていません。HB-EGF と関連して変動する分子を同定し、生体内で評価することができれば、著明な抗腫瘍効果が期待される症例を診断できます。そこで、HB-EGF 標的治療薬 BK-UM の治療適応を診断するミニアレイ（コンパニオン診断薬）として（1）血清中 microRNA 解析により診断する方法（2）癌組織から核酸を抽出して診断する方法、とを確立するための分子情報の獲得を目指します。

細胞株からの探索：

卵巣癌細胞株（MCAS、ES2 細胞）を三次元に培養し立体構造をとることで二次元培養と比較し HB-EGF の発現が著明に亢進します。そこで、2 種類の細胞株で共通して立体構造を形成することで細胞培養上清中に発現が 2 倍以上に亢進する microRNA 及び BK-UM 添加し発現が抑制される microRNA を同定しています。12 種類の卵巣癌細胞株における細胞内 HB-EGF の発現とともに細胞培養上清中 microRNA

のアレイ発現を解析し、継続して細胞上清中に発現する microRNA を探索します。

ヒト血清からの探索：

完全切除可能であった初発卵巣癌症例における手術治療前、治療後の血中 HB-EGF 値の低下を示した 98 例の症例における治療前の血清中 micro RNA array を行います。

次に、細胞株及びヒト血清を用いて探索した microRNA の共通性について解析します。解析の結果により、探索された microRNA については標準治療に不応性・抵抗性を示した卵巣癌 30 例の初発時の血清と感受性を示した卵巣癌 30 例の初発時の血清の microRNA の Array 解析を追加します。

4. 研究成果

細胞株からの検索により、HB-EGF 特異的阻害剤 BK-UM を添加し、細胞上清中で有意に発現が上昇した 5 つの miRNA を明らかにしました。(miR-92a, miR-23a, miR-1299, miR-1246, miR-1290, miR-630)。さらにヒト血清を対象にした解析においては、miR-135a-3p が予後不良卵巣癌患者において有意に発現が低下していることを明らかにしました。さらに、miR-135a-3p は良性卵巣腫瘍や正常卵巣患者の血清では有意に発現が上昇し、反対に卵巣癌患者の血清では発現が低下していることも明らかにしております。続いて、HB-EGF 値を基準に、HB-EGF 高値群で有意に発現が上昇する 5 つの miRNA(miR-23a-3p, miR-1290, miR-1915-5p, miR-4276, miR-5096)を同定しました。そして、HB-EGF が高値、予後不良群で有意に発現が低下する 5 つの miRNA(miR-24-3p, miR-296-3p, miR-920, miR-4462, miR-6717-5p)を明らかにしています。これらの miRNA のプラスミドベクターを作製し、in vitro 解析を行っています。

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 4 件)

1. Fukagawa S, Miyata K, Yotsumoto F, Kiyoshima C, Nam SO, Anan H, Katsuda T, Miyahara D, Murata M, Yagi H, Shirota K, Yasunaga S, Kato K, Miyamoto S, MicroRNA-135a-3p as a promising biomarker and nucleic acid therapeutic agent for ovarian cancer. *Cancer Science*, 108, 2017, 886-896. (査読あり)
2. Miyamoto S, Yotsumoto F, Ueda T, Fukami T, Sanui A, Miyata K, Nam SO, Fukagawa S, Katsuta T, Maehara M, Kondo H, Miyahara D, Shirota K, Yoshizato T, Kuroki M, Nishikawa H, Saku K, Tsuboi Y, Ishitsuka K, Takamatsu Y, Tamura K, Matsunaga A, Hachisuga T, Nishino S, Odawara T, Maeda K, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Ohishi M, Hikita T, Mizushima H, Iwamoto R, Mekada E: BK-UM in patients with recurrent ovarian cancer or peritoneal cancer: a first-in-human phase-I study. *BMC Cancer* , 17(1), 2017, 89, DOI 10.1186/s12885-017-3071-5, 2017. (査読あり)
3. Nam SO, Yotsumoto F, Miyata K, Fukagawa S, Yamada H, Kuroki M, Miyamoto S, Warburg effect regulated by amphiregulin in the development of colorectal cancer. *Cancer Medicine*, 4, 2015 ,

575-587), (査読あり)

4. Nam SO, Yotsumoto F, Miyata K, Souzaki R, Taguchi T, Kuroki M, Miyamoto S: Validity of HB-EGF as Target for Human Neuroblastoma Therapy, *Anticancer Research*, 35, 2015, 4433-4440, (査読あり)

〔学会発表〕(計 9 件)

1. HB-EGF 特異的阻害剤(BK-UM)の静脈内投与による有効性の検討について、口頭、深川 怜史、宮本 新吾、第 20 回バイオ治療法研究会学術集会、2016 年 12 月 10 日
2. HB-EGF に関連した卵巣癌予後予測因子としての microRNA の検索について、ポスター、清島 千尋、深川 怜史、宮本 新吾、第 75 回日本癌学会学術集会、2016 年 10 月 6 日
3. Identification of microRNA as a biomarker of ovarian cancer prognosis 卵巣癌の予後を予測する microRNA の同定 / 深川 怜史、宮田 康平、清島 千尋、四元 房典、安永 晋一郎、宮本 新吾 - 第 75 回癌学会学術総会 (2016 年 10 月 6 日~8 日、横浜)
4. 卵巣癌の予後予測因子としての microRNA-135a / 深川 怜史、宮田 康平、清島 千尋、四元 房典、安永 晋一郎、宮本 新吾 - 第 15 回日本婦人科がん分子標的研究会 (2016 年 8 月 19~20 日、札幌)
5. HB-EGF (Heparin Binding-Epidermal Growth Factor) に関連した卵巣癌予後予測について、ポスター、清島 千尋、深川 怜史、宮本 新吾、第 68 回日本産婦人科学会学術集会、2016 年 4 月 21 日

6. Identification of microRNA as a biomarker in primary ovarian cancer / Fukagawa, S et al. — 第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会(2016年4月21日～24日、東京)
7. 卵巣癌予後予測因子としての microRNA の検索 / 深川怜史、宮田康平、南星旭、四元房典、宮本新吾 - 日本産科婦人科学会第 67 回学術講演会 (2015年4月9～12日、横浜)
8. Antitumor effect of intravenous injection of an HB-EGF inhibitor, CRM197, in triple negative breast cancer / Fukagawa S, Nam SO, Yotsumoto F, Miyata K, Kuroki M, Miyamoto S — 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2014, 9.27 ~ 27、Yokohama)
9. Validation of antitumor effect by intravenous administration of CRM197 in triple negative breast cancer / Fukagawa S, Nam SO, Yotsumoto F, Miyata K, Kuroki M, Miyamoto S – 9th INTERNATIONAL CONFERENCE OF ANTICANCER RESEARCH (2014, 10.6 ~ 10、GREECE)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：卵巣癌の予後検査・診断方法
 発明者：宮本新吾、宮田康平
 権利者：同上
 種類：特許
 番号：特願 2015-080452
 出願年月日：2016年4月9日
 国内外の別：国内

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮本 新吾 (MIYAMOTO Shingo)
 福岡大学 医学部産婦人科学教室 教授
 研究者番号：40209945

(2)研究分担者

鍋島 一樹 (NABESHIMA Kazuki)
 福岡大学 医学部病理学教室 教授
 研究者番号：40189189
 八木 裕史 (YAGI Hiroshi)
 九州大学 医学部産婦人科学教室 助教
 研究者番号：70623552
 四元 房典 (YOTSUMOTO Fusanori)
 福岡大学 医学部産婦人科学教室 講師
 研究者番号：40533089

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

深川 怜史 (FUKAGAWA Satoshi)
 福岡大学 医学部産婦人科学教室 助教