

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462515

研究課題名(和文) 子宮体癌・卵巣癌においてアポトーシスを誘導する新規分子標的治療法の探索

研究課題名(英文) Development of novel molecular targeted therapies, inducing apoptotic cell death, in endometrial and ovarian carcinomas

研究代表者

織田 克利(Oda, Katsutoshi)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30359608

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)：我々は子宮体癌と卵巣癌(特に明細胞腺癌)において、分子生物学的なサブグループおよび治療標的候補分子を同定し、新規分子標的治療薬の有効性について新たな知見を得た。

1. 子宮体癌、PI3K経路を阻害する薬剤の抗腫瘍効果を増強する治療法を探索し、MAPK経路阻害剤もしくは放射線照射との併用で、相乗的な効果が得られることを示した。PI3K/mTOR経路において、HIF-1/VEGFの活性化が腫瘍増殖に重要であることを見出した。

2. 卵巣明細胞癌において、ゲノム解析により予後不良なサブグループを明らかとした。MDM2高発現が予後不要因子であり、MDM2を阻害する治療薬が抗腫瘍効果を示すことを報告した。

研究成果の概要(英文)：We identified molecular subtypes and candidate molecular-targeted therapies in endometrial and ovarian (mainly clear cell histology) cancers. Furthermore, we revealed their anti-tumor effects in these cancers.

1. We found that either a MAPK inhibitor or ionizing radiation synergistically enhanced anti-tumor effect by a PI3K pathway inhibitor (dual PI3K/mTOR inhibitor) in endometrial cancer cells. We showed that HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway plays an essential role in the cell proliferation of endometrial cancer cells and that HIF-1 $\alpha$ /VEGF activity is dependent on activation of the PI3K/mTOR pathway.

2. We revealed a poor prognostic subgroup in ovarian clear cell carcinomas, using genome-wide analyses, including single nucleotide polymorphism arrays and expression arrays. We reported that over-expression of MDM2 is associated with poor prognosis and that inhibiting MDM2 showed anti-tumor effect in ovarian clear cell carcinoma cells.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮体癌 卵巣癌 分子標的治療 ゲノム解析 バイオマーカー PI3K MDM2 TP53

## 1. 研究開始当初の背景

子宮体癌・卵巣明細胞癌は、いずれもがん抑制遺伝子 TP53 の変異頻度が低く、Ras-PI3K (フォスファチジルイノシトール3-キナーゼ) 経路を活性化する PIK3CA の活性型遺伝子変異の頻度が高いという共通点が存在する。しかしながら、子宮体癌では臨床応用されている分子標的治療薬はなく、卵巣明細胞癌においても組織型に着目した分子標的治療法の開発は進んでいなかった。研究代表者らは、2013年度までの研究において、子宮体癌・卵巣明細胞癌ともに、PI3K 経路の阻害薬が抗腫瘍効果を示すことを明らかとてきた。その一方、様々な癌種における臨床試験において、PI3K 経路阻害剤単独での治療効果は十分とはいえず、同経路阻害剤の臨床応用は、腎細胞癌等における mTOR (mammalian target of rapamycin) 阻害剤など、限定的なものであった。

PI3K 経路阻害剤の抗腫瘍効果を高める方法、変異のない TP53 経路を活用した治療戦略については知見が乏しい状況であった。

## 2. 研究の目的

子宮体癌、卵巣明細胞癌の各々について、PI3K 経路、TP53 経路に着目して、新規の治療戦略を確立することを目指した。

子宮体癌では、PI3K 経路阻害剤との併用で相乗的な抗腫瘍効果を示す治療法とそのバイオマーカーを探索することを目的とした。

卵巣明細胞癌では、染色体コピー数異常や発現アレイ等のゲノムの特徴を明らかとし、TP53 を不活化させる分子として MDM2 に着目し、MDM2 阻害剤 (MDM2 と TP53 の結合を阻害する薬剤) の抗腫瘍効果を明らかとすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 子宮体癌細胞株 (16 株) と卵巣明細胞癌株 (7 株) を解析に用いた。PI3K 経路阻害剤として、PI3K/mTOR 同時阻害剤 (SAR245409, NVP-BE2235)、MAPK 経路阻害剤として、MEK1/2 阻害剤 (U0126, pimasertib) を用いた。MDM2 阻害剤は、Nutlin-3a, RG-7112 を用い、それぞれ細胞株に添加し、増殖抑制や細胞死に関わる Phenotype を観察した。皮下移植ヌードマウスモデルを用いて、in vivo における効果も検証した。子宮体癌株の実験では、放射線照射もあわせて行った。卵巣明細胞癌については、倫理委員会の承認、インフォームド Consent のもとで、臨床検体を用いた染色体コピー数解析 (SNP アレイ) 発現アレイ解析 (マイクロアレイ) も施行した。

## 4. 研究成果

### 【1】子宮体癌における研究成果

- (1) 子宮体癌細胞株において、PI3K/mTOR 同時阻害剤 (SAR245409) に、MAPK 経路阻害剤 pimasertib を併用すると、12 株中 6 株で相乗的に抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。併用により細胞周期 G1 停止が強く誘導されており、併用療法における感受性は pimasertib 単剤での抗腫瘍効果と関連していたことより、PI3K 経路のみならず、MAPK 経路の活性化も子宮体癌の増殖促進に強く関与している可能性を示した (図 1) (Gynecol Oncol, 2015)。

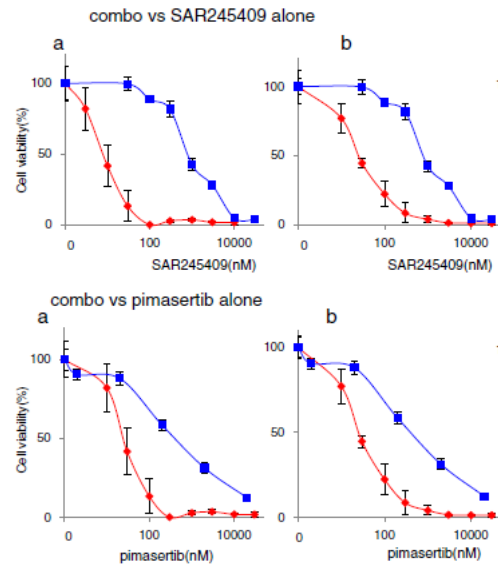


図 1 子宮体癌株 (AN3CA) における SAR245409 または pimasertib 単剤または併用の場合の細胞増殖抑制効果

- (2) 子宮体癌細胞株 8 株に放射線照射を行ったところ、TP53 変異陰性株で放射線感受性が高いことが明らかとなった (図 2)。放射線照射を行うと、PI3K 経路が強く活性化され、PI3K/mTOR 同時阻害剤 (NVP-BE2235) を用いることにより、放射線感受性を増強する効果を有することを示した。一方、MAPK 経路阻害剤 (U0126) を併用しても、放射線感受性の有意な増強は認められなかった (図 3)。さらに、放射線感受性を規定する因子として、PI3K/mTOR 経路の下流にあたる HIF (Hypoxia Inducible Factor) -1 / VEGF (vascular endothelial growth factor) 経路の活性化が関与していることを明らかとした (Gynecol Oncol, 2015)。

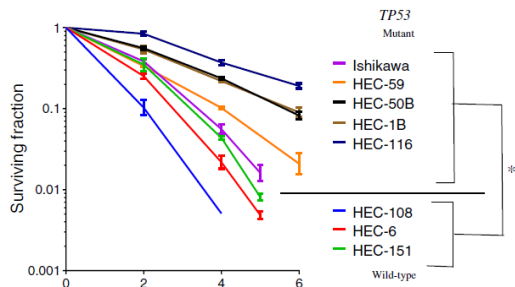


図 2 子宮体癌株における放射線感受性と TP53 変異の有無

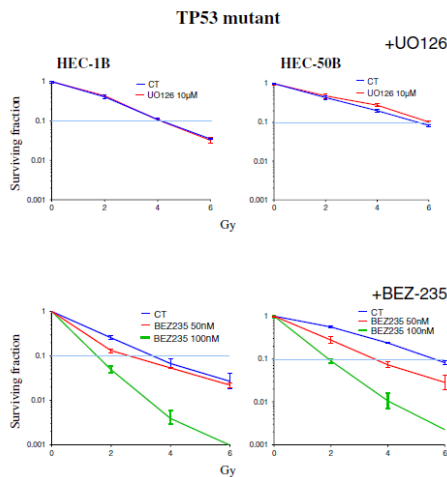


図 3 TP53 変異子宮体癌株における放射線照射と PI3K 経路阻害剤 BEZ235 または MAPK 経路阻害剤 UO126 の併用

## 【2】 卵巣明細胞癌における研究成果

- (1) 卵巣明細胞癌におけるゲノム解析  
臨床検体を用いた解析により、卵巣明細胞癌では、染色体コピー数異常が漿液性癌よりも少ないこと、Focal ではなく、腕全体のコピー数異常の頻度が高いことを明らかとした。また、発現アレイ解析により、卵巣明細胞癌におけるクラスター解析結果を示し、予後不良なサブグループが存在することを明らかとした (PLoS One, 2015)。
- (2) 卵巣明細胞癌における MDM2 阻害剤の抗腫瘍効果  
卵巣明細胞癌臨床検体において、MDM2 が有意に高発現しており、予後不良因子であることを明らかとした (図 4)。卵巣明細胞癌 7 株に MDM2 阻害剤 RG-7112, Nutlin-3a を添加したところ、TP53 変異陰性株のみで濃度依存的な抗腫瘍効果が認められた。同阻害剤によりアポトーシスが誘導されることも明らかとなった。さらに、ヌードマウスを用いた皮下移植

モデルにおいて、RG-7112 は有意に腫瘍増殖を抑制し、in vivo においても、有望な治療標的となりうることを明らかとした (図 5) (Oncotarget, 2016)。

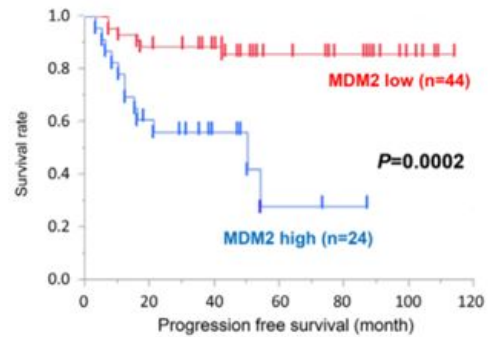


図 4 . 卵巣明細胞癌における MDM2 発現と予後. MDM2 高発現では有意に予後不良であった。

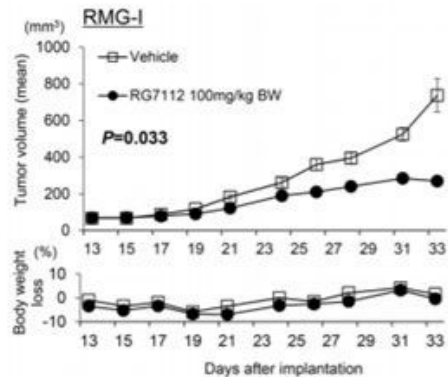


図 5 . 卵巣明細胞癌株における MDM2 阻害剤 RG-7112 による抗腫瘍効果。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 24 件) すべて査読有 (主なもののみ抜粋)

1. Ikeda Y, Oda K\*, Aburatani H, Kawana K, Osuga Y, Fujii T: Non-diethylstilbestrol exposed vaginal clear cell adenocarcinoma has a common molecular profile with ovarian clear cell adenocarcinoma: A case report. *Gynecol Oncol Rep* 10: 49-52, 2014
2. Inoue T, Oda K\*, Arimoto T, et al: Xanthogranulomatous inflammation of the perimetrium with infiltration into the uterine myometrium in a postmenopausal woman: a case report. *BMC Womens Health* 14:82(1-4), 2014
3. Oda K\*, Ikeda Y, Maeda D, et al: Huge pyogenic cervical cyst with endometriosis, developing 13 years after myomectomy at the lower uterine segment: a case report. *BMC Womens Health* 14:104(1-4), 2014

4. Fukuda T, Shirane A, Wada-Hiraike O, Oda K, et al: HAND2-mediated proteolysis negatively regulates the function of estrogen receptor. *Mol Med Rep* 12:5538-5544, 2015
5. Ikeda Y, Hasegawa K, Kurosaki A, Miyara A, Hanaoka T, Shintani D, Imai Y, Nishikawa T, Oda K, Fujiwara K: The Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA) as a Predictive Marker of Peritoneal Dissemination in Epithelial Ovarian Cancer Patients. *Oncol Res Treat* 38:276-281, 2015
6. Fukuda T, Wada-Hiraike O, Oda K, et al: Putative tumor suppression function of SIRT6 in endometrial cancer. *FEBS Lett* 589:2274-2281, 2015
7. Fukuda T, Oda K\*, Wada-Hiraike O, et al: The anti-malarial chloroquine suppresses proliferation and overcomes cisplatin resistance of endometrial cancer cells via autophagy inhibition. *Gynecol Oncol* 137:538-545, 2015
8. Uehara Y, Oda K\*, Ikeda Y, et al: Integrated copy number and expression analysis identifies profiles of whole-arm chromosomal alterations and subgroups with favorable outcome in ovarian clear cell carcinomas. *PLoS One* 10:e0128066 (1-18), 2015
9. Miyasaka A, Oda K\*, Ikeda Y, et al: PI3K/mTOR pathway inhibition overcomes radioresistance via suppression of the HIF1-alpha/VEGF pathway in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 138:174-180, 2015
10. Inaba K, Oda K\*, Ikeda Y, et al: Antitumor activity of a combination of dual PI3K/mTOR inhibitor SAR245409 and selective MEK1/2 inhibitor pimasertib in endometrial carcinomas. *Gynecol Oncol* 138:323-31, 2015
11. Ikeda Y, Oda K\*, Ishihara H, et al: Prognostic importance of CDK4/6-specific activity as a predictive marker for recurrence in patients with endometrial cancer, with or without adjuvant chemotherapy. *Br J Cancer* 113:1477-83, 2015
12. Tajima S, Kawabe A, Nagasaka K, Oda K, Kawana K, Fukayama M: A case of successful detection of disseminated gastrointestinal stromal tumors by ascites smear cytology using cell block preparation with DOG1 immunostaining. *Diagn Cytopathol* 44:137-140, 2016
13. Suzuki K, Nagasaka K, Oda K, et al: A case of lymphangioliomyomatosis associated with endometrial cancer and severe systemic lupus erythematosus. *BMC Cancer* 16:390(1-5), 2016
14. Matsumoto Y, Miyamoto Y, Cabral H, Matsumoto Y, Nagasaka K, Nakagawa S, Yano T, Maeda D, Oda K, et al: Enhanced efficacy against cervical carcinomas through polymeric micelles physically incorporating the proteasome inhibitor MG132. *Cancer Sci* 107:773-781, 2016
15. Fukuda T, Oda K\*, Wada-Hiraike O, et al: Autophagy inhibition augments resveratrol-induced apoptosis in Ishikawa endometrial cancer cells. *Oncol Lett* 12:2560-2566, 2016
16. Oda K\*, Koga K, Hirata T, et al: Risk of Endometrial Cancer in Patients with a Preoperative Diagnosis of Atypical Endometrial Hyperplasia Treated by Total Laparoscopic Hysterectomy. *Gynecol Minim Invasive Ther* 5:69-73, 2016
17. Chuwa AH, Sone K, Oda K\*, et al: Significance of survivin as a prognostic factor and a therapeutic target in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 141:564-569, 2016
18. Inaba K, Oda K\*, Aoki K, et al: Synergistic antitumor effects of combination PI3K/mTOR and MEK inhibition (SAR245409 and pimasertib) in mucinous ovarian carcinoma cells by fluorescence resonance energy transfer imaging. *Oncotarget* 7:29577-29591, 2016
19. Makii C, Oda K\*, Ikeda Y, et al: MDM2 is a potential therapeutic target and prognostic factor for ovarian clear cell carcinomas with wild type TP53. *Oncotarget* 7:75328-75338, 2016
20. Oki S, Sone K, Oda K, Hamamoto R, Ikemura M, Maeda D, Takeuchi M, Tanikawa M, Mori-Uchino M, Nagasaka K, Miyasaka A, Kashiyama T, Ikeda Y, Arimoto T, Kuramoto H, Wada-Hiraike O, Kawana K, Fukayama M, Osuga Y, Fujii T: Oncogenic histone methyltransferase EZH2: A novel prognostic marker with therapeutic potential in endometrial cancer. *Oncotarget* (in press)
21. Oda K, Ikeda Y, Kawana K, Osuga Y, Fujii T: mTOR Signaling in Endometrial Cancer: From a Molecular and Therapeutic Point of View *Curr Obstet Gynecol Rep* 4:1-10, 2015 (Review)
22. Arimoto T, Kawana K, Adachi K, Ikeda Y, Nagasaka K, Tsuruga T, Yamashita A, Oda K, et al: Minimization of curative surgery for treatment of early cervical cancer: a review. *Jpn J Clin Oncol* 45:611-616, 2015 (Review)
23. Oda K, Ikeda Y, Kashiyama T, et al: Characterization of TP53 and PI3K

signaling pathways as molecular targets in gynecologic malignancies. *J Obstet Gynaecol Res* 42:757-762, 2016 (Review)

24. Oda K, Ikeda Y, Kashiyama T, et al: Perspectives on targeting the phosphatidylinositol 3-kinase pathway for personalized medicine in endometrial and ovarian cancers. *Personalized Medicine Universe* 5:3-7, 2016 (Review)

〔学会発表〕(計 27 件)(主な英語発表のみ抜粋)

【招請講演】

1. Oda K: Molecular Biology of low-grade serous carcinomas. Ovarian Rare Tumors Conference (Young Investigator Seminar): **Fifth Ovarian Cancer Consensus Conference of the Gynecologic Cancer InterGroup (GCIG)**, 慈恵大学一号館(東京都・港区), Nov, 2015
2. Oda K: Molecular-targeted therapies and genomic characterization in gynecologic cancers. **The 14th Annual Meeting of JSMO (Japanese Society of Medical Oncology)**, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市), Jul, 2016  
【口頭】
3. Chuwa AH, Sone K, Oda K, et al: Survivin inhibitor-YM155 is a novel targeted therapy for endometrial cancer. **The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association**, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), Oct, 2015
4. Nishijima A, Asada K, Oda K, et al: Cell free DNA in peripheral blood might reflect tumor heterogeneity in ovarian carcinomas. **The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association**, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), Oct, 2015
5. Oda K, et al: The number of mutations and mutational signatures in ovarian high-grade serous carcinomas. **The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association**, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), Oct, 2016
6. Tanikawa M, Hiraike O, Takeuchi M, Honjyo H, Oda K, et al: mRNA splicing is an emerging player of DNA damage response and homologous recombination repair. **The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association**, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), Oct, 2016
7. Nishijima A, Oda K, et al: Whole-exome sequencing of 75 ovarian clear cell carcinomas identifies a subgroup without mutations in ARID1A and PIK3CA. **The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association**, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), Oct, 2016
8. Takeuchi M, Oda K, Sone K, et al:

Anti-tumor effect of inhibition of DNA damage response proteins, ATM and ATR, in endometrial cancer cells. **68th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology**, 東京国際フォーラム(東京都・千代田区), Apr, 2016

9. Makii C, Oda K, et al: Combination of MDM2 inhibitor and PI3K/mTOR inhibitor showed synergistic anti-tumor effect in ovarian clear cell carcinomas. **68th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology**, 東京国際フォーラム(東京都・千代田区), Apr, 2016

【示説】

10. Miyasaka A, Oda K, et al: Antitumor effect of a poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor in endometrial carcinoma cell lines. **105th AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting**, San Diego, CA, USA, Apr, 2014
11. Ikeda Y, Oda K, et al: CDK4/6 Specific Activities as a Biomarker for Prognosis and Chemo-Sensitivity in Endometrial Cancer. **2014 ACOG Annual Clinical Meeting**, Chicago, IL, USA, Apr, 2014
12. Ikeda Y, Oda K, et al: Aberrant expression of beta-catenin and cyclin D1 in endometrial cancer. **105th AACR Annual Meeting**, San Diego, CA, USA, Apr, 2014
13. Asada K, Oda K, et al: Whole exome sequencing by next generation sequencer using cell free DNA from blood samples. **The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association**, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), Oct 2014
14. Asada K, Oda K, et al: Identification of genetic heterogeneity by whole exome sequencing using cell free DNA from blood samples. **106th AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting**, Philadelphia, PA, USA, Apr, 2015
15. Asada K, Oda K, et al: Tumor heterogeneity covered by circulating tumor DNA from blood sample. **The 11th International Workshop on Advanced Genomics**, 一橋大学 一橋講堂(東京都・千代田区), May, 2015
16. Fukuda T, Oda K, et al: The anti-tumor effect of antimalarial chloroquine on endometrial cancer cells is dependent on autophagy inhibition. **106th AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting**, Philadelphia, PA, USA, Apr, 2015
17. Fukuda T, Wada-Hiraike O, Oda K, et al: Regulation of autophagy and its potential as a therapeutic target in endometrial cancer cells. **67th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology**,

パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市), Apr, 2015

18. Asada K, Oda K, et al: Cell free DNA and ascites might reflect tumor heterogeneity in ovarian carcinomas. **The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association**, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市), Oct, 2015

18. Makii C, Oda K,: Anti-tumor effect of RG-7112, an inhibitor of p53-MDM2 interaction, in ovarian clear cell adenocarcinomas. **The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association**, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), Oct, 2015

19. Oki S, Sone K, Oda K, et al: The histone methyltransferase EZH2 is a novel target of anticancer therapy in endometrial cancer. **107th AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting**, New Orleans, LA, USA, Apr, 2016

20. Kashiyama T, Oda K, et al: Prognostic impact of ovarian preservation and hormonal therapy in low-grade endometrial stromal sarcomas. **68th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology**, 東京国際フォーラム (東京都・千代田区), Apr 2016

21. Sone K, Oda K, et al: The histone methyltransferase, SUV39H2, is a potent target of anti-cancer therapy in endometrial cancer. **68th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology**, 東京国際フォーラム (東京都・千代田区), Apr 2016

22. Nagasaka K, Oda K, et al: The usefulness of hysteroscopic inspection with transcervical resection (TCR) for endometrial malignancy. **68th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology**, 東京国際フォーラム (東京都・千代田区), Apr 2016

23. Chuwa AH, Sone K, Oda K, et al: Survivin inhibitor, Sepantronium bromide, is a potent, novel molecular targeted-therapy against endometrial cancer. **68th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology**, 東京国際フォーラム (東京都・千代田区), Apr 2016

24. Fukuda T, Oda K, et al: Regulation of autophagy and its potential as a therapeutic target in endometrial cancer cells. **68th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology**, 東京国際フォーラム (東京都・千代田区), Apr 2016

25. Oki S, Sone K, Oda K, et al: Histone methyl/demethyltransferases are novel targets of anti-cancer therapy in endometrial cancer. **68th Annual Congress**

**of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology**, 東京国際フォーラム (東京都・千代田区), Apr 2016

26. Tanaka T, Nagasaka K, Oda K, et al: Recurrence pattern in 80 cases of stage III/IV ovarian carcinomas with complete intraperitoneal cytoreduction. **68th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology**, 東京国際フォーラム (東京都・千代田区), Apr 2016

27. Asada K, Oda K, Hasegawa K, et al: Number of somatic mutations by whole-exome sequencing is associated with both surgical outcome and chemosensitivity in high-grade ovarian serous carcinoma. **68th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology**, 東京国際フォーラム (東京都・千代田区), Apr 2016

〔図書〕(計 7 件)

1. Fujiwara K, Oda K, Takano M, Matsumura N: Chapter 37. Clear Cell Carcinoma of the Ovary. Textbook of Uncommon Cancer. Blackwell Publishing (Holdings) Ltd. NJ, USA

2. **織田克利**: 子宮体癌. プリンシプル産科婦人科学 1-婦人科編, 武谷雄二, 上妻志郎, 藤井知行, 大須賀穰 監修, Medical View社, 東京, 374-375, 538-549, 850-852, 853, 860-861, 862-864 (計 6 件), 2014

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: MDM2 as a therapeutic potential target and prognostic factor for ovarian clear cell carcinomas

発明者: **織田克利**, 牧井千波

権利者: **織田克利**, 牧井千波

種類: 特許願

番号: 特願 2016-143963

出願年月日: 2016年7月22日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://go.umin.jp/research.html>

<http://plaza.umin.ac.jp/kyobgyn/recruit/about/report.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

織田 克利 (ODA, Katsutoshi)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 30359608

(2) 研究分担者 ( 0 )

(3) 連携研究者 ( 0 )