

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861343

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌における新規HIF-1活性化阻害薬の開発ならびに有効性

研究課題名(英文) Development of the HIF-1-specific inhibitor in ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

宮澤 昌樹 (MIYAZAWA, Masaki)

東海大学・医学部・特定研究員

研究者番号：30624572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： これまでに低酸素誘導因子HIF-1の核移行についてはあまり知られていなかったが、近年、ヒストン脱アセチル化酵素-7(HDAC7)がHIF-1の核移行に重要な役割を果たしていることが報告された。我々は、上皮性卵巣癌の中でもHIF-1が高発現している明細胞腺癌に着目し、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。

その結果、HDAC7は明細胞腺癌で高発現しており、HDAC強陽性例では予後不良な傾向を認めた。また、HDAC阻害剤VorinostatはHIF-1、VEGFの発現を抑制し、HDAC阻害剤は新たな明細胞腺癌の治療薬として可能性が期待された。

研究成果の概要(英文)： Histone Deacetylase (HDAC) is an enzyme deacetylating the histone which is a main constitution factor in chromatin structure and play an important role in genetic transcription control. HDAC is involved in intracellular signal transduction and the control of the cell cycle and in late years attracts attention as target molecule of the cancer therapy. In this study, focusing on HDAC7, we analyzed their immunohistochemical expression in ovarian cancer and assessed their mRNAs expression in 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 anti-cancer effect of HDI. As a result, it was shown that the inhibitory effect of HDI on HDAC7 and HIF-1 varies among cell lines. We suppose that the response to HDI may vary greatly among patients with ovarian cancer and that the ovarian cancer with high expression of HDAC7 may be a suitable candidate for HDI treatment.

研究分野：医歯薬学

キーワード：HIF-1 卵巣明細胞腺癌 HDAC7 シリピニン Vorinostat HIF-1活性化阻害剤

1. 研究開始当初の背景

一般的に悪性腫瘍は、無秩序な増殖能を有することで自らをより低酸素な環境へと導き、これに順応するために複雑な分子機構を発動しながら微小環境の恒常性を維持し、浸潤、転移性に進展していくものと考えられている。低酸素環境下で機能する分子には多くの腫瘍において共通性がある一方で、しばしば様々なシグナル伝達因子やホルモンの影響を受け、その微小環境に即した個々の因子の発現が調節されていることが推察される。また、腫瘍の発生機序を鑑みると同様の部位(発生母地)から発生をしながら、実際に病理学的には組織型や組織構築が異なっている。これは、その発生に関与する様々な素因(遺伝子変異、ウイルス感染など)を通じ構築された腫瘍が、さらに様々な微小環境形成因子の発現によって形づけられ、個々の組織型を構築しているものと考えられる。悪性腫瘍の微小環境は血中の酸素やグルコースの濃度、pHなどにより特徴づけられており、腫瘍細胞の活発な増殖が微細な新生血管を惹起するものの、形成される血管が未熟かつ無秩序な形成をすることで、しばしば腫瘍には酸素不十分な虚血領域が生じる。その結果として、悪性度の高い腫瘍では広範に出血や壊死(necrosis)を来しやすいものと考えられる。

癌の微小環境を維持するための中心的分子、さらに微小環境研究におけるマスター因子としては1992年にSemenzaらによって発見された「低酸素誘導因子 Hypoxia-Inducible Factor-1(HIF-1)」があまりにも有名である(Mol Cell Biol. 12: 5447-54, 1992)。これまでに HIF-1 はその名のとおり、細胞の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)、あるいは赤血球増生を促す Erythropoietin (EPO)などを誘導し個々の微小環境への適応を図っていることが報告されている。ここ10年ほどで“低酸素分子生物学”が急速に発展し、VEGF、GLUT-1、EPOなどを筆頭に数千種類の遺伝子が HIF-1 によって影響、惹起されることが報告されてきている(Nat Rev Cancer. 3: 721-32, 2003)。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 とユニットを形成し HREs に結合し転写を促している。HIF-1 は HIF-1 α ・HIF-1 β から構成され、HIF-1 α は恒常的に核内に発現している。HIF-1 β は酸素依存性に細胞質に発現しており、通常酸素濃度下では、E3 ユビキチンリガーゼが von Hippel Lindau タンパク(pVHL)を介して結合することでユビキチン化が起こり、プロテアソームにより速やかに分解される。しかし一転して低酸素に陥ると、この分解経路が停止して細胞質に HIF-1 の

蓄積が生じ、速やかに核へ移行し、HIF-1 と結合することで HIF-1 を形成し種々の遺伝子誘導に働く。

我々はこれまでに、上皮性卵巣癌においては HIF-1 の発現は細胞質では概ね認められるものの、核における発現は他の組織型に比して明細胞腺癌で有意に亢進していること(Oncol Rep: 19:111-6, 2008, Arch Gynecol Obstet. 277(6):539-46, 2008)、さらに HIF-1 は上皮性卵巣癌において、腫瘍径や腫瘍の大きさには相関せず、明細胞腺癌で有意に活性化していることも報告してきている (Arch Gynecol Obstet. 279: 789-96, 2009.)。また、明細胞腺癌における HIF-1 の制御機構について検討したところ、明細胞腺癌では、PI3K-Akt-mTOR シグナル系が亢進しており、mTORC1 のリン酸化は、HIF-1 mRNA の翻訳を通じ、HIF-1 の発現を亢進させていることも明らかにしている(Pathol Int. 59: 19-27, 2009.)。さらにこれらの結果から、明細胞腺癌における mTORC1 のリン酸化の阻害を通じた HIF-1 の制御に主眼を置き、検討を行ってきた。その結果、明細胞腺癌培養株において mTORC1 阻害剤 Rapamycin は HIF-1 ならびに VEGF を濃度依存的に抑制した(Acta His Chem. 40(5):139-42, 2007)。

また、Rapamycin 誘導体である Everolimus を用いたところ、明細胞腺癌で、mTORC1 の阻害を通じた HIF-1 シグナルの抑制のみならず、細胞周期を有意に停止させ、in vitro、in vivo において高い抗腫瘍効果を示した(Acta Histochem Cytochem. 44(2):113-8, 2011, J Obstet Gynaecol Res. 36(2):448-53, 2010, Pathol Int. 59:19-27, 2009)。

さらに治療への応用として明細胞腺癌においては Everolimus とプラチナ系抗癌剤の併用が最も高い抗腫瘍効果を得ることを証明した(Int J Gynecol Cancer. 23(7):1210-8, 2013)。

一方で、予後因子としての解析から、HIF-1 の核陽性所見と mTORC1 のリン酸化が著明な症例は予後不良であることも報告している(Int J Gynecol Cancer. 23(7):1210-8, 2013)。

これらの結果は、Japanese Gynecologic Oncology Group (JGOG:日本婦人科悪性腫瘍機構)でも、明細胞腺癌の新規治療法として高い評価を受け、JGOG3021 試験(EVEROCC Trial)として『再発・再燃卵巣明細胞腺癌に対する mTOR 阻害剤の第 II 相臨床試験』を計画し、申請者も TR 部門委員として、これまでの経験をもとに mTOR 阻害剤の有効なバイオマーカーの探索などに尽力したが、諸般の事情にて試験は中止となっている。

2. 研究の目的

mTORC1 阻害剤 (Everolimus・Temsirolimus)は腎細胞癌、乳癌など他の領域でも既に認可されてきているが、本薬剤のみならずシグナル伝達系阻害剤は、しばしば他のシグナルを増強するなど、治療効果として短期的効果は得られても、長期的効果が得

られにくいことが報告されている。また、これまでの我々の予備的検討からも、mTORC1 阻害剤は HIF-1 mRNA の翻訳を抑制はするものの、持続的な抑制効果は得られていない。一方で、これまでの長年の HIF-1 の研究の中で、HIF-1 の核移行についてはほとんど解明されていなかったが、近年、HIF-1 の核移行には核移行シグナルを有したヒストン脱アセチル化酵素 7(HDAC7)との複合体の形成が関与している可能性が報告された(Exp Mol Med. 41:849-57, 2010)。

そこで、本研究期間では、これまでの我々の研究結果を鑑みて、HIF-1 が高率に核へ移行、活性化している明細胞腺癌をターゲットに、

(1)HIF-1 の核移行シグナルにおける HDAC の役割ならびに機能解析

(2)HIF-1 の核移行のメカニズムと活性化機構の解明

(3)HIF-1 活性化阻害物質の探索とその効果についての検証

(4)HIF-1 の核移行の阻害を通じた新たな HIF-1 活性化阻害薬の開発に着目をし、研究を展開する。

即ち、本研究の最終目標としては、卵巣明細胞腺癌における新規 HIF-1 活性化阻害薬の開発ならびに有効性について明らかにし、本研究を通じた明細胞腺癌をはじめとする難治性卵巣癌の治療成績の向上と予後改善を目指す。

3. 研究の方法

(1)HIF-1 の核移行シグナルにおける HDAC の役割・機能解析と HIF-1 活性化機構の解明～明細胞腺癌における HDAC 酵素群発現のプロファイリング～

概要：これまでに IC(インフォームド Consent)の得られた明細胞腺癌症例(85 例)ならびに卵巣癌培養株(18 種類)を用いて、HDAC 酵素群の発現プロファイルについて検討する。HIF-1 と HDAC との関係性については、HDAC7 は HIF-1 の核移行と活性化を制御することが近年報告されてきている(Exp Mol Med. 41:849-57, 2010)ことから、これら 3 因子の発現ならびにこれまでの我々が検討してきた HIF-1 の発現、定量的に得られた活性型 HIF-1 量との相関について解析する。また、比較コントロールとして、当科が所有している、ICの得られた卵巣癌検体ならびに培養株を用いる(培養株については既に継代培養を行っておりいつでも使用可能である)。

解析手法：これらの各種抗体を用いたパラフィン切片を用いた免疫組織化学による解析を行った。

(2)HIF-1 活性化阻害物質候補の選択と効果についての検証

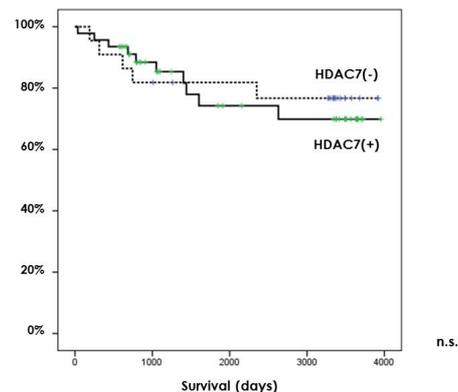
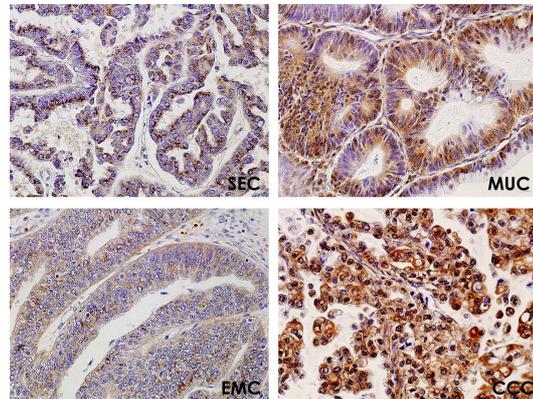
概要：既に我々は、これまでの報告から、HDAC 阻害剤(HDI)、シリピニンに HIF-1 活性化阻害効果があることを見出しているが、その作用機序については明らかになっていない。そこで、平成 26 年度の結果から、これらの阻

害剤候補がどの HDAC サブタイプ of 阻害効果により HIF-1 の活性化を阻害しているのかを検証する。

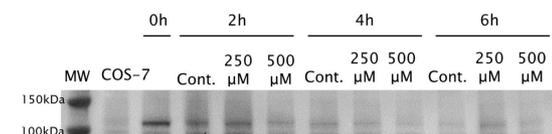
解析手法：in vitro において、既に我々が入手している HDI, シリピニンの 2 種類の阻害剤候補を用いて、濃度ならびに反応時間依存的に HDAC7 の発現を抑制し、HIF-1 の安定化ならびに活性化を阻害するのか検討する。併せて、HIF-1 の下流因子へ与える影響、細胞周期への影響、アポトーシス誘導効果についても検討し、HIF-1 活性化の阻害を通じた新たな抗腫瘍薬としての可能性について明らかにする。

4. 研究成果

HDAC7 は他の組織型に比して明細胞腺癌で高発現しており、HDAC7 陽性例では予後不良な傾向が認められた。



また in vitro 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 細胞にシリピニン投与後 2h, 6h において、シリピニン濃度依存的に HIF-1 のタンパク発現の減少が認められた。



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と、HDAC7 と HIF-1 の核移行のシリピニンとの関連や、HIF 関連因子への影響については、HDAC7 をノックアウトし解析する必要があると考えられた。

シリピニンは 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た。シリピニンはドイツでは「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、副作用も少ないことから、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期待される。

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. Matsui N, Kajiwara H, Morishita A, Iida T, Nakazawa K, Miyazawa M, Mikami M, Ogawa T, Nakamura N, Sato S. Use of epithelial-specific antigen for cytological diagnosis of glandular lesions in the uterine cervix. *Pathol Int.* 66(5):305-8.2016. 査読有
2. Tajima T, Miyazawa M, Hayashi M, Asai S, Ikeda M, Shida S, Hirasawa T, Iwamori M, Mikami M. Enhanced Expression of Hydroxylated Ceramide in Well-Differentiated Endometrial adenocarcinoma. *Oncol Lett.* in press: 2016. 査読有
3. Shida M, Yasuda M, Fujita M, Miyazawa M, Kajiwara H, Hirasawa T, Ikeda M, Matsui N, Muramatsu T, Mikami M. Possible role of thymidine phosphorylase in gynecological tumors as an individualized treatment strategy. *Oncol Lett.* in press: 2016. 査読有
4. Mikami M, Tanabe K, Matsuo K, Miyazaki Y, Miyazawa M, Hayashi M, Asai S, Ikeda M, Shida M, Hirasawa T, Kojima N, Sho R, Iijima S. Fully-sialylated alpha-chain of complement 4-binding protein: Diagnostic utility for ovarian clear cell carcinoma. *Gynecol Oncol.* 139(3):520-8. 2015. 査読有
5. Matsui N, Kajiwara H, Morishita A, Tsukada H, Nakazawa K, Miyazawa M, Mikami M, Nakamura N, Sato S. Cytological Study of Grade 3 Endometrioid Adenocarcinoma of Endometrial Origin: Cytoarchitecture and Features of Cell Clusters Assessed

with Endometrial Brushing Cytology--Focusing on a comparison with endometrioid adenocarcinoma Grade 1, 2. *Tokai J Exp Clin Med.* 40(2):29-35.2015. 査読有

6. Matsui N, Kajiwara H, Tsukada H, Nakazawa K, Miyazawa M, Mikami M, Nakamura N, Sato S. Cytological analysis of uterine body endometrioid adenocarcinoma cells in peritoneal cavity: cytological findings and histological background. *Tokai J Exp Clin Med.* 39(3):95-102. 2014. 査読有
7. Goto Y, Kametani Y, Kikugawa A, Tsuda B, Miyazawa M, Kajiwara H, Terao Y, Takekoshi S, Nakamura N, Takeda S, Mikami M. Defect of tropomyosin-related kinase B isotype expression in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Biosci Trends.* 8(2):93-100. 2014. 査読有

[学会発表](計9件)

1. 大金 直樹, 鴨志田 伸吾, 宮澤 昌樹, 加藤 久盛, 亀田 陽一, 堀 慎一, 加藤 智美, 安田 政実. 高齢者子宮内膜癌の病理学的検討. 第104回日本病理学会総会. 2015.5.1. 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
2. 宮澤 昌樹, 宮澤 麻里子, 平澤 猛, 花輪 幸子, 松井 成明, 梶原 博, 加藤 智美, 安田 政実, 三上 幹男. 卵巣明細胞腺癌における HDACs に着目した HIF-1 活性化阻害薬の開発. 第12回がんとハイポキシア研究会. 2014.11.21. ホテルマリタール創世(佐賀県佐賀市)
3. 宮澤 昌樹, 宮澤 麻里子, 杉山 太郎, 松井 成明, 藤井 幸子, 池田 仁恵, 信田 政子, 平澤 猛, 梶原 博, 村松 俊成, 岩森 正男, 三上 幹男. 子宮頸部腺癌における Sulfatide の役割と機能. 第73回日本癌学会学術総会. 2014.9.25. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
4. 田中 京子, 宮澤 昌樹, 三上 幹男, 青木 大輔, 木口 一成, 岩森 正男. ヒト子宮頸癌細胞における GM2 糖鎖を持つガングリオシドの発現. 第73回日本癌学会学術総会. 2014.9.27. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
5. 宮澤 昌樹, 宮澤 麻里子, 加藤 智美, 藤井 幸子, 松井 成明, 平澤 猛, 信田 政子, 池田 仁恵, 浅井 哲, 村松 俊成, 梶原 博, 安田 政実, 三上 幹男. 卵巣明細胞腺癌における HDAC 阻害剤を通じた HIF-1 活性化機構の制御. 第55回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 2014.9.27. 松本市中央公民館(長野県松本市)
6. 宮澤 昌樹, 宮澤 麻里子, 松井 成明, 藤井 幸子, 杉山 太郎, 西島 義博, 池

- 田 仁恵, 信田 政子, 平澤 猛, 梶原博, 村松 俊成, 岩森 正男, 三上 幹男. 子宮頸癌における Sulfatide の発現とその機能について. 第 56 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会. 2014.7.18. 栃木/栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)
7. 平澤 猛, **宮澤 昌樹**, 宮澤 麻里子, 天津 慎子, 楢山 知紗, 柏木 寛史, 浅井 哲, 池田 仁恵, 信田 政子, 安田 政実, 三上 幹男. 明細胞腺癌における HDAC family による HIF-1 活性化機序の解明. 第 56 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会. 2014.7.18. 栃木/栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)
8. 塚田 ひとみ, 平野 有希, 菊池 公孝, 中沢 和美, **宮澤 昌樹**, 松井 成明, 佐藤 慎吉, 村松 俊成, 三上 幹男. 子宮平滑筋肉腫 I 期における Glucose Transporter-1 および Hexokinase II の免疫組織学的発現と予後検討. 第 56 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会. 2014.7.19. 栃木/栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)
9. 鈴木 裕之, 安田 政実, 吉田 正行, **宮澤 昌樹**, 岡垣 竜吾, 石原 理, 藤原 恵一. 卵巣明細胞腺癌 188 例の臨床病理学的検討. 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2014.4.19. 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮澤 昌樹 (MIYAZAWA, Masaki)

東海大学・医学部・特定研究員

研究者番号: 30624572