慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	卵巣癌の薬物応答に関与する新規バイオマーカーの特定
Sub Title	Identification of novel bio-marker associated with drug response in ovarian cancer
Author	山上, 亘(Yamagami, Wataru) 西尾, 和人(Nishio, kazuto) 赤羽, 智子(Akahane, Tomoko)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究は①一塩基多型(single nucleotide polymorphism, SNP)に基づいた卵巣癌術後化学療法の効果予測②卵巣癌への分子標的治療薬効果予測マーカーの開発を目的とした。①は癌症例の血中リンパ球の網羅的SNP解析により, 化学療法の好中球減少の程度で有意差を認めるSNPを5種, および判別分析にて20種抽出した。これらの中に予後と相関を認めたSNPが認められた。②は卵巣癌組織においてFGF3, FGF4遺伝子のコピー数増幅が7%, 12%で認められ, 細胞株ではES2細胞株で増幅が認められた。ES2細胞株でソラフェニブのIC50値が他の卵巣癌細胞株に比べ, 有意に低値であった。 The aims are to clarify 1) the method for predicting effect of postoperative chemotherapy by single nucleotide polymorphism(SNP) and 2) the bio-marker for predicting effect of targeted therapy for ovarian cancer. 1) Global SNP annalysis using normal lymphocytes from ovarian cancer patients on the basis of a degree of neutropenia following adjuvant chemotherapy extracted five SNPs and discriminant analysis extracted twenty SNPs. Some of these SNPs correlated with the prognosis. 2) Copy number amplification of FGF3 and FGF4 was detected in 7% and 12% of ovarian cancer tissues and ES2 cell line. IC50 of sorafenib were significantly lower in ES2 cell line than that in the other ovarian cancer cell lines.
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2012～2014 課題番号：24592529 研究分野：婦人科腫瘍学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24592529seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２７　年　　６　月　　４　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　基盤研究(C)
研究期間：　2012～2014
課題番号：　２４５９２５２９

研究課題名（和文）卵巣癌の薬物応答に関与する新規バイオマーカーの特定

研究課題名（英文）Identification of novel bio-marker associated with drug response in ovarian cancer

研究代表者
山上　亘（Yamagami, Wataru）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：３０３４８７１８

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）：本研究は①一塩基多型(single nucleotide polymorphism, SNP)に基づいた卵巣癌術後化学療法の効果予測　②卵巣癌への分子標的治療薬効果予測マーカーの開発を目的とした。①は癌症例の血中リンパ球の網羅的SNP解析により、化学療法の好中球減少の程度で有意差を認めるSNPを5種、および判別分析にて20種抽出した。これらの中に予後と相関を認めたSNPが認められた。②は卵巣癌組織においてFGF3, FGF4遺伝子のコピー数増幅が7%,12%で認められ、細胞株ではES2細胞株で増幅が認められた。ES2細胞株でソラフェニブのIC50値が他の卵巣癌細胞株に比べ、有意に低値であった。

研究成果の概要（英文）：The aims are to clarify 1) the method for predicting effect of postoperative chemotherapy by single nucleotide polymorphism(SNP) and 2) the bio-marker for predicting effect of targeted therapy for ovarian cancer.
1)Global SNP annalysis using normal lymphocytes from ovarian cancer patients on the basis of a degree of neutropenia following adjuvant chemotherapy extracted five SNPs and discriminant analysis extracted twenty SNPs. Some of these SNPs correlated with the prognosis. 2) Copy number amplification of FGF3 and FGF4 was detected in 7% and 12% of ovarian cancer tissues and ES2 cell line. IC50 of sorafenib were significantly lower in ES2 cell line than that in the other ovarian cancer cell lines.

研究分野：　婦人科腫瘍学

キーワード：　卵巣癌　分子標的治療薬　化学療法　バイオマーカー　SNP　コピー数増幅

１．研究開始当初の背景

(1)抗癌剤治療：卵巣癌の治療成績はプラチナ製剤およびタキサン系抗癌剤の導入により改善されつつあるが、両薬剤に反応しない症例も相当数認められる。今後の術後補助療法の１つの方向性として、効果予測を行い症例ごとの特性に応じた治療を選択するのが望ましいと考える。これまで我々のグループの報告も含めて発現解析などの手法でその効果予測が試みられてきたが、未だ確立された有効な方法はない。一方で我々は、補助化学療法を施行した卵巣癌症例を対象に、補助化学療法時の好中球減少の程度と progression free survival (PFS)**の相関性を検証したところ、好中球減少の重篤であった症例では** PFS **の延長を認め、進行期とならぶ強力な予測因子であることが判明した。他癌でも同様の現象は報告されており、特に肺がんではプラチナ製剤について、患者リンパ球の障害と相関する一塩基多型(**single nucleotide polymorphism, SNP)**が、効果とも相関することが報告されている（**Tan XL, et al, Clin Cancer Res 2011**）。これらのことは抗癌剤の反応に関与する** SNP **が正常幹細胞より癌幹細胞に受け継がれ、抗癌剤の効果および副作用に関与するという仮説がたてられる。すなわち抗癌剤効果は毒性と関連しており、効果および毒性に共通に関与する** SNP **が存在し、それを発見することで評価可能病変のない補助化学療法の効果を予測できる可能性がある。本研究では** TC **療法の効果を予測できる** SNP **を探索する。**

(2)分子標的薬：これまで卵巣癌に対して，分子標的薬の臨床試験が行われており、現時点では VEGF **に対するモノクローナル抗体である** Bevacizumab **やチロシンキナーゼ阻害薬である** Cediranib**、**multi-kinase inhibitor **である** Sorafenib**、**Sunitinib**、** mTOR **阻害剤である** temsirolimus **や** everolimus**、**BRCA pathway **に関与する** PARP inhibitor **である** olaparib **などが効果の期待できる薬剤で、それぞれの病勢制御率は** 77%, 30%, 38%, 56%, 50%, 67%**と報告されている。特に** Sorafenib**、**Sunitinib **は腎癌では保険承認されており、生物学的に腎癌に類似している明細胞癌に対して有望な薬剤と期待されている。分子標的治療薬はその毒性や効果は、各人が有する遺伝子情報に関与することが知られている。たとえば** Gefitinib **は** EGFR **遺伝子変異が効果や毒性に密接に関連することが報告されている。我々はすでに肝がんにおいて** FGF3/FGF4 **の増幅が** sorafenib **の効果と相関することを確認している。本研究では卵巣癌に有効性が期待されている分子標的薬の関連経路の異常を臨床検体および細胞株で探索することで、当該薬の効果を期待できる群をスクリーニングし、また効果予測を試みる。**

２．研究の目的

卵巣癌術後治療の柱は化学療法であるが、その効果には限界がある。近年では分子標的治療薬の有効性も報告されつつあり、今後本邦でも臨床応用されることが予測される。そこで本研究ではこれら治療法の効果を予測するため、以下のことを明らかにする。

(1)評価可能病変のない術後補助化学療法の効果を治療前に予測できる方法は確立されていない。そこで SNP **に基づき、卵巣癌の術後化学療法（**TC **療法）の効果を予測できるシステムを開発する。**

(2)卵巣癌の臨床検体で卵巣癌に有効性が期待されている分子標的薬の関連経路の異常を探索し、適応に有用なバイオマーカーを探索する。

３．研究の方法

(1)抗癌剤治療

初回化学療法として手術後に TC **療法を施行した上皮性卵巣癌** 63 **例を対象とし、末梢血より採取したリンパ球から** DNA **を抽出し、この** DNA **を用いて** SNP **アレイ（**Illumina **社）による網羅的** SNP **解析を実施した。化学療法**

時の毒性の指標としては好中球減少を、治療効果の指標としては無増悪生存期間(PFS)を用い、これらの指標の程度に基づき 2 群に分けた際に、統計学的に分布に差の見られた SNP を選別した。さらに、これらの薬物反応を予測可能な最適な SNP の組み合わせの抽出を行った。

(2)分子標的治療薬

①卵巣癌症例 123 症例のパラフィン包埋切片の癌部より DNA を抽出した。FGF3, FGF4, FGFR1, FGFR2, PIK3CA 遺伝子について Taqman® Copy Number assays Kit を用いて、コピー数の解析を行った。コピー数増幅の有無と卵巣癌症例の臨床病理学的因子（手術進行期、組織型）と予後との関係について解析を行った。

②卵巣癌細胞株 14 種より DNA を抽出し、FGF3, FGF4, FGFR1, FGFR2, PIK3CA 遺伝子について Taqman® Copy Number assays Kit を用いて、コピー数の解析を行った。

③コピー数増幅を認めた細胞株において、ソラフェニブ、テムシロリムス、エベロリムスの薬剤耐性を調べるために、Dojindo Cell Counting Kit-8 を用いて細胞傷害性試験を行い、IC50 値を測定した。

４．研究成果

(1)抗癌剤治療

初回 TC 療法 1 サイクル目の好中球減少が高度な群と軽度な群の 2 群間で分布に有意差($p<0.05$)を認めた SNP のうち, p 値が小さいものから順に，また薬物代謝関連 47 遺伝子上に限定して，複数の候補 SNP を抽出した．さらにこの中から PFS との相関性を検証し治療効果にも関連しうる 5 つの SNP を選別した．このうち 1 つの SNP は良好な PFS と有意な相関を認めた($p=0.02$)．また，好中球減少を予測する最適な SNP の組み合わせを判別分析にて検討したところ，タキサン代謝関連遺伝子を中心に 20 個の SNP が抽出できた．

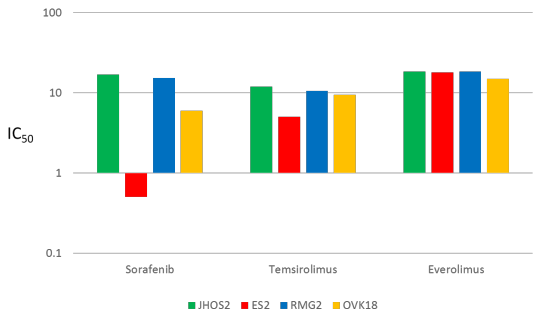
以上により、卵巣癌術後化学療法の効果を予測可能な SNP を複数個抽出された。今後は、これらの SNP を別の症例群における検証を行う。また、他癌種においても同じ SNP を用いることで、TC 療法の効果予測が可能かどうかについても検討予定である。

(2)分子標的治療薬

①卵巣癌症例の癌組織から抽出した DNA によるコピー数の解析は 85 例（69%）で可能であった。以下、結果を抜粋して示す。FGF3 遺伝子は 6 例(7%), FGF4 遺伝子は 10 例(12%)、PIK3CA 遺伝子は 12 例(14%)で増幅を認めた。コピー数増幅と臨床病理学的因子（手術進行期、組織型）と予後（無増悪生存率、全生存率）との関係を統計学的に解析したが、特に有意差や傾向は認められなかった。

②卵巣癌細胞株 14 種（漿液性腺癌 2、粘液性腺癌 4、類内膜腺癌 1、明細胞腺癌 7）を用いて、コピー数増幅を解析したところ、FGF3, FGF4 遺伝子増幅は ES2 細胞株で、PIK3CA 遺伝子増幅は JHOS2 細胞株と、JHOC8 細胞株で認められた。

③②でコピー数増幅が認められた ES2 細胞株、JHOS2 細胞株と、コピー数増幅が認められなかった卵巣癌細胞株である RMG2 細胞株, OVK18 細胞株を用いて薬剤耐性を解析したところ、下図のようになり、ES2 細胞株でソラフェニブの IC50 値が有意に低値であった。



上記成果より、卵巣癌において、FGF3, FGF4 遺伝子コピー数増幅は、分子標的治療薬ソラフェニブの効果予測マーカーとなりうる可

能性が示唆された。

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0件）

〔学会発表〕（計 6 件）

(1)山上亘、片岡史夫、坂井健良、真壁健、二宮委美、和田美智子、野村弘行、進伸幸、津田浩史、西尾和人、田中守、青木大輔、Copy number assay による sorafenib の卵巣癌への有効性の探索、第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会、平成 27 年 4 月 10 日～12 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

(2)岩佐尚美、野村弘行、片岡史夫、吉浜智子、中平直希、橋本志歩、二宮委美、山上亘、進伸幸、田中守、青木大輔、パクリタキセル＋カルボプラチン併用療法（TC 療法）のがん種非特異的効果予測因子としての一塩基多型の抽出、第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会、平成 27 年 4 月 10 日～12 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

(3)野村弘行、片岡史夫、岩佐尚美、中平直希、橋本志歩、有馬宏和、千代田達幸、山上亘、冨永英一郎、進伸幸、青木大輔、SNP 解析を用いた卵巣癌化学療法の効果予測手法の構築、第 2 回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会、平成 26 年 7 月 2 日、東京慈恵会医科大学１号館３階講堂（東京都港区）

(4)野村弘行、片岡史夫、岩佐尚美、中平直希、橋本志歩、有馬宏和、千代田達幸、山上亘、冨永英一郎、進伸幸、吉村泰典、青木大輔、上皮性卵巣癌に対する TC 療法の薬物反応を規定する一塩基多型の抽出、第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会、平成 26 年 4 月 18 日～20 日、東京国際フォーラム（東京都千代田区）

(5)Nomura H, Kataoka F, Chiyoda T, Tanaka H, Hashimoto S, Arima H, Yamagami W, Tominaga E, Susumu N, Aoki D、Association between drug response and gene polymorphisms in first line chemotherapy for ovarian cancer、第 72 回日本癌学会学術集会、平成 25 年 10 月 3 日～5 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

(6)野村弘行、津田浩史、片岡史夫、千代田達幸、井口蓉子、橋本志歩、山上亘、冨永英一郎、進伸幸、青木大輔、吉村泰典、上皮性卵巣癌初回化学療法における治療効果予測因子としての gene polymorphism の解析、第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会、平成 25 年 5 月 10 日～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）

〔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：なし

６．研究組織

(1)研究代表者
山上　亘（YAMAGAMI, Wataru）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：30348718

(2)研究分担者
西尾 和人（NISHIO, Kazuto）
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：10208134

赤羽　智子（AKAHANE, Tomoko）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：40398699