

2021年3月9日

報道関係者各位

慶應義塾大学医学部
日本医科大学
国立がん研究センター
防衛医科大学校
日本医療研究開発機構

難治性卵巣がんにおける白金製剤無効症例の原因としてのポリスルフィドの 役割解明と、その分解剤による薬剤耐性解除効果の発見

慶應義塾大学病院臨床研究推進センターの菱木貴子専任講師、医学部医化学教室の山本雄広専任講師、加部泰明准教授、末松誠教授および日本医科大学大学院医学研究科生体機能制御学分野の本田一文大学院教授、国立がん研究センター研究所の平岡伸介部門長のグループは、手術により摘出した卵巣がん組織における活性硫黄種の一つであるポリスルフィド (PS) を表面増強ラマン散乱イメージング (注1) によって世界で初めて検出することに成功しました。これにより、ポリスルフィドが高い値の症例では、手術後に行われる白金製剤などの化学療法の効果は低下し、長期予後が悪化することを明らかにしました。

卵巣がんはCTなどで診断がつくと両側卵巣、卵管、子宮などを一括して摘出したのち (腫瘍減量手術 (Debulking surgery : 注2)、白金製剤を主体とした強力な化学療法を行います。今回、病理組織で明細胞がんとして診断された症例では化学療法の効果に大きな個人差が認められました。末松教授の研究チームは、1) 難治性症例の (卵巣) がん組織では細胞保護作用を持つ活性硫黄種の一つである PS を大量に生成していること、2) PS には他の活性硫黄種と異なり白金製剤の DNA 架橋反応による治療効果を無力化する作用があること、3) 去痰剤として臨床で広く使われている Ambroxol は PS の分解作用を通じて卵巣がんの薬剤抵抗性を解除する作用を示すことを発見しました。

本研究成果は、2021年3月2日 (英国時間) に Elsevier の科学誌『Redox Biology』のオンライン速報版 (In Press) で公開されました。

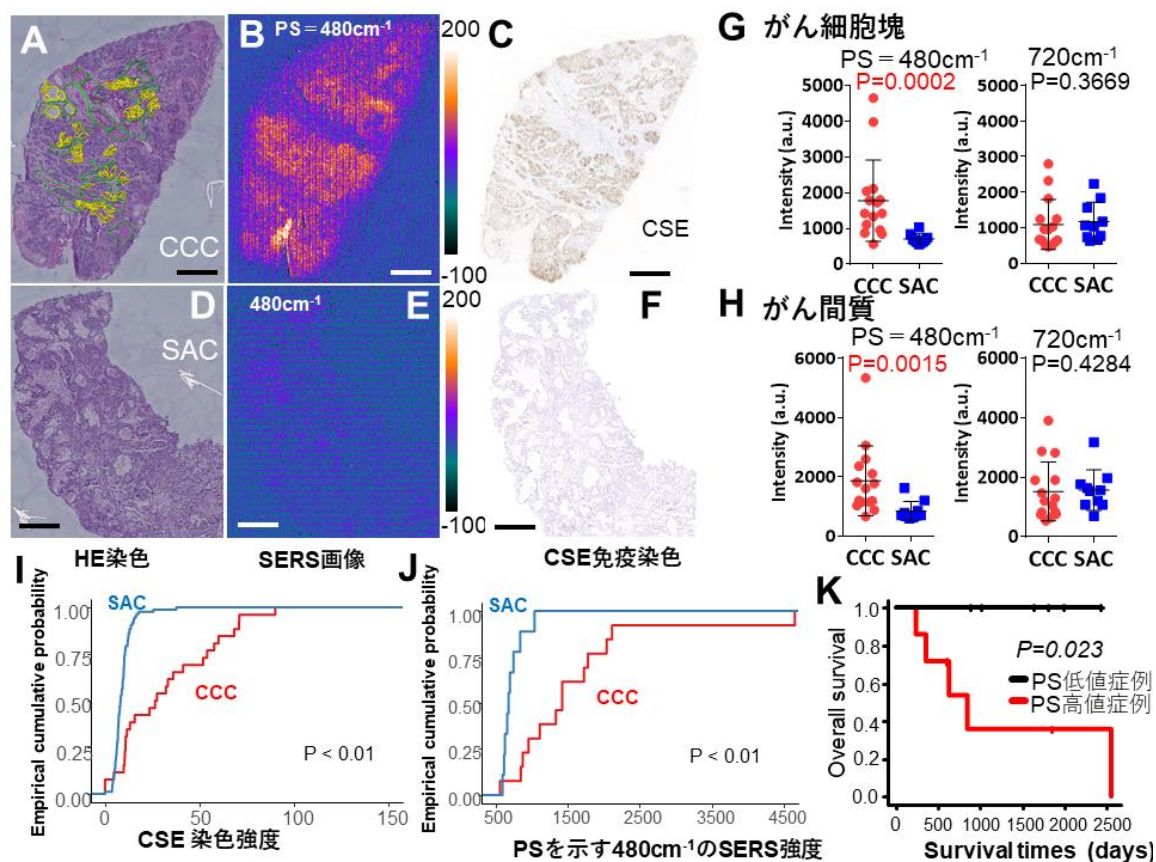
1. 研究の背景

卵巣がん症例では、診断後に腫瘍減量手術を行ったのち、シスプラチンなどの白金製剤が術後化学療法として施行されています。しかし、術後化学療法の効果には大きな個人差があります。このため、化学療法に対する抵抗性の指標となるバイオマーカーを探索するとともに、薬剤抵抗性のメカニズムを解明し、かつ抵抗性を解除する新たな治療法を見出すことが求められていました。

2. 研究の内容

本田教授 (国立がん研究センター研究所部門長兼任) らの研究チームは、防衛医科大学校病態病理学 (津田均教授)、産婦人科学 (高野政志教授) のチームと共同で、2病院における卵巣がん症例182例から得た摘出組織を免疫組織マイクロアレイ法 (注3) により1,012種類の単クローン抗体を用いて解析した結果、システインやグルタチオン、硫化水素 (H₂S) などの生成酵素の一つであ

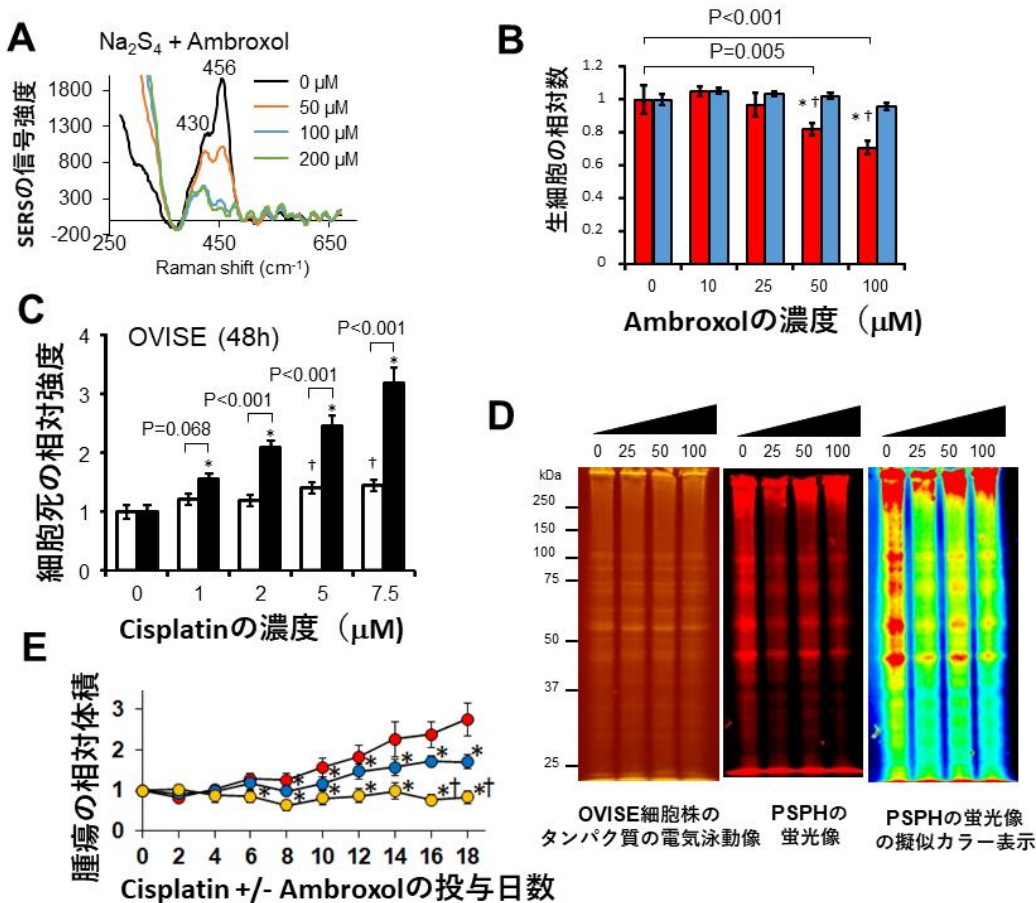
るシスタチオン γ -リアーゼ（CSE：注4）が高く発現している症例では、白金製剤を主体とした術後化学療法の結果が悪く、生命予後が短くなることがわかりました。白金製剤に対する薬剤抵抗性は、病理診断で明細胞がん（CCC）と診断された症例が大多数でしたが、それらの症例の中でも CSE の発現量が高い症例と低い症例とのばらつきが大きいため、個々の症例における生命予後の正確な予測は困難でした。末松教授らの研究チームは、2018年に報告した非標識・無染色の組織凍結切片を用いて多数の代謝物を画像化できる表面増強ラマンイメージング技術を利用して、国立がん研究センター・バイオバンクに蓄積されている卵巣がんの組織検体を用いて Imaging metabolomics 解析しました（図1A~F）。その結果、明細胞がん（Clear Cell Carcinoma：CCC）では漿液性腺がん（Serous Adenocarcinoma：SAC）と比べて、がん細胞集塊部（Cancer cell nest）や周囲のがん間質部（Cancer stroma）で、 480 cm^{-1} に検出されるポリスルフィド（PS）が高いことが明らかになりました（図1G,H）。PSは酵素CSEが生成する主要な代謝物質の一つであり、ヒトの固形腫瘍で高値を示す症例は化学療法抵抗性を示すことが初めて明らかになりました。CCCのPS値は症例間のばらつきが大きく、特にPS値の中央値で2群に分けると、低値群では全例が化学療法に反応するのに対して、高値群では術後2,500日で亡くなっていました（図1I~K）。



【図1】表面増強ラマンイメージングによる卵巣がん組織におけるポリスルフィドの画像化と、明細胞がん（CCC）と漿液性腺がん（SAC）の比較

A~C: (左から) CCCにおけるヘマトキシリン・エオジン染色（黄色はがん細胞塊、緑色は周囲の間質組織）、同一切片の PS を示す表面増強ラマン散乱（Surface-enhanced Raman Scattering：SERS）画像（ 480 cm^{-1} の画像）、CSEの免疫染色像。スケールは100マイクロン。

D~F: (左から) SACにおけるヘマトキシリン・エオジン染色（黄色はがん細胞塊、緑色は周囲の間質組織）、同一切片の PS を示す SERS 画像（ 480 cm^{-1} の画像）、CSEの免疫染色像。スケールは100マイクロン。G, H: CCCとSACにおけるがん細胞塊（Cancer）、およびがん間質（Stroma）におけるPSの強度（ 480 cm^{-1} ）。 720 cm^{-1} は比較対照となるプリン体（ATPなど）の信号強度を示す。I, J: (左から) CCCとSACにおけるCSE発現量とPS信号強度の症例毎のばらつきの解析。カーブが右にシフトするほど症例間のばらつきが大きく、CCCで有意にばらつきが大きい。K: CCC13例におけるPS高値群（赤）と低値群（黒）の術後長期予後。PS高値群では予後が有意に悪いことがわかる。



【図2】アンブロキソール (Ambroxol) によるポリスルフィド分解作用と卵巣がん細胞株 (OVISE) のシスプラチン惹起性細胞死の増強効果。

- A: Ambroxol による用量依存性のポリスルフィド (Na₂S₄) 分解作用。456 cm⁻¹ の SERS 信号が Ambroxol の増量によって消失する。
- B: Ambroxol が卵巣がん細胞株の生細胞数に及ぼす効果。明細胞がん細胞株である OVISE (赤) は、漿液性腺がん株である OVCAR (青) に比べて Ambroxol の高濃度によって生細胞数が低下することから、OVISE の生存には内因性のポリスルフィドが必要であることが示唆された。
- C: OVISE のシスプラチン抵抗性と Ambroxol 共存下における細胞保護の解除効果。白は Ambroxol なしの培養、黒は Ambroxol 25 mM を添加したデータ。
- D: OVISE 細胞株のタンパク質のポリスルフィド化の Dimedon-switching 解析による検討。Protein persulfides (PSPH) 陽性のタンパク質が複数存在している。擬似カラー表示では Ambroxol の濃度 (黒三角の下の数字 mM) を増加させると、PSPH は明らかに消失する。
- E: ノードマウスへの OVISE 細胞皮下移植による腫瘍形成モデルにおける腫瘍縮退効果。(1) 腫瘍細胞移植単独群 (赤: N=8)、(2) 10 mg/kg/day の Cisplatin 連日腹腔投与群 (青: N=10)、(3) 同用量の Cisplatin 投与に加え、Day 0 から Ambroxol を 100 mg/kg/day 連日投与群 (黄色: N=8) の腫瘍体積の推移。腫瘍体積は腫瘍の長径を L、幅を S として 2 日ごとに計測し LS² で計測し、Day 0 における各群の腫瘍体積平均値を 1 として相対値で表示 (Mean +/- SE)。

さらに末松教授のチームは、既存薬の中で去痰薬として汎用されている Ambroxol にポリスルフィドの分解作用があることを SERS の解析で明らかにしました (図 2A)。ヒト由来の卵巣がん細胞株のうち、PS が高い株である OVISE 細胞と、PS が低い株である OVCAR 細胞を比較すると、Ambroxol を添加すると OVISE 細胞の生存が低下することもわかりました (図 2B)。そこで、これらの細胞株の白金製剤 (シスプラチン) に対する感受性を比較したところ、OVISE 細胞ではシスプラチン単独では細胞死が起こりにくいのにに対し、Ambroxol 共存下で培養すると細胞死が誘導されることが明らかになりました (図 2C)。興味深いことに、OVISE 細胞内の複数のタンパク質では、通常はシステイン側鎖のチオール基 (-SH) がポリスルフィド化されていることも生化学的に証明されました。Ambroxol はこれらのタンパク質のポリスルフィド化を顕著に抑制することが

示されました (図 2D)。さらに、ヌードマウスの皮下に OVISE 細胞を移植して腫瘍形成を起こすモデルでも Ambroxol は Cisplatin による腫瘍退縮効果を増強することが明らかになりました (図 2E)。

3. 研究の意義・今後の展開

本研究の意義は、腫瘍減量手術を受けた際に採取できる凍結卵巣組織ブロックを薄切してできる試料を表面増強ラマン分光顕微鏡 (SERS) で分析することによって、サンプルを標識、染色などの人為的操作を加えずにポリスルフィドが高値の患者を簡便に選別できるようになったことです。またポリスルフィド高値の症例では白金製剤と Ambroxol を併用することによって腫瘍の退縮効果が増強する、すなわち、治療薬耐性の解除が可能であることが示唆されました。このような薬剤併用による抗がん剤の主作用の増強は、将来進行性の卵巣がんの術後化学療法の予後を改善する可能性が示唆され、今後の展開が期待されます。

4. 特記事項

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構革新的先端研究開発支援事業 (AMED-CREST) 「疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出」研究開発領域 (研究開発総括：清水孝雄) 研究開発課題名「代謝システム制御分子の系統的探索による治療戦略創出と創薬展開」 (研究開発代表者：加部泰明) (謝辞番号：JP19gm0710010)、JSPS 科研費 JP18K06921 および国立研究開発法人科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業 (JST-ERATO、末松ガスバイオロジープロジェクト、2010-2015) の支援により行われました。なお、末松教授は、本研究に関する研究開発費を AMED から受給していません。

5. 論文

英文タイトル：On-tissue polysulfide visualization by surface-enhanced Raman spectroscopy benefits patients with ovarian cancer to predict post-operative chemosensitivity

タイトル和訳：表面増強ラマンイメージングによる卵巣がん組織のポリスルフィド撮像法は術後化学療法感受性を予測する技術となる

著者名：本田一文、菱木貴子 (共同筆頭著者)、山本宗平、山本雄広、三浦奈美、久保亜紀子、伊藤真衣、Wei-Yu Chen、高野政志、吉川智之、笠松高弘、園田慎一郎、吉沢宏俊、中村誠吾、板井雄一郎、塩田芽実、小池大輔、納谷昌之、早川典代、内藤善子、松浦友美、祝迫恵子、松井俊彦、上本伸二、長島健悟、橋本容範、佐久間朋寛、松原修、Wilber Huang、井田智明、赤池孝章、眞杉洋平、坂元亨宇、加藤友康、猪野義典、吉田裕、津田均、平岡伸介、加部泰明、末松誠 (責任著者)

掲載誌：Redox Biology (オンライン速報版) (In Press)

DOI : 10.1016/j.redox.2021.101926

【用語解説】

(注1) 表面増強ラマン散乱イメージング (SERS imaging) と硫黄を含む代謝物の検出：金や銀のナノ粒子に光を照射すると、粒子の径や形状によってその周辺に強力な電磁波が発生する、いわば「光がまとわりつく」現象が起こる。このような電磁波を近接場光と呼ぶ。金や銀には硫黄原子と結合する作用があるため、硫黄原子を含んだ構造の異なる代謝物の存在下で単色光 (レーザー光) を照射すると固有の原子間振動を反映したラマン散乱光が増強されて、どんな代謝物が存在するかをラマンスペクトルから判定できる。そのような金ナノ粒子を 2 次元に敷き詰めると数 cm 四方の組織切片を無染色・非標識で分析して硫黄原子を含む代謝物を同時に複数同定できる技術になる。

(注2) 腫瘍減量手術：患者さんの病状によりがんのすべてを取り除くことが不可能な部位や症例に対して可能な限り腫瘍を取り除く手術を指す。

- (注3) 免疫組織マイクロアレイ法：縦横に並べた多数のサンプルから発せられるシグナルを一括して高速にタンパク質の発現を解析する技術。
- (注4) シスタチオニン γ -リアーゼ (CSE)：含硫アミノ酸であるメチオニンからシステインを合成するための経路に属する代謝物のうち、シスタチオニンをシステインに変換する酵素。細胞の酸化ストレスを軽減するグルタチオン、ヒポタウリン、硫化水素、ポリスルフィド等の生合成にも直接間接に関与する酵素である。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ、各社科学部等に送信しております。

【本発表資料のお問い合わせ先】

慶應義塾大学医学部 医化学教室

教授 末松 誠 (すえまつ まこと)

TEL：03-5363-3753 FAX：03-5363-3466 E-mail：gasbiology@keio.jp

日本医科大学 大学院医学研究科 生体機能制御学分野

大学院教授 本田 一文 (ほんだ かずふみ)

日本医科大学先端医学研究所 事務室

TEL：03-5814-6275 FAX：03-5814-6827 E-mail：ml_sentanken@nms.ac.jp

国立研究開発法人国立がん研究センター

企画戦略局 広報企画室

〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1

電話：03-3542-2511 (代表) E-mail：ncc-admin@ncc.go.jp

防衛医科大学校

事務局総務部総務課総務係広報担当

〒359-8513 埼玉県所沢市並木 3-2

TEL:04-2995-1211 (代表) FAX:04-2995-1283 E-mail:adm018@inet.ndmc.mod.go.jp

【AMED に関すること】

国立研究開発法人日本医療研究開発機構

シーズ開発・研究基盤事業部 革新的先端研究開発課

TEL：03-6870-2224 FAX：03-6870-2246 E-mail：kenyuk-ask@amed.go.jp

【本リリースの配信元】

慶應義塾大学信濃町キャンパス総務課：山崎・飯塚

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35

TEL：03-5363-3611 FAX：03-5363-3612 E-mail：med-koho@adst.keio.ac.jp

<http://www.med.keio.ac.jp>

※本リリースのカラー版をご希望の方は【本リリースの配信元】までご連絡ください。