

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06173

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌における細胞死誘導に着目した新規治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel molecular targeted therapy focused on apoptosis induction in ovarian clear cell adenocarcinoma

研究代表者

榎山 智子 (Kashiyama, Tomoko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70755719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞腺癌細胞株にPI3K/mTOR同時阻害薬を添加し、濃度依存性に抗腫瘍効果を示すこと及び増殖シグナルを抑制することを確認した。また卵巣明細胞腺癌細胞株のうちTP53変異を有する細胞株ではTP53変異を有さない細胞株に比べ同薬剤が高率にアポトーシスを引き起こすことを示した。TP53変異の有無がPI3K/mTOR同時阻害剤を卵巣明細胞腺癌に用いる際のバイオマーカーとなる可能性がある。さらに他の分子標的薬や抗癌剤との併用でより効率的にアポトーシスを起こすことが可能か検討しており、MDM2阻害薬やMEK阻害剤が有力な候補と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We confirmed that a PI3K / mTOR inhibitor suppressed the growth signal and showed the antitumor effect in a concentration-dependent manner in ovarian clear cell adenocarcinoma cell line. In addition, the the PI3K/mTOR inhibitor led apoptosis in ovarian clear cell adenocarcinoma cell lines with wild type TP53 more effectively than that with TP53 mutation. The absence of TP53 mutation may be a promising biomarker for using PI3K / mTOR inhibitors for patients with ovarian clear cell adenocarcinoma. We are investigating whether combination with PI3K/mTOR inhibitor and other molecular target drugs or anticancer drugs can induce more efficient apoptosis, and MDM 2 inhibitors and MEK inhibitors are considered to be promising candidates.

研究分野：分子標的薬

キーワード：PI3K/mTOR阻害薬 卵巣明細胞癌 アポトーシス 婦人科悪性腫瘍 卵巣癌

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は女性の癌として8番目に罹患率が高く、7番目に致死率が高い。特に、卵巣明細胞腺癌は、卵巣癌における死亡者例が2番目に多い組織型であり、その発症頻度は欧米では5-10%と低頻度であるのに対し、日本では卵巣癌の約24%と高頻度に認められる。卵巣明細胞腺癌は卵巣内膜症性嚢胞を発生母地として多段階的に発癌すると考えられており、上皮性卵巣癌の標準治療であるプラチナ製剤を用いた化学療法に抵抗性を示す症例が多く、予後不良とされている。また出産年齢の高齢化・子宮内膜症の増加とともに、今後さらに卵巣明細胞腺癌の罹患率・死亡者数が増加していくと懸念されている。抗癌剤は主として細胞分裂する過程に働くため、細胞増殖速度が緩徐である卵巣明細胞腺癌では抗癌剤による細胞死が生じにくいと考えられている。以上より、既存の抗癌剤治療とは異なった機序で、細胞死を誘導できるような新規治療法の開発が急務である。

	頻度		遺伝子発現異常の特徴	抗癌剤の効果
	日本	欧米		
漿液性腺癌 (OSA)	40%	52%	TP53 (96%)、BRCA1/2、RB	パクリタキセル・カルボプラチン療法の実効率は7割
明細胞腺癌 (OCCA)	24%	8%	PIK3CA (50%)、ARID1A、TP53変異は10%程度	抗癌剤に抵抗を示すことが多く予後不良

近年遺伝子解析技術が進歩してきているが、欧米を中心とした卵巣癌における網羅的なゲノム解析や分子標的薬を用いた臨床試験は、欧米で頻度の高い漿液性腺癌を中心としたものが大半を占めており、卵巣明細胞腺癌に対する新規治療法の研究は我が国主導で進めていく必要がある。また、遺伝子変異プロファイルが、明細胞腺癌と漿液性腺癌とで大きく異なることから、卵巣明細胞腺癌独自の治療法の開発が求められる。申請者らは今までに、子宮体癌などでPI3K/mTOR経路の活性化が高頻度であることを明らかにし、PI3K/mTOR経路阻害剤が抗腫瘍効果を示すことを報告してきた (Oda K et al. Can Res 2005) (Oda K et al. Can Res 2008) (Shoji K et al. PLoS One 2012) (Ikeda et al. Oncol Rep, 2013) (Kashiyama T et al. PLoS One 2014)。

また、申請者らはすでに卵巣明細胞腺癌 75 症例について、全エクソシーケンシングによる遺伝子変異解析、SNP (Single Nucleotide Polymorphism) タイピングアレイによる染色体コピー数解析、およびマイクロアレイによる発現解析を施行しており、臨床データとの意義づけを行ってきた。これにより、PI3K/mTOR 経路を活性化する因子として、卵巣明細胞腺癌では PIK3CA 変異が 50%以上で認められるほか、KRAS をはじめとして他の因子の変異も存在していることを見出すとともに、がん抑制遺伝子 TP53 変異率は 10%以下と低く、TP53 経路が 90%以上の症

例で保持されていることが明らかとなった。PI3K/mTOR シグナル経路はタンパク合成、細胞増殖、アポトーシス制御といった、腫瘍の増殖・生存における様々なシグナルに関わっている。本経路の阻害薬が抗腫瘍効果を示すことは種々の癌腫で報告され、臨床試験も進められているが、静細胞的な効果が主であり、殺細胞的な効果は弱いとされていた。申請者らは、TP53 変異を有さない卵巣明細胞腺癌細胞株では、PI3K/mTOR 阻害剤 DS-7423 により、TP53 依存性にアポトーシスが誘導されることを報告した (Kashiyama T et al. PLoS One 2014)。TP53 は AKT の下流分子である MDM2 によって分解され、その機能を抑制されるが、PI3K/mTOR 阻害剤により MDM2 のリン酸化が抑制されると、TP53 が活性化され、アポトーシスが促進される可能性がある。卵巣明細胞腺癌では先に述べた通り TP53 の変異率が 10%と低いため PI3K/mTOR 阻害剤が TP53 依存性アポトーシスを効率的に起こすことができれば、有力な治療選択肢の 1 つになりうると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗癌剤耐性を示し予後不良とされる卵巣明細胞腺癌における新規治療標的となる候補分子やシグナル伝達経路を明らかにすることで、新規分子標的治療薬を探索する事である。

具体的には、

PI3K/mTOR 経路阻害薬によるアポトーシス誘導効果の解析

アポトーシス誘導の key となる分子の同定
アポトーシスをより効率的に誘導する分子標的薬併用療法の探索

従来の抗癌剤との併用によるアポトーシス誘導効果への影響の解析

3. 研究の方法

卵巣明細胞腺癌細胞株に PI3K/mTOR 同時阻害剤 (DS-7423) を添加し Flowcytometry 解析 (FACS) を行い sub-G1 (細胞死) の比率を算出し、G1、G2/M 期における細胞周期停止とあわせて評価する。さらに、Annexin V 及び TUNEL 法を用いて、アポトーシス細胞を検出する。

PI3K/同時阻害剤を添加した細胞株から抽出したタンパクを用い Western blotting 法で PI3K-AKT 下流分子のリン酸化レベルを評価する。特に細胞生存に関わる FOXO 及び TP53 依存性アポトーシスに関わる分子 (TP53AIP1, PUMA, NOXA など) ミトコンドリア依存性アポトーシスに関わる分子 (Bim, BAD, Survivin, bcl-2 など) のうちアポトーシス誘導される株で特異的に動く分子を探索する。

上記で抽出された分子に対し RT-PCR 法を用い PI3K/mTOR 同時阻害剤による遺伝子発現レベルの変化の確認を行う。

抗アポトーシスに関わる遺伝子群について、siRNA を導入し、PI3K/mTOR 同時阻害剤によるアポトーシス誘導が抑制されるか否かを確認する。またアポトーシスに関わる遺伝子に変異を有する細胞株にプラスミドを用いて遺伝子導入し、PI3K/mTOR 同時阻害剤投与後に Luciferase 活性を測定することにより、アポトーシスに関わる経路が活性化しているかを検討する。

卵巣明細胞腺癌細胞株を移植したヌードマウスに PI3K/mTOR 同時阻害剤を投与し腫瘍縮小効果を確認する。

アポトーシス誘導に関与することが確認できた分子を阻害する分子標的薬との併用を行い、相乗効果または相加効果について検討する。

抗癌剤との併用効果について検討する。同時投与では併用効果が明らかにならない場合には、時間差での投与での併用効果も検討する。

4 . 研究成果

(1)PI3K/mTOR 同時阻害によるアポトーシス誘導関連蛋白の同定
卵巣明細胞腺癌細胞株に PI3K/mTOR 同時阻害剤を添加し Flowcytometry 解析を行ったところ、TP53 変異を有さない細胞株では変異を有する株よりも G1 期細胞が有意に多く、有意にアポトーシス誘導率が高いことが判明した。PI3K/mTOR 同時阻害剤を添加した細胞株から抽出したタンパクを用いて Western blotting 法で PI3K-AKT 経路下流分子のリン酸化レベルの評価を行ったところ、細胞生存に関わる FOXO 及び TP53 依存性アポトーシスに関わる分子である TP53AIP1, PUMA の誘導、リン酸化を認めた。以上より TP53 変異の有無が卵巣明細胞腺癌において PI3K/mTOR 同時阻害薬によるアポトーシス誘導に関して重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(2) アポトーシスを誘導する新たな分子標的治療の探索
TP53 変異を有さない細胞株に siRNA を用いて TP53 ノックダウンを行ったうえで PI3K/mTOR 同時阻害剤を添加したところ、アポトーシス誘導率は有意に低下した。また TP53 変異を有する細胞株にプラスミドを用いて TP53 を導入、PI3K/mTOR 同時阻害剤添加後の Luciferase 活性を測定したところ、TP53 導入細胞で転写活性は増加した。

(3) ヌードマウスでの抗腫瘍効果の検討
卵巣明細胞腺癌細胞株を移植したヌードマウスに PI3K/mTOR 同時阻害剤を投与したところ濃度依存的に腫瘍縮小効果を示した。

(4) 他の分子標的薬との併用
TP53 依存性アポトーシスに関与する分子である MDM2 及び PI3K/mTOR 同時阻害剤添加により活性化する MAPK 経路の阻害剤について併用効果を検討した。このうち、MDM2 阻害剤と MEK1/2 阻害については Flowcytometry 法、Annexin 、TUNEL 法を用いたアポトーシス誘導の評価において相乗効果をもたらす可能性が示唆された。

(5) 抗癌剤との併用効果
シスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセルと PI3K/mTOR 阻害剤との併用療法では相加効果は認められるものの、相乗効果は認められなかった。

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 5 件)

1. Characterization of TP53 and PI3K signaling pathways as molecular targets in gynecologic malignancies.
Oda K, Ikeda Y, Kashiyama T, Fujii T.
J Obstet Gynaecol Res. 2016 Jul;42(7):757-62

2. Synergistic antitumor effects of combination PI3K/mTOR and MEK inhibition (SAR245409 and pimasertib) in mucinous ovarian carcinoma cells by fluorescence resonance energy transfer imaging.
Inaba K, Oda K, Aoki K, Sone K, Ikeda Y, Miyasaka A, Kashiyama T, Fujii T
Oncotarget. 2016 May 17;7(20):29577-91

3. Significance of survivin as a prognostic factor and a therapeutic target in endometrial cancer.
Chuwa AH, Sone K, Oda K, Ikeda Y, Kashiyama T, Fujii T.
Gynecol Oncol. 2016 Jun;141(3):564-9

4. Antitumor activity of a combination of dual PI3K/mTOR inhibitor SAR245409 and selective MEK1/2 inhibitor pimasertib in endometrial carcinomas.
Inaba K, Oda K, Ikeda Y, Sone K, Miyasaka A, Kashiyama T, Fujii T.
Gynecol Oncol. 2015 Aug;138(2):323-31

5.卵巣癌新規治療薬候補 PI3K/mTOR 阻害薬
DS-7423 による TP53 依存性アポトーシス誘
導能の活性化
織田克利 榎山智子
産科と婦人科 2015 vol.10 113-118

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
榎山 智子 (KASHIYAMA, tomoko)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70755719

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()