

平成 21 年 4 月 9 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791135

研究課題名（和文） 卵巣癌の薬剤耐性化機序の解明と新しい分子標的治療の開発

研究課題名（英文） The clarification of drug-resistance and the development of new targeting therapies in ovarian cancer

研究代表者

太田 剛 (OHTA TSUYOSHI)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：50375341

研究成果の概要：我々は、卵巣癌細胞において EGF 受容体阻害剤である gefitinib(イレッサ)が、CDDP が誘導する PI3K/Akt や ERK 経路の活性化による anti-apoptotic な作用を解除すること、さらに CDDP による DNA 損傷からの修復を阻害することによって CDDP の抗腫瘍効果を増強することを *in vitro*, *in vivo* で明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	0	2,600,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	180,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：卵巣癌、EGFR、gefitinib、Akt、ERK、DNA-PK

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は primary cytoreductive surgery と adjuvant chemotherapy が基本治療であるが、生存率が最も低い婦人科癌である。その理由としては早期発見が困難であり、約70%が、期の進行がんとして発見されること、また当初抗がん剤に感受性を示していても次第に耐性化を示し再発、転移巣を形成する場合が多いことなどが考えられる。現在卵巣癌

の化学療法は1st lineのレジメンとしてシスプラチンとタキソールの併用療法が確立されており、特に白金製剤への感受性が患者の予後を規定すると言われていいる。したがって、白金製剤の耐性化の分子機構を解明し、耐性化を解除する分子標的を同定し、治療に応用することは卵巣癌患者の予後を著しく改善すると考えられる。

(1)抗がん剤のシグナル関連因子とアポトーシス関連因子への影響

シスプラチン、タキソールなどの抗癌剤に対する耐性化の機構の1つとして、増殖シグナルである

extracellular signal-regulated kinase (ERK)経路と、生存シグナルであるphosphatidylinositol 3-kinase(PI-3 kinase)-Akt経路が抗癌剤の投与により活性化されることが重要である。これらの経路が活性化されると、アポトーシス関連因子である Bcl-2 associated death protein(BAD)をリン酸化されアポトーシスが抑制されて、cell surviveに働く。我々はシスプラチンが ERKの活性化を介して BADのセリン112残基を、Aktの活性化を介して BADのセリン136残基をリン酸化し、これらの標的分子の活性を消失させる薬剤添加もしくは遺伝子導入でシスプラチンへの耐性が解除されシスプラチンに対してより感受性を示すことを *in vitro*(Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H et al. Cancer Res 2000;60:5988) *in vivo* (Ohta T, Ohmichi M, Kurachi H et al. Endocrinology 2006;147(4):1761)において報告した。さらに共同研究者はタキソールにおいても同様の耐性化機構があることを報告している(Mabuchi S, Ohmichi M, Kurachi H et al. J Biol Chem 2002;277:33490)。

(2)転写因子 nuclear factor(NF)- Bへの影響

我々はPI-3 kinase-Akt経路の下流に位置する転写因子のNF- Bはがんの増殖、血管新生、転移、浸潤に関連しているという報告(Orlowski RZ et al. Trends Mol Med. 2002;8(8):385)をもとに、NF- Bの阻害剤を用いることでシスプラチン、タキソールに対する感受性が増強することを *in v*

*itro, in vivo*において報告した(Mabuchi S, Ohmichi M, Ohta T, Kurachi H et al. 2004 J Biol Chem;279(22):23477; Clin Cancer Res 2004;10(22):7645)。

(3)上皮成長因子(Epidermal Growth Factor (EGF))受容体への影響

ERK経路およびPI-3 kinase-Akt経路の上流にはEGF受容体が位置しているので、我々はEGF受容体の阻害剤を用いることにより両経路のシグナル伝達がブロックされ、より抗癌剤に対する感受性が高まるのではないかと考えた。現在、EGF受容体をターゲットとした分子標的治療薬は多数開発されているが、肺の非小細胞癌で広く臨床応用されている(Fukuoka M. Proc Am Soc Clin Oncol 2002;21:298a) gefitinibを用いてEGF受容体のシグナル伝達経路を遮断することによって、シスプラチンの感受性を増強するか否かを *in vitro, in vivo*において検討中であり、抗腫瘍効果が相乗的に高まるとの予備的結果を得ている。

(4)Gefitinibの新たな可能性

シスプラチンの作用機序は DNA damage を腫瘍細胞に与えることで細胞をアポトーシスに導く。そのためシスプラチンにおいて最も重要な耐性化の機序はこの DNA damage からの repair である。最近 gefitinib はシスプラチンによる DNA 損傷からの修復を DNA-dependent protein kinase(PK)を介して抑制することが乳癌細胞では報告されている(Friedmann B et al. Clin Cancer Res 2004;10:6476)

以上のような研究成果と学術的背景より卵巣癌において gefitinib は EGF 受容体のシグナル伝達を遮断することで癌細胞における増殖シグナルである ERK 経路

および生存シグナルである PI-3 kinase-Akt 経路をブロックする可能性がある点と、卵巣癌における key drug であるシスプラチンの薬剤機序を増強する可能性がある点から今後の分子標的治療薬として有用であると考え着想に至った。

2. 研究の目的

この分子標的治療の卵巣癌への応用には3つの可能性がある。1つは、プラチナ製剤を中心とする現在の化学療法の効果を高め、より少量で、副作用の少ない化学療法が行える可能性、第2は、再発転移病巣など化学療法に抵抗性を示すようになった場合に使用することで、再びプラチナ製剤への感受性を示すようになる可能性、第3は、元来化学療法に抵抗性を示す組織型に対する治療における有用性である。そこで本研究期間中に以下の点を明らかにすることを目的とした。

- (1) EGF 受容体のシグナル伝達経路の遮断は、抗癌剤の卵巣癌増殖抑制効果を増強するか
- (2) Gefitinib は、シスプラチンによる DNA damage からの repair を抑制するか、またそれは EGF 受容体を介するか否か
- (3) シスプラチンによる DNA damage からの repair 機構として重要な分子標的は何であるか

3. 研究の方法

本研究では、シスプラチン感受性である A2780 細胞(粘液腺癌由来) 耐性である Caov-3 細胞(粘液腺癌由来) RMG- 細胞(明細胞癌由来)を用いて以下の実験を行った。

***In vitro* での検討**

- (1) 上記細胞における EGF 受容体の発現の検討

各細胞における EGF 受容体の発現を、EGF 受容体抗体を用いた western blotting により検討する。

- (2) シスプラチンと gefitinib の併用投与による相乗効果の検討

上記の3種類の細胞において cell viability に影響を与えない濃度に gefitinib を固定し、シスプラチンとの併用群と、シスプラチンの単剤投与群との間で cell viability を比較検討する。

- (3) シグナル伝達関連因子の発現と活性化(リン酸化)、アポトーシスの検討

上記の3種類の細胞を24時間無血清培地で培養したのち、vehicle (DMEM)、シスプラチン(200 μ M)、 gefitinib、シスプラチン+gefitinib を投与する。この4群で western blotting により、それぞれの抗体を用いて、EGFR, ERK, Akt, I B の蛋白発現とリン酸化を観察することで、シグナル伝達関連因子の発現およびその活性化を検討する。アポトーシスに関しては、poly ADP-ribose polymerase (PARP)抗体を用いた western blotting と DeadEnd Fluorometric TUNEL system を用いた免疫蛍光染色により検討する。

- (4) Gefitinib による DNA repair 阻害の検討

PCR-based DNA damage assay(PCR stop assay)による検討を行う。シスプラチン 200 μ M を1時間投与し、その後 vehicle(EMDM)を投与する群と gefitinib (10 μ M) を投与する群に分けて、3、6、16時間後細胞を回収する。DNeasy tissue kit を用いて DNA

を抽出し、濃度を調整する。シスプラチンにより障害を与えられる hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene に対するプライマーを作成し、PCR を行う。DNA に障害があると PCR 産物が減少する。通常シスプラチン投与後 16 時間で DNA の repair は完了するが、gefitinib がこれを阻害するか検討する。

(5) DNA 修復酵素 DNA-dependent protein kinase(PK)の発現の検討

上記の細胞に、 vehicle (DMEM)、シスプラチン(200 μ M) gefitinib、シスプラチン+ gefitinib を投与し、24 時間培養する。DNA-PK の発現を RT-PCR 法で検討する。

***In Vivo* での検討 (ヌードマウス移植系を用いた検討)**

(1) シスプラチン耐性マウス卵巣癌モデルの作成と gefitinib 併用による抗癌剤感受性の変化についての検討

5~7 週令のメスヌードマウスの腹腔内に Caov-3 細胞 10^6 個を注入して以下の実験を行う。投与 2 週間後に腫瘍が形成された時点で、 vehicle (PBS)、シスプラチン(5mg/kg, 1 回/week) gefitinib (1.25mg/day, 1 回/week) シスプラチン+gefitinib を 4 週間腹腔内投与する。その後、炭酸ガスにて安楽死させ、腹囲を計測後開腹し、腹水量及び腫瘍の大きさを計測し、上記 3 群で抗癌剤感受性を比較検討する。

(2) *In vivo* におけるシグナル伝達関連因子の発現とアポトーシスの検討

上記の実験において形成された腫瘍

を 4% paraformaldehyde で固定し、パラフィン切片を作成する。免疫組織染色にて EGFR, ERK, Akt の蛋白発現とリン酸化を観察し、シグナル伝達関連因子の発現およびその活性化を検討する。また、TUNEL 法にてアポトーシスを定量化する。

(3) *In vivo* における DNA 修復酵素

DNA-PK の発現の検討

上記(2)の実験と同様にと免疫蛍光組織染色によって DNA-PK の蛋白発現を観察して定量化する。

4 . 研究成果

***In Vitro* での検討**

(1) EGFR 受容体の発現

EGFR 受容体ファミリー (EGFR, HER2, HER3)の発現を図 1 に示す。

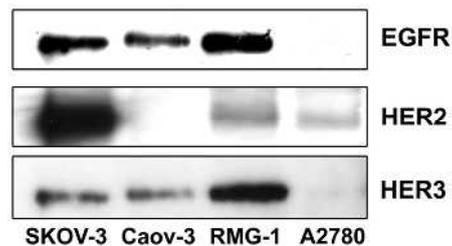


図 1

(2) シスプラチンと gefitinib 単独または併用投与時の cell viability

すべての cell line においてシスプラチンと gefitinib の併用により、シスプラチン単独に比べて cell viability がさらに抑制された。シスプラチンが 100μ M の濃度では、シスプラチンの毒性が強く、相加効果は認めなかった。(図 2)

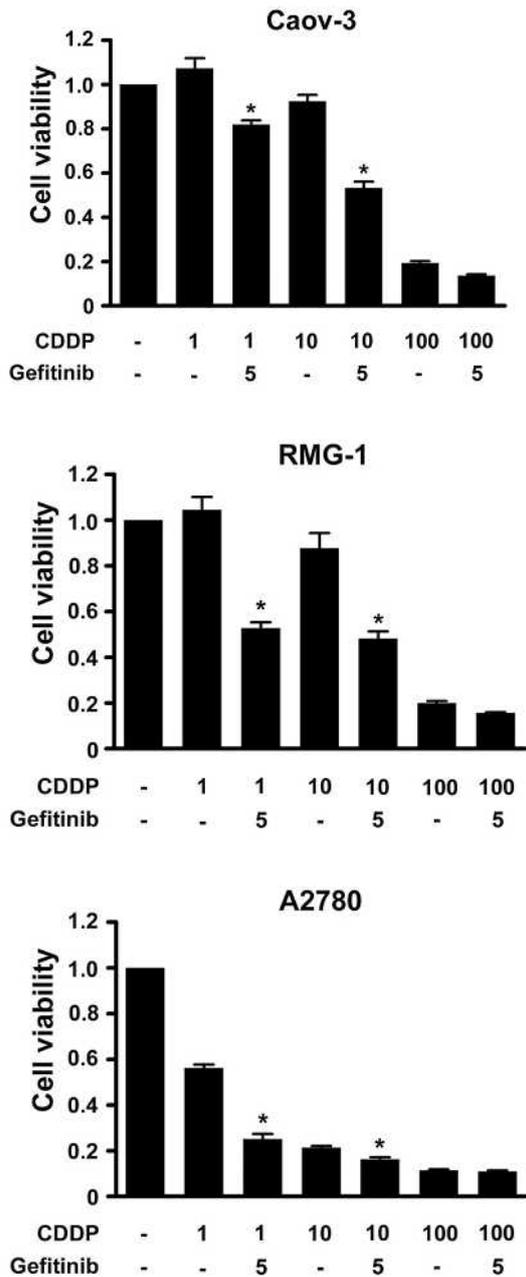


図 2

(3)シスプラチンと gefitinib 単独または併用投与時の apoptosis の発現

シスプラチン耐性株である Caov-3, RMG-1 ではシスプラチン単独での apoptosis の発現は認めなかったが、gefitinib または PI3Kinase inhibitor の LY294002, ERK inhibitor の PD98052 を併用することで apoptosis の発現を認めた。また、シスプラチン感受性の A2780 ではシスプラチン単独

でも apoptosis の発現を認めたが、gefitinib, LY,または PD を併用することで apoptosis の増強を認めた (図 3)。

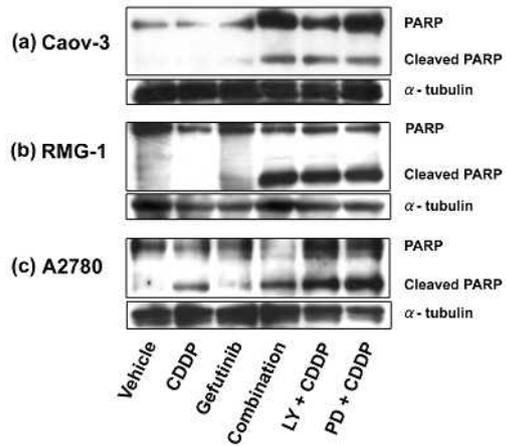


図 3

また、signal (EGFR, Akt, ERK)の活性化に関しては gefitinib が抑制することを western blotting 法にて確認した。

(4)gefitinib による DNA 修復機構阻害効果 PCR-based DNA damage assay(PCR stop assay)によって検討を行った。すべての cell line においてシスプラチンによる DNA 損傷から 16 時間後には、回復を認めた。しかし、gefitinib の存在下ではこの修復機構が抑えられ、時間が経過しても DNA 損傷からの回復を認めなかった (図 4)。

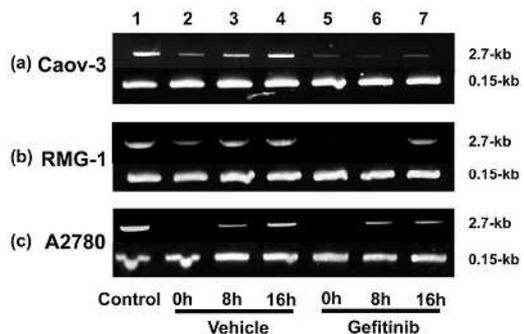


図 4

(5) DNA 修復酵素 DNA-dependent protein kinase(PK)の発現の検討

(4)の実験結果より、gefitinib が DNA 修復酵素である DNA-PK の発現を抑制するのではないかと予測し、その発現を RT-PCR 法で検討した。

シスプラチン耐性株ではシスプラチン投与により DNA-PK の発現が vehicle(control) に比べて増強するが、その発現は gefitinib を併用することにより抑制された。

シスプラチン感受性の A2780 ではシスプラチンを投与しても DNA-PK の発現増強は認めなかったが、gefitinib によりその basal な発現は抑制された (図 5)。

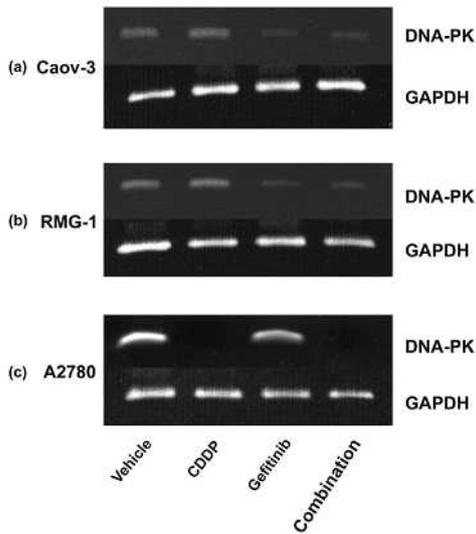


図 5

In Vivoでの検討

(1)シスプラチン耐性マウス卵巣癌モデルの作成と gefitinib 併用による抗癌剤感受性の変化についての検討
シスプラチン、gefitinib の併用により腹水産生量、腫瘍重量ともにそれぞれの単投与に比べて著しく抑制された (図 6)。

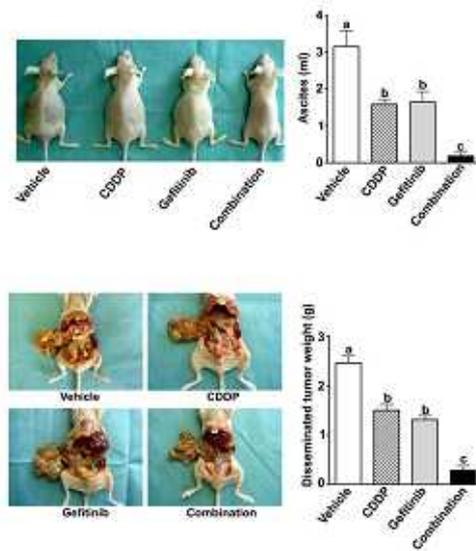


図 6

(2) *In vivo*におけるシグナル伝達関連因子の発現とアポトーシスの検討

シスプラチン、gefitinib の併用により apoptosis の著しい増強を認めた。また cell proliferation のマーカーである Ki67 も併用により著しく抑制された (図 7)。

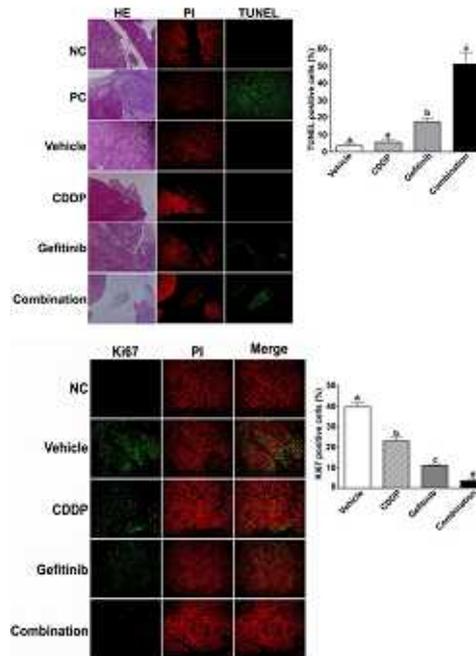


図 7

さらに signal (EGFR, Akt, ERK)につい

でも同様に免疫蛍光染色にて検討をおこなったが、gefitinibにより、*in vivo*においてもその活性化は抑制されていることを確認した。

(3) *In vivo*におけるDNA修復酵素 DNA-PKの発現の検討

シスプラチンにより誘導されるDNA-PKの発現はgefitinibにより抑制された(図7)。

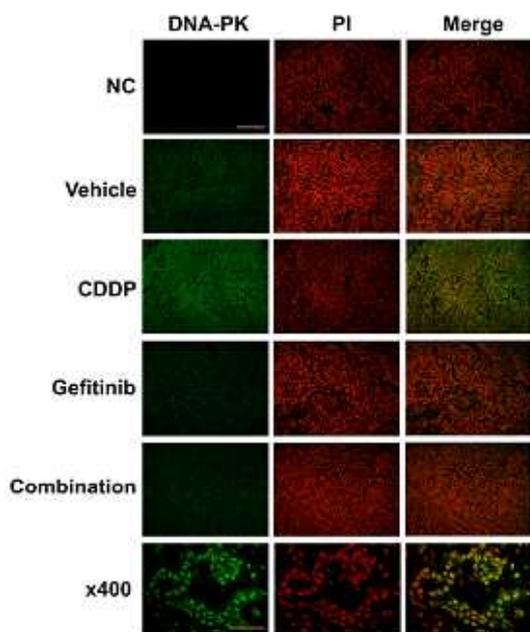


図7

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1件)

高田恵子、太田剛、倉智博久

Fasudil-induced hypoxia-inducible factor 1-alpha degradation disrupts a hypoxia-driven vascular endothelial growth factor autocrine mechanism in endothelial cells

Molecular cancer therapeutics 2008;7(6):1551-1561 (査読有)

[学会発表](計1件)

太田剛

卵巣癌細胞における Gefitinib によるシスプラチンの抗腫瘍効果増強作用についての検討

2008年4月13日 パシフィコ横浜

[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

太田 剛 (OHTA TSUYOSHI)

山形大学・医学部・助教

研究者番号: 50375341

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

