

平成 21 年 4 月 28 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007-2008

課題番号：19890125

研究課題名（和文） 卵巣明細胞癌に対する mTOR を標的とした分子標的治療の可能性の検討

研究課題名（英文） mTOR as a therapeutic target in clear cell carcinoma of the ovary.

研究代表者

馬淵 誠士 (MABUCHI SEIJI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00452441

研究成果の概要：

卵巣明細胞腺癌は上皮性卵巣癌のなかでも極めて予後不良な組織型と認識されている。また欧米と比べ日本において高頻度に発生することが知られており、本邦において非常に注目されている疾患である。今回、科学研究費補助金を用いて、筆頭研究者を中心に、米国 Fox Chase Cancer Center との共同研究により、卵巣明細胞腺癌において mTOR が高頻度に活性化していること、mTOR がシスプラチン耐性化に関与することを証明した。また mTOR をターゲットとした分子標的治療を行うと明細胞腺癌の発育が有意に抑制されること、明細胞腺癌のシスプラチン耐性が解除されること、の 5 点を証明し、米国癌専門雑誌に報告した (Clin Cancer Res, under revision)。

また、mTOR の下流に存在する VEGF が卵巣癌のシスプラチン感受性およびシスプラチン投与後の再発に重要な役割を果たすこと、VEGF 阻害剤である Bevacizumab がシスプラチンの抗腫瘍効果を有意に増強すること、またシスプラチンによる寛解導入療法後に Bevacizumab を用いた卵巣癌の維持療法（シスプラチンによる寛解導入後の維持療法）を行うと、生存期間が有意に延長できることを証明し、同じく Clin Cancer Res に報告した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,330,000	0	1,330,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：卵巣明細胞腺癌、分子標的治療、mTOR, VEGF

1. 研究開始当初の背景  
卵巣明細胞腺癌は卵巣癌治療の Key drug で

あるシスプラチンに耐性を示し、上皮性卵巣癌のなかでも極めて予後不良な組織型と認

識されている。また欧米と比べ日本において高頻度に発生することが知られており、本邦において非常に注目されている疾患カテゴリーである。卵巣明細胞腺癌が予後不良である最大の理由は、現在上皮性卵巣癌の Key Drug と認識されているプラチナ製剤に耐性を示すためと認識されている。これまでの報告によると、従来の標準治療であった CAP 療法 ( cisplatin+cyclophosphamide+adriamycin) の奏効率は 11%程度、また現在の標準治療である TC 療法 (carboplatin+paclitaxel)の奏効率も 20-30%との報告が多く、他の組織型と比べ、明らかにプラチナ製剤への耐性を示している。

卵巣明細胞癌の予後改善のためには、新規の殺細胞性抗癌剤の開発だけでなく、卵巣明細胞腺癌の抗癌剤耐性に関与する分子の同定と、その分子を標的とした治療の開発が必須であると考え。我々は 2000 年より上皮性卵巣癌の抗癌剤耐性のメカニズムとして、細胞内生存シグナルの代表格である AKT-mTOR Signaling pathway に着目し研究を行ってきた。結果として、卵巣癌において AKT-mTOR Signaling pathway が高頻度に活性化し、治療のターゲットとなりうることを証明した。しかし、我々がこれまでに行った研究対象に卵巣明細胞腺癌は含まれておらず、卵巣明細胞腺癌における AKT-mTOR Signaling pathway の役割は不明であった。

最近、腎細胞癌 (大部分が明細胞腺癌)において、細胞内シグナルの一つ mTOR が高頻度に活性化し、mTOR をターゲットとした分子標的治療が患者の予後を改善する可能性があるとの臨床試験の結果が報告された。腎臓に発生する明細胞腺癌は卵巣明細胞腺癌と非常によく似ていることが cDNA マイクロアレイを用いた最近の研究によって証明されている。そこで我々は、卵巣明細胞腺癌における mTOR の活性化の頻度、その抗癌剤耐性への関与、mTOR をターゲットとした分子標的治療の有効性の検討を行うこととした。

## 2. 研究の目的

卵巣明細胞腺癌における(1) mTOR の活性化頻度、他の組織型との活性化頻度の違い、(2) シスプラチン感受性への関与、(3) mTOR をターゲットとした分子標的治療の有効性の検討、(4) mTOR の下流に存在する血管新生促進因子 VEGF が卵巣明細胞腺癌の治療標的となりうるかの検討、以上の検討により、卵巣明細胞腺癌患者の予後改善を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 卵巣明細胞腺癌におけるmTORの活性化の検討。

大阪大学および関連病院にて初回手術療法の際に摘出し保存されたヒト卵巣癌検体 (卵巣明細胞腺癌 50 検体+他の組織型の上皮性卵巣癌 50 検体の合計 100 検体)を用い、Tissue Microarray (TMA)を作成。この作業には米国 Fox Chase Cancer Center の協力を得た。

続いて、作成した TMA を用いて mTOR の活性化を免疫組織染色法にて検討。染色度を正確に判定するために、Fox Chase Cancer Center の病理学者である Andres J. Klein-Szanto 博士に染色度のスコアリングを依頼し、卵巣明細胞腺癌における mTOR の活性化頻度、また他の組織型との違いを統計学的手法を用いて検討した。

### (2) 卵巣明細胞腺癌のシスプラチン耐性にmTORが関与するかの検討。

卵巣明細胞腺癌のシスプラチン耐性に mTOR が関与するかを検討するため、まず 5 種類の卵巣明細胞腺癌細胞株を用いて、これらをシスプラチンに持続暴露させることによりシスプラチン耐性株を樹立した。樹立したシスプラチン耐性株と親株 (感受性株)を用い、mTOR の活性化の違いを Western blotting 法で比較検討することにより、mTOR がシスプラチン耐性化に関与するかを検討した。

### (3) mTORをターゲットとした分子標的治療の有効性の検討。

最近、いくつかの mTOR 阻害剤が開発され、現在欧米において大規模臨床試験の段階がなされている。まず、これらの新規 mTOR 阻害剤の一つ RAD001 の提供を Novartis 社に依頼し、研究への使用許可を得た。続いて提供を受けた新規 mTOR 阻害剤である RAD001 を用い、この阻害剤のシスプラチン感受性卵巣明細胞腺癌に対する抗腫瘍効果を In vitro では MTS Assay、また In vivo ではヌードマウスを用いた研究により検討した。続いて、シスプラチンに耐性を獲得した卵巣明細胞腺癌に対する RAD001 の抗腫瘍効果を同様の方法で検討した。

### (4) 卵巣明細胞腺癌のシスプラチン感受性、にVEGFが関与するかの検討。

mTOR の下流には、腫瘍血管の新生に中心的な役割を果たす VEGF が存在することが知られている。報告によりばらつきはあるが、卵巣癌における VEGF の発現率は 50-90%とされており、予後と相関することが証明されている。また、VEGF が卵巣癌患者の腹膜播種や腹水産生を促進することも報告されてい

る。上皮性卵巣癌の約75%を占める進行癌の多くが、播種巣や腹水を伴うことから、BevacizumabをはじめとするVEGF阻害剤は、進行期卵巣癌の合理的な治療薬になりうると期待されている。そこで我々は、VEGFが卵巣癌のシスプラチン耐性・再発に関与するのか、またmTOR阻害剤だけでなく、さらに下流のVEGFを阻害することが卵巣癌の予後改善に寄与するかを検討するため、抗VEGF抗体(VEGF阻害剤)であるBevacizumabを使用し、ヌードマウスモデルを用いた研究を行った。

#### 4. 研究成果

卵巣明細胞腺癌において、(1) mTORが高頻度に活性化していること、(2) 卵巣明細胞腺癌におけるmTORの活性化頻度は、その他の組織型と比べて有意に高頻度であることを証明した。これらの事実はmTORが特に卵巣明細胞腺癌において治療標的となりうることを示している。

続いて、(3) シスプラチン耐性細胞と感受性細胞を比較する実験により、シスプラチン耐性細胞では、感受性細胞と比べて有意に強くmTORが活性化していることを証明した。この結果は、シスプラチン耐性卵巣明細胞腺癌がmTORをターゲットとした分子標的治療に強い感受性を示す可能性があることを示している。

これらの結果を受けて、続いて卵巣明細胞腺癌に対するmTOR阻害剤の抗腫瘍効果を検討した。新規mTOR阻害剤であるRAD001を用いてmTORをターゲットとした分子標的治療を行うと、(4) シスプラチン感受性卵巣明細胞腺癌の発育が有意に抑制されることが示された。

また、シスプラチン耐性卵巣明細胞腺癌に対してRAD001を投与し、mTORを抑制したところ、(5) RAD001がシスプラチン耐性細胞に対して強い抗腫瘍効果を示し、その効果はシスプラチン感受性卵巣明細胞腺癌に対する効果より有意に強いこと、つまりシスプラチン耐性卵巣明細胞腺癌ほどRAD001に感受性を示すことが示された。実際、シスプラチン投与後に再発した卵巣明細胞腺癌は非常に治療抵抗性であり、最近の報告ではセカンドラインの抗癌剤の奏効率は1%とされており、臨床の現場で大きな問題となっている。RAD001がシスプラチン感受性細胞だけでなく、耐性細胞に対しても強い抗腫瘍効果を有することを示した我々の結果は、卵巣明細胞腺癌の予後改善に寄与する可能性があると考えられ、米国癌専門雑誌に報告した(Clin Cancer Res, under revision)。また、これらの研究成果は米国において高く評価され、共同研究者であるRussell J. Schilder

博士およびSouthwest Oncology Group (SWOG)が中心となって、卵巣癌に対するRAD001とプラチナ製剤との併用療法のPhase II臨床試験が始まることになった。

またVEGFに焦点をあてた研究では、(1) Bevacizumabをシスプラチンと併用投与するとシスプラチン単独投与と比べて有意に抗腫瘍効果が増強されマウスの生存期間が延長すること、(2) シスプラチンによる寛解導入後にBevacizumabを維持療法薬として長期間にわたって投与してVEGFを阻害すると、再発が有意に抑制され生存期間が有意に延長できることを示した。これら結果は卵巣癌のシスプラチン感受性や、シスプラチン投与後の再発にmTORの下流に存在するVEGFが重要な役割を果たすことを示している。実際の臨床において、これまでに米国において、卵巣癌に対する3つのPhase II臨床試験が完了している。またこれらのPhase II臨床試験における良好な結果を受けて、二つのPhase III試験がデザインされ現在進行中である。Phase III臨床試験の一つGOG218(米国Gynecologic Oncology Groupによる大規模臨床試験)は、進行卵巣癌を対象に、標準治療であるパクリタキセル/カルボプラチンとBevacizumabとの併用効果を検討すると同時に、寛解導入後にBevacizumabを長期にわたって投与し、維持療法の効果も同時に検討することを目的としており、我々の研究とほぼ同じデザインとなっている。今回の我々の基礎的研究の成果は、この臨床試験GOG218の重要性を示す結果として認識され、米国癌専門雑誌Clin Cancer Resに掲載された。

#### 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4件)

すべて査読有

- ① Mabuchi S, Morishige K, Fujita M, Tsutsui T, Sakata M, Enomoto T, Kimura T. The activity of carboplatin and paclitaxel for recurrent cervical cancer after definitive radiotherapy. *Gynecol Oncol*. 2009;113:200-4.
- ② Muraji M, Mabuchi S, Hisamoto K, Muranishi M, Kanagawa T, Nishio Y, Kimura T. Cesarean scar pregnancies successfully treated with methotrexate. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2009 in press.

- ③ Mabuchi S, Terai Y, Morishige K, Tanabe-Kimura A, Sasaki H, Kanemura M, Tsunetoh S, Tanaka Y, Sakata M, Burger RA, Kimura T, Ohmichi M. Maintenance treatment with bevacizumab prolongs survival in an in vivo ovarian cancer model. Clin Cancer Res. 2008;14:7781-9.
- ④ 馬淵誠士、森重健一郎、木村正 卵巣癌が卵における血管新生抑制療法臨床婦人科産科 2008 ; 62 : 1339-1345

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

馬淵 誠士 (MABUCHI SEIJI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：00452441

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者