

機関番号：14401
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21890130
 研究課題名（和文） 卵巣癌における、腫瘍の低酸素微小環境がもたらす抗癌剤耐性機構の解明
 研究課題名（英文） Analysis of anticancer drug-resistant ovarian cancer cells under hypoxic tumor microenvironment
 研究代表者
 林 正美 (HAYASHI MASAMI)
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：00551748

研究成果の概要（和文）：

パクリタキセル耐性卵巣癌細胞株では、その感受性株と比較してAktなかでもAkt2が高発現していること、またHIF-2 α も高発現していることを証明した。また、Aktのシグナル伝達経路にあるmTORが、パクリタキセル耐性卵巣癌細胞では活性化していることを証明した。さらに、Akt2を特異的に抑制すると、パクリタキセル耐性卵巣癌の発育が有意に抑制されることをヌードマウスにて証明し、パクリタキセル耐性卵巣癌の治療にAkt2およびHIF-2 α に対する分子標的治療が有用となりうる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Paclitaxel-resistant ovarian cancer cells showed the activation of Akt and significantly higher levels of Akt2 expression compared with paclitaxel-sensitive cells. An HIF-2 α expression was also higher in paclitaxel-resistant cells than in paclitaxel-sensitive cells. We next examined the significance of Akt2 in paclitaxel-resistant *in vivo* tumor growth by selectively inhibiting Akt2. An siRNA targeting Akt2 inhibited ovarian tumor growth in nude mice. These results indicated molecular target treatment against either Akt2 or HIF-2 α would be useful for the paclitaxel-resistant ovarian cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：婦人科腫瘍学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：卵巣癌、抗癌剤耐性、Akt、mTOR

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は、本邦で年間約8000人が発症し、その数は乳癌と同様、年々増加傾向にある。近年、初回化学療法としてパクリタキセル＋カルボプラチンという標準治療が確立されて以降、卵巣癌の奏功率は80%を上回るまでになったが、大半は18ヶ月以内に再発をきたし、未だ死亡率では婦人科癌では最も高く、発症患者の約3分の2が死亡に到る難治性の癌である。

固形癌の顕著な特徴として“低酸素微小環境”が近年注目されてきている。癌細胞は無秩序に増殖するため、固形癌の病巣内は十分な酸素が行き渡らず、一部の癌細胞は必ず低酸素環境にさらされる、というものである。癌におけるこの低酸素という微小環境(tumor microenvironment)のもとで、癌細胞は化学療法、放射線療法に対する抵抗性を獲得する。したがって、この低酸素微小環境下での治療抵抗性獲得を標的とした治療は、多くの癌種において有望な治療戦略として注目されている。低酸素下で活性化される転写因子 hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)の存在は1995年に発見され、以後、その標的遺伝子の活性化と癌の増大・転移・治療抵抗性との関与が報告されつつある。HIF-1 α に一次構造上類似性が高い HIF-2 α も低酸素下で活性化される転写因子としてその後新たに確認された。癌における HIF-2 α の意義については、HIF-1 α と比べると報告は未だ少ないが、主に、標的遺伝子である VEGF を活性化させて血管新生を促し癌の増大をもたらす予後不良因子となりうることで近年報告されてきている。これまで卵巣癌における HIF-2 α の発現や臨床的意義に関する報告はなされていない。

mTOR (mammalian target of rapamycin)は raptor-mTOR (TORC1) と rictor-mTOR (TORC2)という2種類の複合体として存在する、セリン・スレオニン蛋白質リン酸化酵素で、Aktをはじめとする上流のシグナルにより活性化され、細胞の分裂や成長、生存を制御している。最近癌においても、癌細胞の増殖や血管新生を促進することが報告され、癌治療の分子標的として注目されている。HIF と mTOR の関係については、HIF-1 α の発現が TORC1 により促進されるという報告はあったが、HIF-2 α と mTOR についてはこれまで報告がなかった。2008年末、HIF-2 α を恒常的に発現している腎臓透明細胞癌において、その HIF-2 α の発現は mTOR の特に TORC2 に依存していることが初めて明らかとなった。さらに、TORC2 の

上流シグナルと考えられる Akt に関しては、3つのアイソフォームのうち、とくに Akt2 が HIF-2 α の発現を調節していることが初めて報告された。

Akt2 は卵巣癌、とくにパクリタキセル抵抗性の卵巣癌細胞株で発現が増加していることが2000年代後半に報告されたが、その特異的な発現のもつ意義については未だ明らかとなっていない。

卵巣癌の予後の改善のためには、抗癌剤抵抗性獲得の機序解明とそれに基づく新しい治療薬の確立が求められる。そこで以上の知見に基づき、我々は、パクリタキセル抵抗性難治性卵巣癌の予後改善を目指すため、Akt2 特異的発現増加をもたらす臨床的意義について、TORC2、HIF-2 α に焦点を当てて検討することを計画し、本研究を開始した。

2. 研究の目的

卵巣癌における Akt2 高発現と TORC2、HIF-2 α の発現との関連性の有無を検討し、パクリタキセル耐性卵巣癌に対する新たな抗腫瘍薬のターゲットとしての可能性を見出すことを目指した研究を行う。

(1)卵巣癌における Akt および HIF-2 α の発現量と、パクリタキセル抵抗性との関連性について。耐性株では Akt や HIF-2 α は過剰発現しているのか。

(2)パクリタキセル耐性卵巣癌細胞と mTOR の活性化には関連があるのか。

(3)Akt をターゲットとした分子標的治療の有効性について。Akt を特異的に阻害すると、パクリタキセル耐性卵巣癌細胞の発育は阻害されるのか。

これらを検証することとした。

3. 研究の方法

(1)パクリタキセルに治療抵抗性の再発卵巣癌モデルの作成。

卵巣癌では多くの場合、最初はパクリタキセルに感受性を示すが、後に再発するという経過をたどる。そこでまずこの経過のモデルとなる卵巣癌細胞株を作成するため、

卵巣癌細胞株にパクリタキセルを継続的に投与し、大半が死滅していく中で生き残ったコロニーを採取し、パクリタキセル耐性卵巣癌細胞株を樹立した。

(2)パクリタキセル耐性化にAktは関与しているのか、の検討。

パクリタキセル感受性卵巣癌細胞株とパクリタキセル耐性株を用い、Aktの発現量および活性化をWestern blot法にて比較検討した。さらにAktのアイソフォームについて、Akt2の発現量もWestern blot法にて比較検討した。

(3)パクリタキセル耐性化のシグナル伝達の解析。

Aktのシグナル伝達経路にあり、細胞増殖・血管新生に影響を及ぼすことが知られているmTORの活性化についても、Western blot法を用いて、パクリタキセル耐性株と感受性株で比較検討した。さらに、mTORの活性化が抗癌剤耐性に関わる細胞死のメカニズムを検討するため、mTOR阻害による細胞増殖能の変動をMTTアッセイおよびcell countingにて検討した。また、mTOR抑制によりオートファジーが影響を及ぼすかについても、免疫蛍光染色およびWestern blot法で検討することとした。

(4)HIF-2 α とパクリタキセル耐性の関連性の検討。

腫瘍の“低酸素微小環境”と、パクリタキセル耐性、との関連を調べるため、パクリタキセル耐性卵巣癌細胞株と感受性株でのHIF-2 α の発現量を比較検討した。

(5)Akt2を抑制することにより、卵巣癌の発育を阻害することができるのか、の検討。

Akt2の発現を抑制させた卵巣癌細胞株を作成するため、卵巣癌細胞にAkt2特異的siRNAウイルスベクターを感染導入させた。対照として、コントロールsiRNAウイルスベクターを感染導入した卵巣癌細胞を作成した。これらをヌードマウスに腹腔内投与した。それぞれのマウスの腫瘍重量を測定し、Akt2抑制による抗腫瘍効果の有無を検討した。

4. 研究成果

パクリタキセル耐性卵巣癌細胞株と感受性卵巣癌細胞株を比較すると、(1)耐性株ではAktが活性化していた。そのアイソフォームとしてAkt2も耐性株で高発現していることが分かった。

また、パクリタキセル耐性卵巣癌細胞株では(2)mTORが活性化していた。

(3)パクリタキセル耐性卵巣癌細胞株において、mTORを阻害すると、細胞増殖が抑制されるがオートファジーには影響を及ぼさないことが判明した。

(4)パクリタキセル耐性卵巣癌細胞株ではHIF-2 α の発現量がパクリタキセル感受性卵巣癌細胞株と比較して高かった。

(5)パクリタキセル耐性卵巣癌細胞株においてAkt2をsiRNAウイルスベクターで抑制すると、卵巣癌の腫瘍発育が抑制されることを示した。

これらのことより、HIF-2 α およびAkt2をターゲットとした分子標的治療がパクリタキセル耐性卵巣癌に対して有用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4件)

1. Hayashi M, Yoo YG, Christensen J, Huang LE. Requirement of evading apoptosis for HIF-1 α -induced malignant progression in mouse cells. Cell Cycle. in press, 2011

2. Mabuchi S, Kawase C, Altomare DA, Morishige K, Hayashi M, Sawada K, Ito K, Terai Y, Nishio Y, Klein-Szanto AJ, Burger RA, Ohmichi M, Testa JR, Kimura T. Vascular endothelial growth factor is a promising therapeutic target for the treatment of clear cell carcinoma of the ovary. Mol Cancer Ther 9:2411-22, 2010

3. Yoo YG, Hayashi M, Christensen J, Huang LE. An essential role of the HIF-1 α -c-Myc axis in malignant progression. Ann N Y Acad Sci. 1177:198-204, 2009

4. Mabuchi S, Kawase C, Altomare DA, Morishige K, Sawada K, Hayashi M, Tsujimoto M, Yamoto M, Klein-Szanto AJ, Schilder RJ, Ohmichi M, Testa JR, Kimura T. mTOR is a promising therapeutic target both in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant clear cell carcinoma of the ovary. Clin Cancer Res. 15:5404-13, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 正美 (HAYASHI MASAMI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：00551748

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：