

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 21 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791532

研究課題名（和文） 卵巣粘液性腺癌の細胞生物学的特性の解明と抗癌剤耐性克服の試み

研究課題名（英文） Basic Research for elucidation of chemo-resistance in mucinous adenocarcinoma cell.

研究代表者 佐藤 慎也 (SATO SHINYA)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10423261

研究成果の概要（和文）：

- ① シスプラチンと PI3K 阻害剤の併用は細胞増殖抑制において相加効果を示した。一方、MEK 阻害剤の併用はむしろ拮抗作用を示した。MEK/ERK 経路の賦活作用のある PMA をシスプラチンと併用すると、G1 期の細胞を増加させ、アポトーシス誘導を示した。シスプラチン耐性細胞では、シスプラチンと PMA の併用投与により細胞増殖抑制の相乗効果が認められた。
- ② 腫瘍細胞を移植したヌードマウスを用いた検討において、シスプラチンと PMA の併用群で生存期間を有意に延長した。

研究成果の概要（英文）：

- ① A negligible increase in inhibition of cell growth induced by CDDP was detected in the presence of PI3K inhibitor in all cell lines. We observed a decrease the cytotoxicity of CDDP when CDDP was combined with MEK inhibitor. Interestingly, cell growth was dramatically suppressed when CDDP was combined with PMA in all the cells that were resistant to CDDP. After treatment with CDDP and PMA, the proportion of the cells in G0/G1 phase and G2/M phase were decreased, and the proportion of cells in the S-phase fraction was dramatically increased, and then the cell cycle distribution was shifted to the subG₁ phase in the CDDP resistant cells.
- ② Treatment with CDDP and PMA prolonged survival in nude mice bearing ovarian cancer cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

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：婦人科腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

上皮性卵巣癌の罹患率および訂正死亡率は増加傾向にある。卵巣癌に対するタキサン化合物とプラチナ製剤との併用化学療法は標準的化学療法として行われており、高い奏効率を示しその短期予後を改善した。しかしながら、長期予後の改善には至っていない。卵巣癌治療において薬剤耐性は重要な予後因子であり、その克服が切望されている。米国 Gynecologic Oncology Group による大規模臨床試験 GOG-182 では新規抗癌剤の併用療法が比較され、卵巣癌化学療法におけるブレイクスルーが期待された。しかし現在の標準的な初回選択薬剤である TC 療法（パクリタキセル、カルボプラチン併用療法）をしのぐ効果は認められなかった。また組織型別の検討により、漿液性腺癌に比して粘液性腺癌や明細胞腺癌では標準的化学療法の奏効率が低いことが明らかとなってきた。予後改善のためには、抗癌剤感受性の増強や新たな治療法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

上皮性卵巣癌において腫瘍の生物学的特性に基づいた治療の個別化や組織型別の治療法選択の必要性が指摘されている。本研究では卵巣癌細胞を用いて、その生物学的特性と抗癌剤耐性機序を明らかにする。さらに基礎的研究に基づき、粘液性卵巣癌に対する新たな治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

卵巣癌由来細胞を用いてこれまでに他癌種で確認されている抗癌剤耐性遺伝子の発現プロファイルを漿液性腺癌細胞と比較検討する。細胞増殖能や抗癌剤感受性への関与が示唆される遺伝子を検索する。その結果より関連が示唆される遺伝子を選択し、遺伝子発現レベルと抗癌剤感受性との関連を検討する。検討により得られた卵巣粘液性腺癌の細胞生物学特性を、臨床検体より得られた組織を用いて、化学療法感受性との関連について検討する。免疫組織化学を用いて関連蛋白発現を検索する。粘液性腺癌組織より培養した粘液性腺癌細胞を用いて遺伝子 knock down による感受性の変化を検討する。

4. 研究成果

上皮性卵巣癌において粘液性腺癌や明細胞腺癌は漿液性腺癌に比較して抗癌剤感受性が低く予後不良と考えられている。腫瘍の生物学的特性に基づいた治

療の個別化や組織型別の治療法選択の必要性が指摘されている。粘液性卵巣癌の生物学的特性と抗癌剤耐性機序を明らかにして、新たな治療法を開発することを目的とした。卵巣癌細胞株 (KF, KFr, SK-OV-3, SHIN-3, TU-OS-3, TU-OS-4, KOC-2S) を用いて、MTT assay によりシスプラチンの IC_{50} を算出した。シスプラチン耐性誘導株である KFr より高い IC_{50} を示す細胞株をシスプラチン低感受性株として以下の検討をおこなった。

Western blot 法により各細胞株のシグナル伝達関連蛋白 (MEK, p-MEK, ERK, p-ERK, Akt, p-Akt) の発現を検討した結果、全ての細胞株において p-MEK, p-ERK, p-Akt 発現が観察された。そこでシグナル伝達作用薬を用いて、シスプラチンとの併用効果を検索した。PI3K 阻害薬 LY294002 によりシスプラチン感受性は軽度増強したが、MEK 阻害薬 PD98059 によりシスプラチン感受性の低下がみられた。一方、MRK/ERK 賦活剤 PMA を併用すると低感受性株で有意なシスプラチン感受性増強が得られた。低感受性株では、シスプラチンと PMA 併用添加群で p-ERK, 活性型 Caspase-9 の発現が増強していた。フローサイトメトリーによる細胞周期の検討では、PMA により S 期細胞比率の増加がみられ、シスプラチンと PMA 併用添加群で著明なアポトーシス誘導が観察された。卵巣癌細胞株を移植したマウスで癌性腹膜炎モデルを作成し、各薬剤を腹腔内投与した結果、シスプラチンと PMA 併用添加は有意に生存期間を延長した。以上より、上皮性卵巣癌のシスプラチン耐性克服には ERK 経路の賦活が有効であ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 Sato S, Itamochi H. Bevacizumab and ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2012; 24(1): 8-13. 査読あり
- ② Itamochi H, Oishi T, Shimada M, Sato S, Uegaki K, Naniwa J, Sato S, Nonaka M, Terakawa N, Kigawa J, Harada T. Inhibiting the mTOR pathway synergistically enhances cytotoxicity in

ovarian cancer cells induced by etoposide through upregulation of c-Jun. 2011; 17(14): 4742-50. 査読あり

- ③ Sato S, Aoki D, Kobayashi H, Saito T, Nishimura R, Nagao T, Yaegashi N, Enomoto T, Kigawa J. Questionnaire survey of the current status of radical trachelectomy in Japan. *Int J Clin Oncol*. 2011; 16(2): 141-4. 査読あり
- ④ 佐藤慎也, 島田宗昭, 板持広明, 紀川純三. 婦人科がんに対する分子標的薬の現況. 2011; 103(2): 215-9. 査読なし

[学会発表] (計 17 件)

- ① 島田宗昭、藤原寛行、佐藤誠也、上垣憲雅、浪花 潤、佐藤慎也、大石徹郎、板持広明、竹井裕二、町田静生、鈴木光明、原田 省、紀川純三。濃度曲線下面積 (AUC) 予測式に基づくネダプラチン推奨投与量に関する第 I 相試験。第 49 回日本癌治療学会学術集会 (2011 年 10 月 27 日-29 日、名古屋市)
- ② 板持広明、大石徹郎、島田宗昭、佐藤慎也、上垣憲雅、浪花 潤、佐藤誠也、野中道子、工藤明子、寺川直樹、紀川純三、原田 省。卵巣癌に対する mTOR 阻害剤を用いた至適併用化学療法の探索。第 70 回日本癌学会学術総会 (2011 年 10 月 3 日-5 日、名古屋市)
- ③ 大石徹郎、板持広明、島田宗昭、佐藤慎也、上垣憲雅、浪花 潤、佐藤誠也、野中道子、工藤明子、寺川直樹、紀川純三、原田 省。卵巣明細胞腺癌における PI3K/mTOR 阻害剤 NVP-BEZ235 による増殖抑制効果の検討。第 70 回日本癌学会学術総会 (2011 年 10 月 3 日-5 日、名古屋市)
- ④ 野中道子、板持広明、川口稚恵、佐藤誠也、上垣憲雅、浪花 潤、佐藤慎也、島田宗昭、大石徹郎、寺川直樹、原田 省、紀川純三。上皮性卵巣癌に対するシグナル伝達作用薬を用いたシスプラチン耐性克服の試み。第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会 (2011 年 8 月 29 日-31 日、大阪市)
- ⑤ 板持広明、野中道子、佐藤誠也、上垣憲雅、浪花 潤、佐藤慎也、島田宗昭、大石徹郎、寺川直樹、原田 省。卵巣癌癌性腹膜炎モデルに対する mTOR 阻害剤を用いた至適併用化学療法の探索。第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会 (2011 年 8 月 29 日-31 日、大阪市)
- ⑥ 野中道子、板持広明、川口稚恵、佐藤誠也、上垣憲雅、浪花 潤、佐藤慎也、島田宗昭、大石徹郎、寺川直樹、原田 省、紀川純三。上皮性卵巣癌に対するシグナル伝達作用薬を用いたシスプラチン耐性克服の試み。第 10 回日本婦人科分子標的研究会 (2011 年 7 月 2 日、松江市)
- ⑦ Itamochi H, Nonaka M, Sato S, Uegaki K, Naniwa J, Sato S, Shimada M, Oishi T, Terakawa N, Kigawa J, Harada T. Inhibiting the mTOR pathway synergistically enhances etoposide-induced cytotoxicity by upregulating c-Jun in ovarian cancer cell. 102th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(2011/4/2-4/6, Orlando)
- ⑧ Oishi T, Itamochi H, Nonaka M, Sato S, Naniwa J, Uegaki K, Sato S, Shimada M, Terakawa N, Harada T, Kigawa J. 102th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(2011/4/2-4/6, Orlando)
- ⑨ Itamochi H, Nonaka M, Kawaguchi W, Uegaki K, Naniwa J, Sato S, Shimada

M, Oishi T, Terakawa N, Harada T, Kigawa J. Activation of the MEK/ERK pathway may overcome the cisplatin-resistance in ovarian carcinoma cells. IGCS 13th Biennial Meeting (2010/10/23-10/26, Prague)

- ⑩ 大石徹郎、Chandra Bartholomeusz、野中道子、浪花 潤、上垣憲雅、佐藤慎也、島田宗昭、板持広明、寺川直樹、原田 省、紀川純三。卵巣明細胞腺癌に対する ERK を標的とした分子標的治療。第 69 回日本癌学会学術総会(2010 年 9 月 22 日-24 日、大阪市)
- ⑪ 野中道子、板持広明、川口稚恵、上垣憲雅、浪花 潤、佐藤慎也、島田宗昭、大石徹郎、寺川直樹、原田 省、紀川純三。上皮性卵巣癌に対するシグナル伝達作用薬を用いたシスプラチン耐性克服の試み。第 69 回日本癌学会学術総会(2010 年 9 月 22 日-24 日、大阪市)
- ⑫ 野中道子、板持広明、川口稚恵、上垣憲雅、浪花 潤、佐藤慎也、島田宗昭、大石徹郎、寺川直樹、原田 省、紀川純三。上皮性卵巣癌に対するシグナル伝達作用薬を用いたシスプラチン耐性克服の試み。第 63 回中国四産科婦人科学会総会ならびに学術講演会(2010 年 9 月 18 日-19 日、岡山市)
- ⑬ 野中道子、板持広明、川口稚恵、上垣憲雅、浪花 潤、佐藤慎也、島田宗昭、大石徹郎、寺川直樹、原田 省、紀川純三。上皮性卵巣癌に対するシグナル伝達作用薬を用いたシスプラチン耐性克服の試み。第 62 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会(2010 年 4 月 23 日-25 日、東京都)
- ⑭ 板持広明、野中道子、上垣憲雅、浪花 潤、佐藤慎也、島田宗昭、大石徹郎、寺川直樹、原田 省、紀川純三。上皮性卵巣癌

に対する mTOR 阻害剤を用いた至適併用化学療法探索。第 62 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会(2010 年 4 月 23 日-25 日、東京都)

- ⑮ 佐藤慎也、青木大輔、小林裕明、安藤正明、斎藤 豪、西村隆一郎、永野忠義、八重樫伸生、榎本隆之、紀川純三。本邦における広汎子宮頸部摘出術の現状(多施設アンケート調査結果)。第 62 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会(2010 年 4 月 23 日-25 日、東京都)
- ⑯ 大石徹郎、Chandra Bartholomeusz、野中道子、浪花 潤、上垣憲雅、佐藤慎也、島田宗昭、板持広明、原田 省、紀川純三、Naoto Ueno。卵巣明細胞腺癌に対する EGFR-ERK 経路を標的とした分子標的治療の検討。第 62 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会(2010 年 4 月 23 日-25 日、東京都)
- ⑰ Nonaka M, Itamochi H, Kawaguchi W, Uegaki K, Naniwa J, Sato S, Shimada M, Oishi T, Terakawa N, Kigawa J, Harada T. Activation of the ERK pathways overcome the cisplatin-resistance in ovarian carcinoma cells. 101th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (2010/4/17-4/21, Washington DC.)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 慎也 (SATO SHINYA)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10423261