

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2007 ~ 2008

課題番号:19791151

研究課題名(和文) 細胞周期に基づくタキサン化合物耐性機序の解明と耐性克服の試み

研究課題名(英文)

Elucidation and conquest of the taxane resistance based on cell cycle.

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:

- ① 漿液性卵巣癌において MEK 経路と PI3/Akt 経路の同時阻害は相乗的な抗腫瘍効果を示し、パクリタキセル感受性増強の可能性が示唆された。
- ② 5-FU とオキサリプラチンとの併用療法は、粘液性腺癌に対する有効な治療法の一つと考えられた。

交付額

(金額単位:円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,300,000 | 0 | 1,300,000 |
| 2008 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,200,000 | 270,000 | 2,470,000 |

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、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、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。近年、組織型別の検討により、漿液性腺癌に比して粘液性細胞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。卵巣癌においては、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。

2. 研究の目的

パクリタキセルはタキサン化合物のひとつであり、微小管の脱重合を阻害し抗腫瘍効果を示す。このことからパクリタキセルのアポトーシス誘導作用は主に紡錘体(M期)チェックポイントに関与すると考えられている。近年の研究により、M期チェックポイントによるM期停止やアポトーシスにはPI3K/Akt経路、p38 MAPK経路などのシグナル伝達経路が関与し、これらのシグナルのバランスにより制御されていることが明らかになってきた。また、これらの二つの経路の相互作用が指摘されている。

卵巣癌におけるパクリタキセル誘導アポトーシス、パクリタキセル耐性の機序を明らかとし、基礎的治験に基づいた耐性克服の新たな戦略をたてる。

3. 研究の方法

卵巣癌細胞株とパクリタキセル耐性卵巣癌細胞株を用いて細胞周期関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、抗癌剤耐性遺伝子の発現プロファイルを比較検討する。またMAPKおよびPI3K/Akt経路などの選択的シグナル伝達経路阻害剤を用いて、単剤また併用によるタキサン化合物の感受性増強を試みる。それぞれの細胞株において細胞周期関連蛋白、アポトーシス関連蛋白およびMAPKおよびPI3K/Akt関連蛋白の発現を検索する。パクリタキセル暴露や、MAPKおよびPI3K/Akt経路などの選択的シグナル伝達経路阻害剤を併用時の各蛋白発現の変化を観察する。同時にフローサイトメトリーにより薬剤暴露時の細胞周期分布を検索する。SCIDマウスに腫瘍

細胞を移植し、パクリタキセルと分子標的薬剤の併用効果について *in vivo* で検討する。さらに免疫組織化学にてアポトーシスを検出する。

卵巣癌細胞株を用いて、各種抗癌剤の感受性を検討する。実験系における薬剤濃度から算出したAUCと、臨床的投与量のAUCを比較し各種抗癌剤の単剤または併用による効果を検討した。それぞれの細胞株において細胞周期関連蛋白、アポトーシス関連蛋白およびDNA修復関連蛋白発現を検索する。SCIDマウスに腫瘍細胞を移植し、各種抗癌剤の併用効果について *in vivo* で検討する。

4. 研究成果

- ① 卵巣漿液性腺癌細胞株 (KF, SK-OV-3, SHIN-3), パクリタキセル耐性誘導株 (KFTx) を用いて以下の検討をおこなった。MTT assayによりパクリタキセルに対する Ic_{50} を算出した。さらにPI3K阻害剤であるLY284002 (LY), MAPK阻害剤PD98059 (PD) 添加による変化を検討した。LYおよびPDの添加ではパクリタキセル感受性の変化はほとんど認められなかった。しかしながら、LYとPDの同時添加では有意な細胞増殖抑制効果が得られた。Median effect法による検討で、LYとPDの併用効果はすべての細胞において相乗効果であることが確認された。Anenxin V染色とDNA ladderingの観察によりこれらの細胞におけるアポトーシスを確認した。
- ② Western blot法により細胞周期関連蛋白 (MEK, phospho-MEK, Akt, phospho-Akt) 発現を検討した。パクリタキセル暴露後にphospho-MEK発現はすべての細胞株で

増強した。LY および PD の添加によりそれぞれ phospho-Akt, phospho-MEK 発現が抑制された。PD 添加では phospho-Akt 発現の増強が認められた。

- ③ 卵巣癌細胞株を移植した SCID マウスにおいて、パクリタキセルと LY および PD の併用療法は有意に生存期間を延長した。
- ④ 卵巣漿液性腺癌細胞株 (KF, SK-OV-3, SHIN-3), パクリタキセル耐性誘導株 (KFTx), 卵巣粘液性腺癌細胞株 (MN-1, OMC-1, RMUG-L, RMUG-S, TU-OM-1) を用いて検討をおこなった。MTT assay によりパクリタキセルを含む各種抗癌剤に対する Ic_{50} を算出した。 Ic_{50} を用いた実験系での Area Under the Curve (Assay AUC) と臨床的投与量の AUC (CA-AUC) を比較し, Assay AUC が CA-AUC を上回る場合に薬剤感受性ありと判定した。粘液性腺癌細胞株では MN-1 と TU-OM-1 が 5-FU、オキサリプラチンとエトポシドに感受性を示したが、パクリタキセルはすべての細胞株で耐性を示した。Median effect 法による検討では、5-FU とオキサリプラチンとの併用はすべての細胞株で相加以上の効果を示した。
- ⑤ Western blot 法により細胞周期関連蛋白 (MEK, p-MEK, Akt, p-Akt)、アポトーシス関連蛋白 (Bcl-2, Bcl-XL) と DNA 修復関連蛋白 (ERCC1, XPF, XRCC1) の発現を検討した。5-FU 暴露後の ERCC 蛋白発現低下が感受性増強に関与することが示唆された。粘液性腺癌細胞株を移植した SCID マウスにおいて、5-FU とオキサリプラチンとの併用療法は有意に生存期間を延長した。5-FU とオキサリプラチンとの

併用療法は粘液性腺癌に対する有効な治療の一つと考えられた。

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 10 件)

- ① Sato S, Itamochi H, Kigawa J, Oishi T, Shimada M, Sato S, Nainiwa J, Uegaki K, Nonaka M, Terakawa N. Combination chemotherapy of oxaliplatin and 5-fluorouracil may be an effective regimen for mucinous adenocarcinoma of the ovary: a potential treatment strategy. *Cancer Science*, 100(3), 545-551, 2009. 査読あり。
- ② 板持広明、野中道子、佐藤誠也、浪花潤、上垣憲雅、佐藤慎也、島田宗昭、紀川純三。難治性卵巣癌に対する治療の個別化。日本婦人科腫瘍学会雑誌, 27(1), 32-36, 2009. 査読なし。
- ③ 佐藤慎也、板持広明、紀川純三。卵巣癌の腹腔内抗癌剤投与法。臨床婦人科産科, 62(10), 1316-1319, 2008. 査読なし。
- ④ Kawaguchi W, Itamochi H, Kigawa J, Kanamori Y, Oishi T, Shimada M, Sato S, Sato S, Terakawa N. Chemotherapy consisting of paclitaxel and carboplatin benefits a patient with malignant mixed

- mullerian tumor of the fallopian tube. *International Journal of Clinical Oncology*, 13(5), 461-463, 2008. 査読あり。
- ⑤ 板持広明、野中道子、佐藤誠也、浪花 潤、佐藤慎也、島田宗昭、紀川純三、寺川直樹。抗癌剤低感受性卵巣癌に対する治療戦略。日本婦人科腫瘍学会雑誌, 26(3), 367-372, 2008. 査読なし。
- ⑥ Shimogai R, Kigawa J, Itamochi H, Iba T, Kanamori Y, Oishi T, Shimada M, Sato S, Kawaguchi W, Sato S, Terakawa N. *Int J Gynecol Cancer*, 18(3), 499-505, 2008. 査読あり。
- ⑦ Fujii S, Matsusue E, Kigawa J, Sato S, Kanasaki Y, Nakanishi J, Sugihara S, Kaminou T, Terakawa N, Ogawa T. Diagnostic accuracy of the apparent diffusion coefficient in differentiating benign from malignant uterine endometrial cavity lesions: initial results. *Eur Radiol*, 18(2), 384-389, 2008. 査読あり。
- ⑧ Kawaguchi W, Itamochi H, Kigawa J, Kanamori Y, Oishi T, Shimada S, Sato S, Shimogai R, Sato S, Terakawa N. Simultaneous inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase pathways enhances sensitivity to paclitaxel in ovarian carcinoma. *Cancer Science*, 98(12), 2002-2008, 2007. 査読あり。
- ⑨ Oishi T, Itamochi H, Kigawa J, Kanamori Y, Shinamda M, Takahashi M, Shimogai R, Kawaguchi W, Sato S, Terakawa N. Galectin-3 may contribute to Cisplatin resistance in clear cell carcinoma of the ovary. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 17(5), 1040-1046, 2007. 査読あり。
- ⑩ 大石徹郎、佐藤誠也、川口稚恵、佐藤慎也、島田宗昭、板持広明、金森康展、紀川純三、寺川直樹。卵巣明細胞腺癌における Galectin-3 発現と CDDP 感受性。日本婦人科腫瘍学会雑誌, 25(1), 39-43, 2007. 査読なし。
- [学会発表] (計 3 件)
- ① Sato S, Itamochi H, Kigawa J, Oishi T, Shimada M, Sato S, Nainiwa J, Uegaki K, Nonaka M, Terakawa N. Combination chemotherapy of oxaliplatin and 5-fluorouracil may be an effective regimen for mucinous adenocarcinoma of the ovary: A potential treatment strategy. 100th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (2009/4/18-4/22, Denver)
- ② Kawaguchi W, Itamochi H, Kigawa J, Kanamori Y, Oishi T, Shimada S, Sato S, Shimogai R, Sato S, Terakawa N. Effect of simultaneous inhibition of MEK and PI3K/Akt pathways on

paclitaxel sensitivity in ovarian cancer.
43rd Annual Meeting of the American
Society of Clinical Oncology
(2007/6/1-6/5, Chicago)

- ③ 佐藤誠也、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、紀川純三、寺川直樹。卵巣粘液性腺癌の至適化学療法に関する基礎的検討。第 67 回日本癌学会学術総会（2008 年 10 月 28 日-30 日、名古屋市）

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