

## 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 11 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：22791531

研究課題名（和文） 耐性遺伝子を用いた上皮性卵巣癌抗癌剤感受性試験の試み

研究課題名（英文） Genetic chemosensitivity test with novel drug-resistance genes in epithelial ovarian cancer

研究代表者

浪花 潤 (NANIWA JUN)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：70467702

研究成果の概要（和文）：

卵巣癌由来細胞株 2 株とその PTX および CDDP 耐性誘導株 2 株の計 4 株を用いて、網羅的遺伝子解析を行い、耐性株において有意な上昇を認めた 8 つの遺伝子を新規抗癌剤感受性試験の候補遺伝子として設定した。培養卵巣癌細胞株の遺伝子定量で耐性細胞株で親株と比較して有意に上昇することを確認した。次に、20 症例分の卵巣癌手術検体および臨床データ収集を行いデータベースを構築した。遺伝子定量では薬剤抵抗群では奏功群に比して上記遺伝子が増加することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We established two ovarian cancer cell lines which showed drug resistance for Paclitaxel/Cisplatin from their parental cell lines. The cDNA microarray analysis of these parental and resistant cell proposed eight candidate genes (*ABCB1*, *ABCG2*, *IL6*, *IL8*, *DR5*, *p21*, *KISS1*, *MMP1*) for the novel chemo-sensitivity test, which levels in resistant cell were significantly higher than in parental cell. The result of quantitative analysis of the eight genes in these ovarian cancer cell lines supported this consequence. Gaining informed consent, 13 ovarian cancer clinical samples and information were provided, which is available for database. The quantitative analysis of these eight genes in these 13 clinical samples revealed that the levels of resistant group were higher than sensitive group.

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 円	390,000 円	1,690,000 円
2011 年度	900,000 円	270,000 円	1,170,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000 円	660,000 円	2,860,000 円

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：上皮性卵巣癌 薬剤耐性 抗癌剤感受性試験

## 1. 研究開始当初の背景

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、再発卵巣癌の多くは化学療法に抵抗性を示し、長期予後はいまだ不良である。Second-line chemotherapy として様々な抗癌剤が試みられているものの、その単剤での奏効率は 15-30% と低く、いまだ満足できるものではない。したがって、卵巣癌患者の予後改善のためには有効な抗癌剤の選択が重要であり、有用な抗癌剤感受性試験が切望される。現在、様々な抗癌剤感受性試験が試みられているが、遺伝子による診断は簡便で検体の移送も容易なことから期待される手技である。その臨床応用のためには、抗癌剤耐性機序に基づいた遺伝子検索を行うことが重要となる。

抗癌剤耐性には、薬剤の排泄促進、解毒機能亢進、DNA 修復促進やアポトーシスの阻害が知られている。耐性機序は抗癌剤により異なることから、各抗癌剤特有の耐性機序を検索することが肝要である。プラチナ製剤は、細胞内に取り込まれたのち、 $\gamma$ -Glutamylcysteine Synthetase ( $\gamma$ -GCS) によりグルタチオン (GSH) とその補酵素である Glutathione s-transferase (GST) - $\pi$  の作用により不活化された後、MDR-associated protein-1 (MRP-1) の働きで細胞外へ排泄される。臨床検体を用いた検討で、プラチナ製剤を主体とした化学療法無効例では MRP と  $\gamma$ -GCS 遺伝子発現が高く、 $\gamma$ -GCS 遺伝子発現と GSH 濃度および MRP 遺伝子発現との間に有意な相関を認めしたが、有効例ではそれらに明らかな相関はみられなかった。したがって、プラチナ製剤の耐性には細胞内解毒作用が関与すること

を示した (*Clin Cancer Res* 4;1737-1741,1998)。

一方、Multi-drug resistance (MDR) -1 遺伝子がコードする P 糖蛋白は ATP 依存性に薬剤を細胞外に排泄する。卵巣癌由来細胞株を用いた検討で、パクリタキセル (PTX) 耐性細胞では、MDR-1 遺伝子の発現が新たにみられたが、MRP-1 遺伝子の発現には変化がみられなかった。PTX 曝露後の細胞内薬剤濃度は PTX 耐性細胞で親株に比して有意に低く、PTX 耐性に MDR-1 遺伝子が関与する可能性を示した (*Oncology* 59;329-335,2000)。

また、topoisomerase (Topo) 活性とイリノテカン (CPT-11) の活性体である SN-38 の IC<sub>50</sub> 値との間に有意な相関がみられた (*Int J Cancer* 84;521-524,1999)。

エトポシド (VP-16) 耐性細胞では Topo  $\alpha$  活性が低いことが報告されており、VP-16 感受性の指標として Topo II $\alpha$  遺伝子発現が有用であることが示唆されている。そこで、MDR-1、MRP-1、topo I および topo II  $\alpha$  遺伝子を用いた化学療法感受性試験を試みた。その結果、MDR-1 による TC (TX, CBDCA) 療法では 85.7%、topo II  $\alpha$  による EP (VP-16, CDDP) 療法では 77.8%、topo I による CPT-P (CPT-11, CDDP) 療法では 100% の正診率が得られ、耐性遺伝子を用いた抗癌剤感受性試験の可能性を示した (*Int J Gynecol Cancer* 17;76-82,2007)。

しかしながら、さらなる正診率の向上と抗癌剤耐性克服のためには新規の耐性遺伝子や耐性機序の解明が不可欠であり、網羅的遺伝子解析が必須であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、卵巣癌由来細胞株 2 株とその PTX および CDDP 耐性誘導株 2 株の計 4 株を

用いて、cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行うことにより、上皮性卵巣癌における抗癌剤耐性機序の一端を明らかにするとともに、基礎的検討に基づき検索した耐性遺伝子を用いた新たな感受性試験の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、卵巣癌由来細胞株 2 株 (KF, TU-OM-1) とその PTX および CDDP 耐性誘導株 2 株の計 4 株 (KFrTx, TU-OM-1-CDDP/TX) を用いて、cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行い、耐性遺伝子を検索する。卵巣癌由来細胞株とその抗癌剤耐性誘導細胞株を用いて、抗癌剤暴露前後の上記耐性遺伝子および蛋白の発現レベルを検索し、抗癌剤感受性との関連を検討する。また、阻害剤や siRNA による耐性遺伝子の knock down を行い、抗癌剤感受性の変化を検討するとともに、抗癌剤誘導アポトーシスとの関連を検索する。さらに、親株あるいは耐性誘導株をヌードマウス腹腔内に注入して、卵巣癌腹膜炎モデルを作成し、抗癌剤投与後の生存率や転移数、血管新生およびアポトーシスの差異を検討する。一方、臨床的検討として、鳥取大学医学部附属病院で治療を行った上皮性卵巣癌患者より文書による同意を得た後に、手術時に得られた卵巣癌の新鮮凍結組織を採取する。手術時に採取した卵巣癌腫瘍組織は直ちに $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存する。組織の一部はホルマリン固定しパラフィン包埋ブロックを作成する。すべての症例は標準化学療法であるタキサン化合物とプラチナ製剤による治療を行う。評価可能病変を有する症例で、RECIST 基準に基づき各抗癌剤治療の効果を判定する。この新

鮮凍結組織を用いて、基礎的検討により感受性との関連が確認された遺伝子の発現レベルを検索し、化学療法感受性との関連について検討する。関連の得られた遺伝子で、感受性を指標として発現レベルの cut-off 値を算出する。これらの検討から得られた耐性遺伝子の cut-off 値を用いて、卵巣癌症例に対する抗癌剤感受性試験を行う。

### 4. 研究成果

卵巣癌由来細胞 2 株を用いて、それぞれ PTX および CDDP に対する 2 剤耐性誘導株を樹立した。培養卵巣癌細胞株を用いて、cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行いその発現プロファイルを検討した結果、薬剤排出関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、転移関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子および血管新生関連遺伝子の 5 つの経路で計 8 つの遺伝子 (*ABCB1*, *ABCG2*, *p21*, *IL6*, *MMP1*, *KISS1*, *DR5*, *IL8*) に耐性株 2 株ともに 2 倍以上の上昇がみられた。リアルタイム RT-PCR 法を用いて遺伝子定量を行った結果、これらの遺伝子のうち 4 つの遺伝子 (*ABCB1*, *ABCG2*, *p21*, *DR5*) において耐性細胞株で親株に比較してそれぞれ有意に上昇した。臨床的検討として、13 症例分の卵巣癌腫瘍組織を採取し、上皮性卵巣癌組織の集積を行った。カルテによる詳細なデータ収集を行いデータベースを構築した。RECIST 基準に基づき各抗癌剤治療の効果を判定した結果は、奏効例 8 例、非奏効例 5 例であった。この臨床検体を用いてリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子定量を行った結果、非奏効例では奏効例に比較して 5 つの遺伝子 (*ABCB1*, *ABCG2*, *p21*, *IL6*, *DR5*) が上昇した。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浪花 潤 (NANIWA JUN)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：70467702