

平成24年3月

# 野中道子 学位論文審査要旨

主査 池口正英  
副主査 紀川純三  
同 原田省

## 主論文

Activation of the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway overcomes cisplatin resistance in ovarian carcinoma cells

(MEK/ERK経路の活性化は卵巣癌におけるシスプラチン耐性を克服する)

(著者：野中道子、板持広明、川口稚恵、工藤明子、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、紀川純三、原田省)

平成24年 International Journal of Gynecological Cancer 掲載予定

# 学 位 論 文 要 旨

Activation of the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway overcomes cisplatin resistance in ovarian carcinoma cells

(MEK/ERK経路の活性化は卵巣癌におけるシスプラチン耐性を克服する)

上皮性卵巣癌に対するプラチナ製剤を主体とした併用化学療法は高い奏効率を示すものの、進行例ではその70%以上が再発する。再発例は化学療法に抵抗性を示し死に至る。シスプラチン(CDDP)は、the mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) や phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K)/Aktシグナル伝達経路を活性化することが知られており、CDDPの殺細胞効果に影響を及ぼすと考えられる。

本研究では、PI3K/AktおよびMEK/ERK経路の作用薬が卵巣癌に対するCDDP感受性を増強するか否かを知るとともに、その作用機序を明らかにしようとした。

## 方 法

卵巣漿液性腺癌由来細胞株7株を用いて、CDDPに対する感受性をMTT assayで検討するとともに、PI3K阻害剤であるLY294002 (LY)、MEK阻害剤であるPD98059 (PD) およびMEK/ERK賦活剤であるphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) とCDDPとの併用効果を検索した。薬剤添加後のアポトーシスおよび細胞周期の変化はAnnexin V染色およびBrdU incorporation assayで検討した。リン酸化(p)MEK、pERK、pAkt、活性型caspase-9、p checkpoint kinase (chk) 1およびpchk2の蛋白発現をWestern blot法で検索した。

次に、SK-OV-3細胞をヌードマウス腹腔内に注入して卵巣癌癌性腹膜炎モデルを作製し、CDDPとPMAとの併用効果を検討した。各薬剤は移植7日後から毎週の計4回腹腔内投与した。移植29日後の腹腔内腫瘍総重量を測定し、pERKの蛋白発現を免疫組織化学およびwestern blot法で検索した。生存率はKaplan-Meier法で、有意差はlog-rank法を用いて検討した。

## 結 果

KFのCDDP耐性誘導株であるKFrのCDDPに対するIC (inhibitory concentration)<sub>50</sub>は9.6  $\mu$ Mであることから、IC<sub>50</sub>>9.6  $\mu$ Mの株をCDDP耐性株と定義した。

pMEK、pERKおよびpAkt蛋白発現は、すべての細胞株において観察された。CDDPとLYとの併用添加ではCDDPに対する感受性の変化はみられなかったものの、PDとの併用添加では感受性が有意に低下した。一方、CDDP耐性株においてCDDPとPMAとの併用添加では感受性が有意に増強するとともに、CDDP単独添加に比して活性型caspase-9蛋白発現の増加と、著明なアポトーシスの誘導が観察された。また細胞周期の検索では、CDDPとPMAの併用添加によりS期細胞比率が著明に増加するとともに、pchk1およびpchk2蛋白発現の低下がみられた。卵巣癌癌性腹膜炎モデルにおいて、腫瘍組織中のpERK蛋白発現は、PMA投与により増加した。CDDPとPMAとの併用投与群の腹腔内腫瘍総重量はCDDP単独投与群と比して有意に小さく、平均生存期間も有意に長かった。

## 考 察

MEK/ERK経路の活性化は細胞周期のG1期にみられる。また、ERKの活性化はCDDPによっても誘導され、細胞増殖や細胞死に影響すると考えられている。本研究においても、CDDP添加によりpERK発現の増加がみられた。一方、CDDPとMEK阻害剤との併用添加は拮抗作用を示した。そこでPMAを用いて、ERKの活性化がCDDP感受性に与える影響を検討した。

MEK/ERK賦活剤であるPMAは、CDDP耐性株においてCDDP誘導性のpERKおよび活性型caspase-9発現を増加させた。また、PMAとCDDPの併用添加により、CDDPの殺細胞効果が有意に増加した。したがって、MEK/ERK経路の活性化はCDDP耐性株においてCDDPの殺細胞効果を増強することが示唆された。

chk1およびchk2は、DNA障害時の細胞の反応に重要な役割を担っている。CDDP耐性株においてPMAとCDDPの併用添加により、著明なS期およびsubG1期への細胞集積とG1期およびG2/M期の低下がみられた。さらに、併用添加では、CDDP単独に比してchk1およびchk2蛋白発現の低下が観察された。したがって、PMAはCDDPによる細胞周期チェックポイントの活性化を阻害し、アポトーシスを誘導することが示唆された。

卵巣癌癌性腹膜炎モデルにおいても、PMAとCDDPの併用投与は、PMAおよびCDDP単独投与に比して移植腫瘍内のpERK蛋白発現を増加させるとともに、有意な生存期間の延長をもたらした。今回の*in vitro*および*in vivo*の検討で、MEK/ERK経路の賦活化はCDDPの効果を増強させることを示した。

## 結 論

上皮性卵巣癌におけるCDDP耐性克服には、MEK/ERK経路の賦活化が有効である可能性が示された。今後、この併用療法が卵巣癌患者の予後を改善することが期待される。