

平成25年 2月

工藤明子 学位論文審査要旨

主 査 池 口 正 英
副主査 梅 北 善 久
同 原 田 省

主論文

Dual inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase and mammalian target of rapamycin using NVP-BEZ235 as a novel therapeutic approach for mucinous adenocarcinoma of the ovary

(卵巣粘液性腺癌に対するPI3K/mTOR阻害剤NVP-BEZ235を用いた新規治療戦略)

(著者：工藤明子、大石徹郎、板持広明、佐藤誠也、浪花潤、佐藤慎也、島田宗昭、
紀川純三、原田省)

平成26年 International Journal of Gynecological Cancer 掲載予定

参考論文

1. 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 22巻 922頁～929頁

2. Checkpoint kinase inhibitor AZD7762 overcomes cisplatin resistance in clear cell carcinoma of the ovary

(チェックポイントキナーゼ阻害剤AZD7762は卵巣明細胞腺癌におけるシスプラチン耐性を克服する)

(著者：板持広明、西村真由美、近江奈央、加藤みさき、大石徹郎、島田宗昭、
佐藤慎也、浪花潤、佐藤誠也、工藤明子、紀川純三、原田省)

平成26年 International Journal of Gynecological Cancer 24巻 61頁～69頁

学 位 論 文 要 旨

Dual inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase and mammalian target of rapamycin using NVP-BEZ235 as a novel therapeutic approach for mucinous adenocarcinoma of the ovary

(卵巣粘液性腺癌に対するPI3K/mTOR阻害剤NVP-BEZ235を用いた新規治療戦略)

進行卵巣粘液性腺癌 (MAC) は他の組織型に比して予後不良である。MACの化学療法低感受性が予後不良の原因と考えられている。したがって、進行MAC症例に対する新たな治療戦略の開発が切望される。MACにおいて上皮成長因子受容体ファミリー蛋白発現の増加やその下流であるAkt/mTOR経路の活性化が48%の腫瘍で観察され、治療標的として注目されている。本研究では、MACに対するPI3KとmTORの両阻害剤であるNVP-BEZ235 (BEZ235) の有効性を検討した。

方 法

MAC由来細胞株7株を用いて、BEZ235およびmTOR阻害剤であるテムシロリムスに対する感受性をWST-8 assayで検討するとともに、抗がん剤との併用効果をmedian-effect法により評価した。PIK3CAおよびKRAS遺伝子の変異はdirect sequence法で検索した。薬剤添加前後のPTEN、Akt、p70S6K、4E-BP1、リン酸化 (p-) Akt、p-p70S6K、p-4E-BP1、活性型PARPおよび活性型caspase-9蛋白発現をWestern blot法で検討した。薬剤添加後の細胞周期の変化およびアポトーシスはFlow cytometryおよびAnnexin V染色で検索した。

次に、OMC-1細胞およびRMUG-S細胞をヌードマウス皮下に注入してMAC皮下移植モデルを作製し、BEZ235の腫瘍増殖抑制効果を検討した。BEZ235は移植7日後から投与開始し、3週間連日経口投与した。移植25日後に腫瘍を摘出し、p-Akt、p-mTOR、p-4E-BP1およびp-p70S6K蛋白発現を免疫組織化学で検索した。

結 果

MAC細胞のBEZ235に対する IC_{50} は18-328 nMであるのに対し、テムシロリムスでは7株中6株で10,000 nM以上であった。Akt、mTOR、p70S6K、4E-BP1およびそれらのリン酸化蛋白の発現はすべての細胞株で観察された。PIK3CA遺伝子変異は2株でみられ、これらの細胞株はBEZ235に対する IC_{50} が低かった。BEZ235添加によりp-Akt、p-p70S6Kおよびp-4E-BP1蛋白発

現は濃度依存性に低下したものの、テムシロリムス添加ではp-Akt蛋白発現が増加した。また、BEZ235添加によりG₀/G₁期細胞比率の増加とS期細胞比率の減少が認められ、活性型caspase-9および活性型PARP蛋白発現の増加とともにアポトーシスの誘導が観察された。

MAC皮下移植モデルにおいて、腫瘍組織中のp-Akt、p-mTOR、p-p70S6Kおよびp-4E-BP1蛋白発現はBEZ235投与により抑制された。BEZ235投与群の皮下移植腫瘍は無投与群と比して有意に小さかった。

併用効果の検討では、BEZ235と抗がん剤との併用添加により7株中3株以上に相乗効果が認められた。

考 察

PI3K/mTOR阻害剤であるBEZ235はMAC細胞の増殖を抑制し、細胞周期のG₀/G₁期停止とアポトーシスを誘導することが示された。MAC皮下移植モデルにおいて、BEZ235は腫瘍発育を著明に抑制した。本研究は、BEZ235がMACに対して有効であることを示した初めての報告である。

ラパマイシンやその誘導體であるテムシロリムスは、mTORと結合することでmTORC1活性を阻害し、細胞周期のG₁期停止と細胞死を誘導する。しかしながら、mTOR阻害のみではPI3Kの活性化やmTORC2によるAktの活性化が生じ、ラパマイシン類の抗腫瘍効果が減弱する。本研究においても、7株中6株でテムシロリムス添加後にp-Akt発現が増加するとともに、細胞周期の停止がみられなかった。一方、PI3K/mTOR阻害剤であるBEZ235はp-Akt発現およびmTOR経路を阻害し、細胞増殖の抑制とともにアポトーシスを誘導した。したがって、MACの治療においてはPI3KとmTORを同時に阻害する必要性が示唆された。

*PIK3CA*遺伝子変異はPI3K/Akt/mTOR経路の阻害剤の感受性に関与すると考えられている。今回の検討では、*PIK3CA*遺伝子変異の有無にかかわらずBEZ235が有効であった。ヌードマウスを用いたMAC皮下移植モデルにおいても、BEZ235投与により移植腫瘍のp-Aktおよびp-mTOR発現が抑制されその効果が確認された。興味深いことに、BEZ235とパクリタキセルあるいはシスプラチンとの相乗効果が観察された。したがって、MACに対する化学療法にBEZ235を併用可能であることが示唆された。

結 論

MACに対するBEZ235の有効性が示されるとともに、抗がん剤の感受性を増強することが示唆された。BEZ235を含む治療が進行MAC症例の予後を改善させることが期待される。