

博士論文（要約）

癌性腹膜炎を伴う進行卵巣癌に対する新規治療戦略

川田 淑子

## [序文]

卵巣癌は、女性の悪性腫瘍の中で世界で8番目に多く、年間約30万人が新たに診断され、死亡数は約18万人と推定されている。初期症状に乏しく、診断時には約75%がIII~IV期の進行癌であるため、5年生存率は30%未満であり、婦人科癌の中で最も死亡率が高い。

進行卵巣癌において、難治性癌性腹水は管理に難渋する病態の一つである。化学療法抵抗性の場合、癌性大量腹水の管理が問題となり、一時的な症状緩和のために頻回な腹水穿刺が施行されるが多い。腹水濾過濃縮再静注療法 (concentrated ascites reinfusion therapy; CART) は、患者から穿刺排液した腹水を濾過して、細菌や癌細胞、血球成分などを除去し、濃縮することで高濃度の蛋白含有液として再静注する治療法である。本研究では、難治性の癌性大量腹水に対する治療戦略として、進行卵巣癌の管理におけるCARTの安全性と有用性を後方視的に検討するとともに、代表的な副反応であるCART後の体温上昇に影響を及ぼす可能性のある臨床病理学的要因を特定するための検討を行った。

さらに、癌性腹水に対する薬剤として、MDM2 (Murine Double Minute 2) 阻害剤の治療効果について基礎的検討を行った。上皮性卵巣癌の中で、明細胞癌は本邦で高頻度であり、プラチナ製剤抵抗性の特徴を持ち予後不良な組織型である。卵巣明細胞癌の分子生物学的特性として、*TP53* 変異率が低いこと、蛋白合成や細胞増殖の促進に働くPI3K/AKT/mTOR経路が高頻度に活性化していることが知られている。細胞周期停止やアポトーシス誘導に関わる重要な因子であるp53の発現レベルは、ユビキチンリガーゼであるMDM2によるプロテアソーム依存性の分解によって制御されている。卵巣明細胞癌では、MDM2が高発現していること、さらにMDM2の高発現が独立予後不良因子であることが報告されており、野生型*TP53*を有する癌ではMDM2-p53の相互作用を遮断することにより、野生型p53の腫瘍抑制効果が回復することから治療標的として期待される。また、卵巣癌の進展には、腹水中を対流する癌細胞の離脱と接着が重要であり、VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) を介した血管新生が強く関係することが知られているが、MDM2はHIF-1を介してVEGFの発現を上昇させることも報告されている。そこで本研究では、*TP53*野生型細胞株を用いて、新規MDM2阻害剤DS-5272, DS-3032b、併用薬剤としてmTOR阻害剤everolimusの抗腫瘍効果および腹水産生抑制効果を検討した。

## [方法]

### (1) CART

2011年1月から2017年3月までに、東京大学医学部附属病院でCARTを施行した29人の進行卵巣癌患者の臨床データを後方視的に検討した。患者の年齢、パフォーマンスステータス、診断名(組織型)、腹水細胞診、CART施行回数、腹水量、CART前後の腹水中の蛋白濃度と蛋白量、血液検査データを収集し、体温、血圧、心拍数、体重、腹囲、尿量を測定した。さらに、CART後の体温上昇に関わる臨床病理学的検討を行った。

### (2) *TP53*野生型マウス卵巣癌細胞株ID-8におけるMDM2阻害剤DS-5272の抗腫瘍効果および腹水産生抑制効果の検討

*in vitro*では、DS-5272による細胞増殖抑制効果を細胞増殖アッセイおよびコロニーフォーメーションアッセイにより評価し、ウェスタンブロット(WB)法でDS-5272による標的蛋白の発現を評価し、さらにフローサイトメトリーにより細胞周期解析を行った。*in vivo*では、癌

性腹水モデルマウスを作製し、DS-5272 (25, 50, 100 mg/kg)もしくは vehicle (control)を各マウスに4週間連日経口投与し、抗腫瘍効果および腹水産生抑制効果を検討した。

(3) ヒト卵巣明細胞癌細胞株における MDM2 阻害剤 DS-3032b の抗腫瘍効果の検討

*in vitro* では、ヒト卵巣明細胞癌株 6 株 (OVISe, OVTOKO, JHOC7, JHOC-9, ES-2, SKOV3) およびヒト淡明細胞型腎細胞癌株 2 株 (Caki-1, Caki-2) を用いて、DS-3032b による細胞増殖抑制効果を細胞増殖アッセイにより評価し、WB 法で標的蛋白の発現を評価した。フローサイトメトリーにより細胞周期解析を行い、Annexin V アッセイによりアポトーシス誘導能を調べた。*in vivo* では、*TP53* 野生型細胞株である OVISe と Caki-1、*TP53* 変異型細胞株である ES-2 を用いて皮下腫瘍モデルマウスを作製し、DS-3032b (50, 100 mg/kg)もしくは vehicle (control)を各マウスに3週間連日経口投与し、抗腫瘍効果を検討した。

(4) ヒト卵巣明細胞癌細胞株における MDM2 阻害剤 DS-3032b と mTOR 阻害剤 everolimus の抗腫瘍効果の検討

*in vitro* では、*TP53* 野生型細胞株である OVISe, OVTOKO, JHOC7, Caki-1 を用いて検討を行った。併用療法による細胞増殖抑制効果を細胞増殖アッセイにより評価し、Chou-Talalay 法により combination index を算出して併用効果を判定した。WB 法により標的蛋白の発現を評価し、フローサイトメトリーにより細胞周期解析を行い、Annexin V アッセイによりアポトーシス誘導能を調べた。*in vivo* では、OVISe、Caki-1、ES-2 細胞株を用いて皮下腫瘍モデルマウスを作製し、DS-3032b (50 mg/kg)、everolimus (5 mg/kg) をそれぞれ単独または併用で3週間連日経口投与し、抗腫瘍効果を検討した。

[結果]

(1) CART

29 症例 47 回の CART を施行し、平均年齢は 57 歳、平均 CART 施行回数は 1.7 回であった。組織型は、漿液性癌 12 例、明細胞癌 7 例であり、CART 前の患者状態は、治療中 14 例 (化学療法 13 例、放射線治療 1 例)、緩和ケア 12 例であった。1 回の CART で処理された腹水量は平均 2,927 mL であり、濃縮後に再静注された蛋白量は平均 85.0 g であった。体重と腹囲は大幅に減少し、尿量と血清アルブミン値も有意に改善された。白血球の増加と血小板の有意な減少が認められたが、臨床的に問題となる副作用は観察されなかった。CART 前にステロイドの投与を行っていたが、平均 0.38°C の体温上昇が認められた。腹水細胞診による癌細胞集塊数が、CART 後の体温上昇と有意に関連していることが明らかとなった。

(2) *TP53* 野生型マウス卵巣癌細胞株 ID-8 における MDM2 阻害剤 DS-5272 の抗腫瘍効果および腹水産生抑制効果の検討

ID8 を用いた細胞増殖アッセイにおいて、DS-5272 は濃度依存性に細胞増殖を抑制し、IC<sub>50</sub> (50%増殖抑制濃度)は 0.68 μM であった。WB 法では、MDM2 と p53 の発現量の増加を確認し、細胞周期解析では、sub-G1 期の割合の上昇と、S 期の割合の低下が認められた。*in vivo* では、DS-5272 投与により、生存期間の有意な延長と強力な腹水産生抑制効果が認められ、また、腹水および血清中の VEGF 濃度は有意に減少し、血清蛋白濃度は上昇が認められた。さらに、腹膜切片における腹膜播種の減少および CD-31 免疫染色における染色陽性細胞数の減少が認められた。

(3) ヒト卵巣明細胞癌細胞株における MDM2 阻害剤 DS-3032b の抗腫瘍効果の検討

細胞増殖アッセイでは、DS-3032bは *TP53* 野生細胞株においてのみ用量依存性に細胞増殖を抑制し、IC50は0.09~0.27  $\mu\text{M}$ であった。WB法では、DS-5272添加により時間・濃度依存的にMDM2、p53およびp21の発現量が増加し、アポトーシスの中心的酵素であるcleaved caspase 3、cleaved PARPの発現の増強を認めた。細胞周期解析では、sub-G1期の割合の上昇と、S期の割合の低下を認め、Annexin Vアッセイではアポトーシスの誘導が確認された。*in vivo*では、DS-3032bは *TP53* 野生型細胞株であるOVISEとCaki-1でのみ、腫瘍の増大を有意に抑制した。

(4) ヒト卵巣明細胞癌細胞株におけるMDM2阻害剤DS-3032bとmTOR阻害剤everolimusの抗腫瘍効果の検討

*TP53* 野生型細胞株4株を用いた細胞増殖アッセイでは、DS-3032bとeverolimusとの併用療法 combination index はいずれも1未満であり相乗効果があることが示唆された。WB法では、DS-3032b単剤でMDM2、p53とp53誘導アポトーシス因子であるPUMAの上昇を認め、everolimusの併用により増強が認められた。また、everolimus単剤で抑制されるmTORシグナル経路の下流蛋白であるS6および4EBP1のリン酸化は、併用下でも抑制されていることが確認された。細胞周期解析では、DS-3032bとEverolimusの併用によりSub-G1期の比率が上昇した。*in vivo*では、併用療法群はいずれの単剤群と比べて有意に腫瘍径を縮小させた。腫瘍切片を用いたTUNEL染色では染色陽性細胞は対照群と各単剤群に比べ、併用療法群で有意に増加しており、アポトーシス誘導が確認された。CD31染色においても有意に染色陽性細胞が減少し、血管新生の抑制効果を示した。

#### [考察]

本研究では、進行卵巣癌患者の癌性大量腹水に対してCARTを施行し、尿量と血清Alb値の有意な改善が示された。また、主な副反応である体温上昇と腹水中の腫瘍細胞集塊数との関連を見出した。細菌感染やウイルス感染の影響を受けやすい進行卵巣癌患者にとって、発熱は生命を脅かす可能性があり、特に化学療法施行中には感染による発熱との鑑別を要し、治療を中断せざるを得ない場合もある。腹水中の炎症性サイトカインがCART後の体温上昇の原因となる可能性があり、CARTの有用性と進行卵巣癌治療における有害事象回避のための方法を検証するために、さらなるコホート研究が必要である。

MDM2阻害剤(DS-5272, DS-3032b)は、*TP53*野生型卵巣癌細胞株に対して有意な抗腫瘍効果および腹水産生抑制効果を示した。また、mTOR阻害剤(everolimus)が卵巣明細胞癌に対しても抗腫瘍効果を示し、MDM2阻害剤とmTOR阻害剤の併用療法において相乗効果を発揮することを明らかにした。卵巣癌におけるMDM2阻害剤の腹水産生抑制効果および生存期間延長効果を検討した報告は本研究が初めてであり、腹水管理に難渋することの多い進行卵巣癌において有効な治療となる可能性が示唆された。また、近年国内でもがんゲノム医療が広がりつつあり、*TP53*に変異がなく、MDM2やPI3K/AKT/mTOR経路の活性化や増幅がみられた場合、MDM2阻害剤やmTOR阻害剤を単剤あるいは併用で使用することでより高い治療効果を発揮する可能性が示唆された。

本研究により、癌性腹膜炎を伴う進行卵巣癌に対するCARTの安全性と有用性、*TP53*野生型卵巣癌に対するMDM2阻害剤およびmTOR阻害剤が新たな治療戦略となり得る可能性が示された。