

博士論文

子宮体癌、卵巣癌に対する分子標的薬併用療法
(PI3K/mTOR 阻害剤と MEK 阻害剤) の抗腫瘍効果の検討

稲葉 可奈子

目次

略語一覧

要旨 ----- 6

第1章 序文 ----- 7

1. 子宮体癌の疫学・治療法
2. 卵巣粘液性腺癌の疫学・治療法
3. 悪性腫瘍における RAS/MAPK、PI3K/AKT シグナル伝達経路の活性化
4. 婦人科癌における分子標的治療
5. FRET イメージング法の分子標的薬研究への応用
6. 悪性腫瘍における RAS/MAPK、PI3K/AKT シグナル伝達経路の活性化

第2章 対象と方法 ----- 17

1. 子宮体癌細胞株・卵巣粘液性腺癌細胞株
2. 試薬
3. MTT アッセイ（細胞増殖抑制試験）
4. ウェスタンブロット法
5. 細胞周期解析
6. Annexin V-FITC アポトーシス解析
7. 遺伝子サイレンシング

8. FRET (fluorescence resonance energy transfer) バイオセンサー発現細胞株
の樹立
9. FRET イメージング
10. 統計解析

第3章 結果 ----- 26

I. 子宮体癌細胞株における SAR245409 と pimasertib の併用療法の抗腫瘍効果

I-1. 子宮体癌細胞株における SAR245409 と pimasertib 各単剤の抗腫瘍効果

I-2. Pimasertib 感受性株における SAR245409 と低濃度の pimasertib との併用
による相乗効果

I-3. SAR245409 と低濃度の pimasertib との併用療法によるリン酸化抑制、
G1 アレスト

I-4. ERK1/2 ノックダウンによる SAR245409 感受性の増強効果

II. 卵巣粘液性腺癌細胞株における SAR245409 と pimasertib の併用療法の抗腫瘍
効果

II-1. 卵巣粘液性腺癌細胞株における SAR245409 と pimasertib 各単剤の抗腫瘍
効果

II-2. 卵巣粘液性腺癌細胞株における SAR245409 と pimasertib の併用療法の抗
腫瘍効果

- II-3. SAR245409 と pimasertib の併用療法によるアポトーシス誘導
- II-4. MEK1/2、ERK1/2 ノックダウンによる SAR245409 感受性の増強効果
- II-5. FRET イメージング法による S6K、ERK 活性の定量化
- II-6. 細胞増殖、細胞死における S6K, ERK 活性の役割

第4章 考察 ----- 60

I. 子宮体癌における SAR245409 (PI3K/mTOR 阻害剤) と pimasertib (MEK 阻害剤) の併用療法の検討

II. OMC における SAR245409 (PI3K/mTOR 阻害剤) と pimasertib (MEK 阻害剤) の併用療法の検討

第5章 結論 ----- 68

参考文献 ----- 69

謝辞 ----- 79

略語一覽

PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase

mTOR: Mammalian Target of Rapamycin

PTEN: Phosphatase and Tensin Homolog

MAPK: Mitogen-activated Protein Kinase

ERK: Extracellular Signal-regulated Kinase

MEK: MAPK/ERK Kinase

CI: combination index

OMC: ovarian mucinous adenocarcinoma

FRET: fluorescence resonance energy transfer

要旨

PI3K/mTOR 阻害剤と MEK 阻害剤の併用療法が子宮体癌細胞株 12 株中 6 株において相乗的に細胞増殖を抑制することを明らかとした。また、併用療法における MEK 阻害剤の濃度は低濃度でも相乗効果を発揮しうることを見出した。卵巣粘液性腺癌細胞株においては、*KRAS* や *PIK3CA* の遺伝子変異の有無にかかわらず、本研究で用いた 6 細胞株全てにおいて、PI3K/mTOR 阻害剤と MEK 阻害剤の併用療法が相乗効果を示した。さらに、FRET イメージング法により、両剤による殺細胞的および細胞増殖抑制的な抗腫瘍効果は、細胞株毎に異なっていたが、ERK 活性が殺細胞的な効果と濃度依存的に相関しており、MEK 阻害剤が殺細胞効果に重要であることが明らかとなった。

第1章 序文

1. 子宮体癌の疫学・治療法

子宮体癌は世界の女性の中で4番目に高い罹患率を有する癌である^{1,2}。病理学的にはType I（ホルモン依存性）と、Type II（ホルモン非依存性）に分類される。Type Iは子宮内膜に類似した類内膜腺癌（Grade1/2）であり、分化度が高く、子宮体癌の約80%を占める³。Type IIは類内膜腺癌（Grade3）、漿液性腺癌や明細胞腺癌などの組織型に分類され、頻度は低くType Iとは発生機序が異なると考えられている。以後、本研究の主たる対象であるType Iの類内膜腺癌について述べる。発症機序にはエストロゲンへの長期的な持続曝露が関与しており⁴、早い初潮、遅い閉経、月経異常、未産、肥満、高血圧、糖尿病、エストロゲン産生腫瘍、エストロゲン単独のホルモン補充療法などがリスクファクターとして挙げられる⁵。好発年齢は閉経後である50-60代をピークとするが、近年は年齢に関係なく増加傾向であり、晩婚化や生活習慣病の増加によって今後さらに罹患率が増加すると考えられている⁶。

子宮体癌の治療は主に手術療法で、摘出検体の筋層浸潤、脈管侵襲、リンパ節転移の有無や分化度などにより低リスク群～高リスク群に分別し、中リスク以上の症例に後療法として日本では主に化学療法を施行する。再発子宮体癌に対しては一般的に化学療法が選択されるがその奏効率は約30%と低く⁷、保険収

載されている薬剤の種類も限定されており、分子標的薬は新たな治療選択肢として期待されている。

2. 卵巣粘液性腺癌の疫学・治療法

上皮性卵巣癌は女性の癌として世界で 8 番目に罹患率が高く、世界中の女性の癌関連死の第 7 位となっている。年間では、世界中で推定 24 万人の女性が卵巣癌と診断され、約 15 万人が死亡している^{8,9}(Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008, WHO, IARC GLOBOCAN)。そのうち 8 割近くが進行がんとして診断されており¹⁰、そのため予後が不良である。後発年齢は 50—60 代がピークで、リスクファクターとしては卵巣癌の家族歴、子宮内膜症、多のう胞性卵巣症候群、肥満、10 年以上のホルモン補充療法などがあがる。組織型は多様で、漿液性腺癌、粘液性腺癌、類内膜腺癌、明細胞腺癌が主要な組織型である。主な治療法は手術療法と化学療法であり、昨今、ベバシツマブ（抗 VEGF 抗体）やポリ ADP リボースポリメラーゼ（PARP）阻害薬などの分子標的薬が盛んに研究されている¹¹⁻¹⁴。しかし、組織型によって薬への感受性は様々である^{11,15}。特に卵巣粘液性腺癌（ovarian mucinous carcinomas: OMC）は卵巣がんの中でも従来の化学療法の奏功率が 43%と比較的低い^{16,17}。OMC は上皮性卵巣癌の約 10%を占めるが¹⁸、OMC に対する分子標的薬研究

の報告は限られており^{19,20}、新規治療法や個別化治療が求められている。

3. 悪性腫瘍における RAS/MAPK、PI3K/AKT シグナル伝達経路の活性化

増殖シグナル経路である PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)-AKT シグナル経路や MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) シグナル経路は、多くの癌種において活性化している。PI3K/mTOR 経路および MAPK 経路は EGFR (Epidermal growth factor Receptor) などのチロシンキナーゼ受容体 (RTK: Receptor Tyrosine Kinases) の下流に位置する。PI3K シグナル伝達経路および MAPK シグナル伝達経路は、その下流分子のリン酸化を通して、細胞増殖や分化、タンパク合成を行い、抗アポトーシスに働く (図 1)。この経路の抑制を目的とした分子標的薬は多数開発されており、様々な臨床試験が進行中で、有望な新規治療戦略の 1 つとして期待されている。PI3K-AKT 経路の持続的な活性化は、この経路に関わる様々な遺伝子の変異や、上流のチロシンキナーゼ受容体 (RTK) の過剰発現により引き起こされる²¹。RTK の阻害剤としては、抗 HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) ヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマブや EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) を抑制する低分子化合物であるゲフィチニブなど広く臨床応用が進んでいるが、

RTK の下流シグナルの一つである PI3K-AKT 経路においては保険承認された薬剤は乏しく、AKT の下流にあたる mTOR (Mammalian target of rapamycin) の阻害剤 (エベロリムス、テムシロリムス等) が腎細胞癌等で使用されているほか、p110 δ の阻害剤 (Idelalisib) が 2014 年に血液腫瘍の一部に米国 Food and Drug Administration (FDA) で承認されるにとどまっている。

PI3K-AKT シグナル経路はタンパク合成、細胞増殖、アポトーシス制御と腫瘍の増殖・生存における様々なシグナルに関わっている経路であるため、この経路を抑制することは新規治療戦略として理にかなっている。実際に PI3K-AKT 経路の分子に対する阻害薬が腫瘍増殖抑制効果を示すとの報告は様々な癌において存在する²²⁻²⁵。これまでのところ、mTOR 阻害剤である rapalog の臨床応用が先行しているが、上流にあたる PI3K-AKT 経路自体を標的とする薬剤のほうがより多くの下流シグナルを抑制することができるため有効性がより高い可能性があり、PI3K/mTOR 同時阻害剤の開発が進められてきた。その中の一つが、本研究で用いている SAR245409 である。

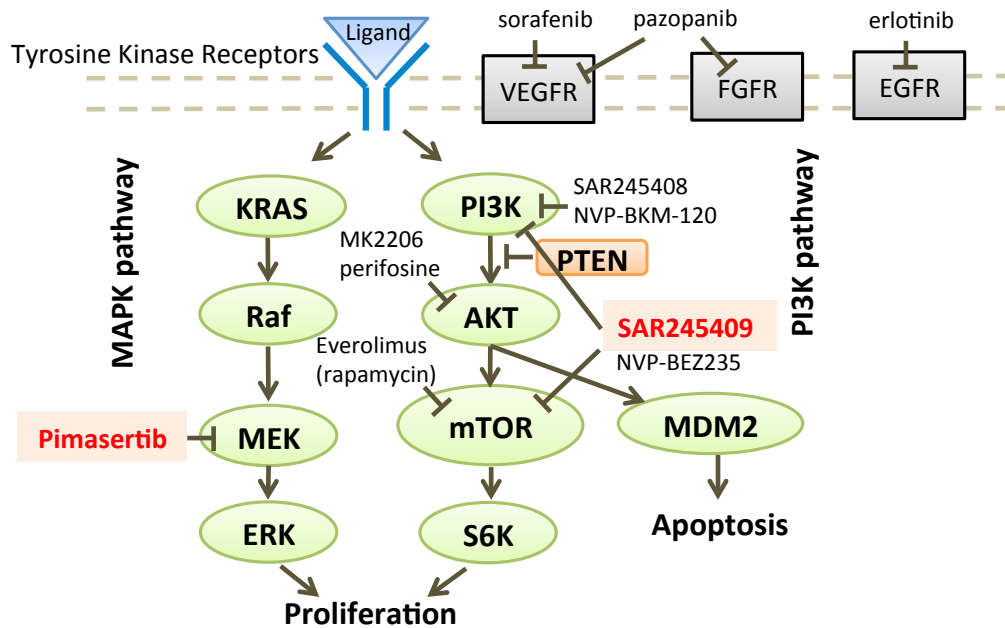


図1 PI3K/mTOR 経路、MAPK 経路と代表的な分子標的薬
 SAR245409 は PI3K/mTOR 経路の PI3K と mTOR を同時阻害し、pimasertib は
 MAPK 経路の下流の MEK を阻害する。

4. 婦人科癌における分子標的治療薬

分子標的治療薬は癌細胞に特異的な生物学的特徴を標的とする薬剤である。

ALK 転座陽性肺癌に対するクリゾチニブや、HER2 受容体陽性乳癌に対するトラスツズマブは既に実地臨床で活用されている。

分子標的治療薬は標的因子によって、I. 増殖因子受容体/シグナル伝達阻害剤、II. DNA 修復・転写制御因子阻害剤、III. 血管新生阻害剤に分類される。現在開発されている主な薬剤の例は以下の通りである。

I. EGFR 阻害薬 : Cetuximab, Erlotinib, Gefitinib, Imatinib, Trastuzumab

mTOR 阻害薬 : Everolimus , Temsirolims

II. PARP 阻害薬 : Olaparib

HDAC 阻害薬 : Vorinostat

III. VEGFR 阻害薬 : Pazopanib, Sorafenib, Sunitinib

VEGF 阻害薬 : Bevacizumab

婦人科癌における分子標的薬は、卵巣癌において Bevacizumab が 2013 年に保険適応となった。その他の婦人科癌（肉腫を除く）では未だ分子標的薬の保険承認はなく、今後の臨床試験の結果が期待されている。

子宮体癌では、*KRAS* 約 21%、*PIK3CA* (PI3 kinase のうち、p110 α の触媒サブユニットをコードする遺伝子) 約 53%、*PTEN* (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10)に約 64%の頻度で遺伝子変異が認められ、その変異が高率に共存することが報告されている²⁶⁻²⁹ (図 2)。*KRAS* は MAPK 経路を活性化する代表的遺伝子であり、PI3K 経路の活性化にも関与するが、*PIK3CA* 変異（キナーゼ活性の上昇をもたらす機能獲得型変異）と *PTEN* 変異（PI3K の抑制作用が失われる機能喪失型変異）は PI3K 経路の主要な活性化因子である。この RAS/MAPK 経路、PI3K/mTOR 経路のシグナルの異常活性化が子宮体癌の増殖メカニズムのひとつとされており、治療ターゲットとして注目されている。

実際、子宮体癌においては PI3K/mTOR dual inhibitor (PF-04691502)、PI3K inhibitor (BKM120) の第 II 相臨床試験が終了しており、mTOR 阻害薬(everolims) は第 II 相、PARP (poly ADP-ribose polymerase) 阻害薬は第 III 相臨床試験が進んでいる³⁰⁻³⁴。しかしながら、mTOR のみの阻害では奏効率が 10%未満であり、単一経路の阻害だけでは治療効果に限界があることが示唆されており、今回我々は PI3K/mTOR 経路と MAPK 経路の同時阻害を検討することとした。

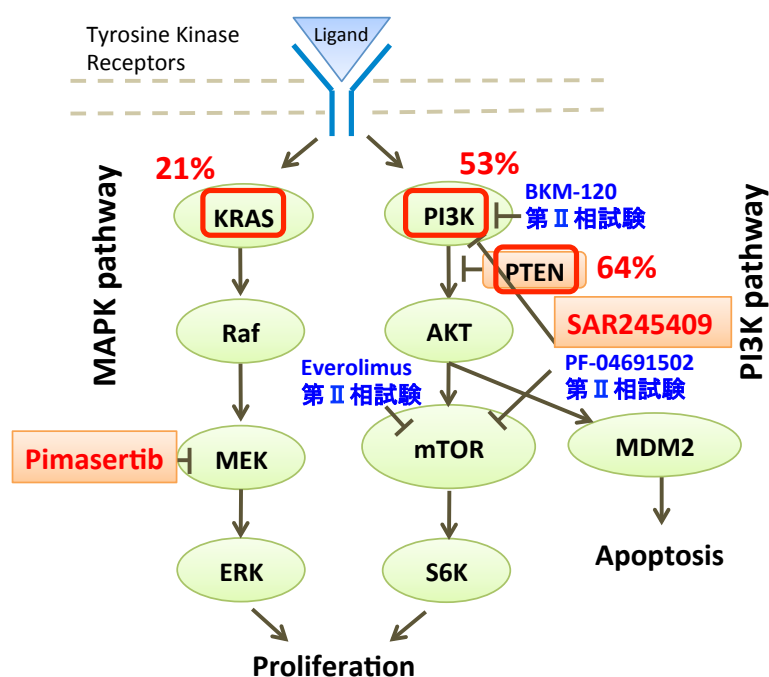


図 2 子宮体癌における遺伝子変異率
子宮体癌における *KRAS*, *PIK3CA*, *PTEN* の各遺伝子変異率を赤字で、子宮体癌において臨床試験が進行中もしくは終了した分子標的薬を青字で記してある。

また、OMC では *KRAS* の変異が 50-60%³⁵⁻³⁷ と高頻度に認められ (図 3)、MAPK 経路は OMC の治療ターゲットとなりうる。OMC においては、PI3K を活性化する *PIK3CA* の変異や *PTEN* の変異は頻度が低い (<10%)³⁶ が、PI3K/mTOR 経路は *KRAS* 変異そのもので活性化されうる³⁸。OMC において、PI3K/mTOR 阻害剤である NVP-BEZ235 が細胞増殖を抑制するという報告もあり²⁰、OMC の癌化に PI3K/mTOR 経路も寄与していることが示唆される。さらに、PI3K/mTOR 経路と MAPK 経路の同時阻害が様々な卵巣癌細胞株で相乗効果を示すことが報告された³⁹。しかし、癌種によって抗腫瘍効果は大きく異なり⁴⁰、フィードバックやクロストークのために併用療法の効果が一致しないことがありうる⁴¹⁻⁴³。子宮体癌細胞株においてと同様に、OMC 細胞株に対しても、PI3K/mTOR 経路と MAPK 経路の両方をターゲットとすることは治療の選択肢となりうると考えられる。

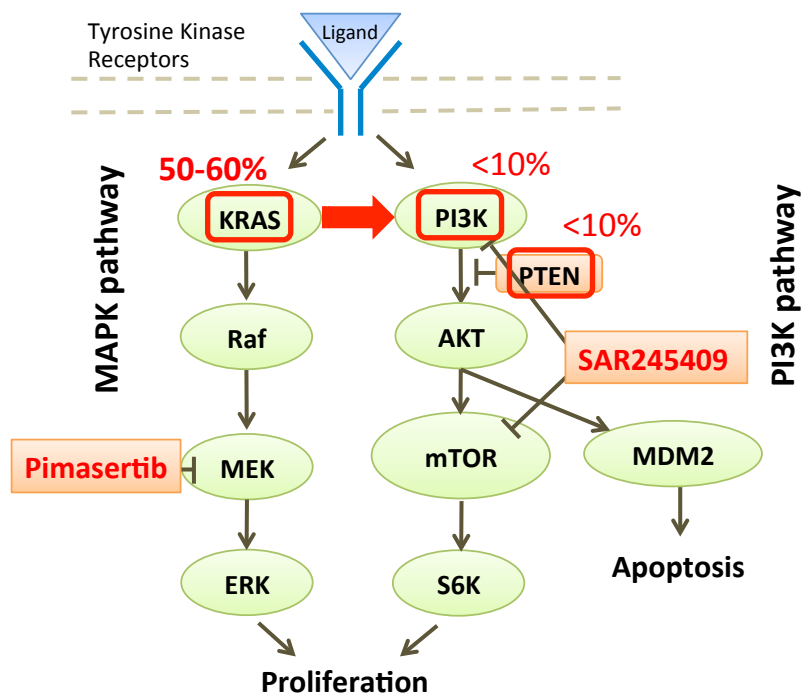


図3 卵巣粘液性腺癌における遺伝子変異率

卵巣粘液性腺癌における *KRAS*, *PIK3CA*, *PTEN* の各遺伝子変異率は赤字で記してある。*PI3K/mTOR* 経路は *KRAS* 変異により活性化されうる (赤矢印)。

5. FRET イメージング法の分子標的薬研究への応用

FRET (fluorescence resonance energy transfer ; 蛍光共鳴エネルギー移動) とは、二種類の蛍光タンパクの物理的な距離が変化することで、発する波長が変化することを利用したイメージング手法である。FRET イメージング法により、タンパク質どうしの相互作用や活性などを定量的に、かつ経時的に測定することができ、さらに、生細胞で同じ細胞を経時的に追跡することも可能となる。FRET イメージング法を用いることで従来の実験手法では得られなかった情報まで得ることができ、FRET イメージング法は分子標的薬研究にも活用できる可能性が

ある。そこで本研究においては、標的経路のタンパク活性と、細胞増殖や細胞死との相関関係を、FRET イメージング法を用いて検討することとした。

6. 本研究の目的

子宮体癌細胞株、卵巣粘液性腺癌細胞株において、PI3K/mTOR 阻害剤 (SAR245409) と MEK 阻害剤 (pimasertib) を用い、以下の項目について明らかとすることを本研究の目的とした。

- ① 子宮体癌細胞株、卵巣粘液性腺癌細胞株に対して、PI3K/mTOR 阻害剤 (SAR245409) と MEK 阻害剤 (pimasertib) の併用療法は相乗効果を示すか？
- ② 相乗効果を示す至適濃度の組合せは？
- ③ その併用効果は cytostatic (細胞増殖抑制的) か、cytotoxic (殺細胞的) か？
- ④ 感受性を予測するバイオマーカーはあるか？
- ⑤ PI3K/mTOR 経路と MAPK 経路は抗腫瘍効果にそれぞれどの程度関与しているのか？

第2章 対象と方法

1. 子宮体癌細胞株・卵巣粘液性腺癌細胞株

子宮体癌細胞株は12種類の細胞株を使用した。組織型は全て類内膜腺癌、*PIK3CA*, *PTEN*, *KRAS* 変異については既知である⁴⁴。AN3CA、KLE、HHUAはAmerican Type Culture Collection(UA, USA)より購入した。Ishikawa3-H-12は西田正人先生(霞ヶ浦医療センター、茨城、日本)より譲渡いただいた。その他HEC-1B、HEC-6、HEC-50B、HEC-59、HEC-88、HEC-108、HEC-116、HEC-151は蔵本博行先生(北里大学、神奈川、日本)より譲渡いただいた。

AN3CA、Ishikawa3-H-12、HEC-1B、HEC-6、HEC-50B、HEC-59、HEC-88、HEC-108、HEC-116、HEC-151は10%FBS(Invitrogen社)添加MEM溶液(Invitrogen社)を培地とし、KLE、HHUAは10%FBS添加DMEM溶液(Sigma-Aldrich社)を培地として、37°C 5%CO₂下で培養した。

OMC細胞株は6種類の細胞株を使用した。MCAS、OAW42はAmerican Type Culture Collection(UA, USA)より購入した。JHOM-1、JHOM-2B、OMC3、RMUG-Sは理研バイオリソースセンター(茨城、日本)より購入した。*PIK3CA*, *PTEN*, *KRAS*, *BRAF* 変異についてはCOSMIC database (http://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines)により調べた。

MCAS、OAW42 は 10%FBS 添加 DMEM 溶液 (Sigma-Aldrich 社) を培地とし、JHOM-2B は DMEM/F12 (Invitrogen 社) を培地とし、その他の 3 細胞株は F12 (Invitrogen 社) を培地として、37°C 5%CO₂ 下で培養した。

2. 試薬

PI3K/mTOR 阻害剤 (SAR245409) は Sanofi (Paris, France) より、MEK 阻害剤 (pimasertib) は Merck Serono (Darmstadt, Germany) より原末提供を受けた。DMSO (dimethylsulfoxide) に溶解し、DMSO 濃度は全てのアッセイで 0.1%以下となるように調整した。

SAR245409 は pyridopyrimidinone 誘導体で、全クラス I PI3K と mTOR の選択的な ATP 競合阻害剤である⁴⁵。SAR245409 は mTOR を PI3K 依存のおよび PI3K 非依存の機序で mTOR を阻害するため、PI3K/AKT シグナルよりも mTOR シグナルの方をより低濃度で抑制することができる⁴⁵。Pimasertib は ATP 非競合的な MEK1/MEK2 の第二世代阻害剤である⁴⁶。両薬剤とも経口薬で、他種の固形腫瘍に対して第 I/II 相臨床試験が行われている (<https://clinicaltrials.gov/>: NCT01936363)。マウスモデルを用いた実験も含めた既報において、SAR245409 100-30000nM、pimasertib 2-20000nM の濃度設定において毒性を認めないことが

確認されており^{45,46}、SAR245409 については本研究では 100nM より低濃度の設定も設けて実験を行った。

用いた実験手法とその目的は下記の通りである。

- ・ MTT アッセイ →腫瘍増殖抑制効果の測定、IC₅₀ 値の算出
- ・ LDH アッセイ →細胞障害性の測定
- ・ ウェスタンブロット法 →リン酸化レベルの測定
- ・ フローサイトメトリー法 →細胞周期解析
- ・ Annexin V-FITC 法 →アポトーシス解析
- ・ FRET イメージング法 →分子活性の定量化

各実験方法の詳細は以下の各項目に記す。

3. MTT アッセイ (細胞増殖抑制試験) と LDH (lactate dehydrogenase) アッセイ

tetrazolium salt, WST-8 を用いた Cell counting Kit (Dojindo, Tokyo, Japan) を用いて、細胞生存率を計測した。具体的には、薬剤添加前日に 96Well Plate に 2×10^3 個/well の培養細胞を撒き、各濃度の薬剤を添加してから 72 時間後にアッセイを行った。アッセイは各々 3 回以上行い、細胞増殖抑制曲線を作成した。

450nm 波長の吸光光度計を用いて計測を行い、DMSO のみ添加の細胞群の吸光度をコントロールとして、細胞生存率を計算した。50%増殖阻害濃度 (IC₅₀ 値) について、細胞増殖曲線をもとに算出した。

細胞障害性は、培地中に放出された LDH を測定することにより測定した。

MTT アッセイと同様に細胞を 96 well プレートに準備し、メディウムを 50ul ずつ 96 well プレートの各 well に添加して、CytoTox-ONE Homogenous Membrane Integrity Assay (Promega, Madison, WI, USA)をプロトコールに従って用いて、細胞外へ放出された LDH を測定した。

4. ウェスタンブロット法

RTK/PI3K-AKT/mTOR 経路の蛋白の発現及びリン酸化レベルを調べるためにウェスタンブロット法による解析を行った。培養細胞に各薬剤を各々の設定濃度で添加し、設定した時間インキュベートを行った後で細胞を 1% triton を含むサンプルバッファー (50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 150 mmol/L sodium chloride, 5 mmol/L EDTA, 2 mmol/L sodium orthovanadate, and 10 mmol/L sodium fluoride) を用いて溶解し Lysate を回収した。これを 15,000rpm で 20 分間、4°Cで遠心し、上清をタンパク抽出液とした。タンパク濃度は Bradford assay (Bio-Rad) にて測定した。タンパクは SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により分離し、immobilon

トランスファーメンブレン (Millipore) にて転写した。転写膜を TBST に溶解した 5%スキムミルクで 30 分振盪しながらインキュベートした。その後、スキムミルクを洗浄し、一次抗体に浸し 4°C 下に一晚静置した。一次抗体は AKT, phosphorylated AKT (p-AKT) (Ser473), S6, p-S6 (Ser235/236), p70 S6 Kinase (S6K), phospho-p70 S6 Kinase (p-S6K), p-MDM2 (Ser166), ERK, p-ERK (ERK1/2-Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), MDM2 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), and beta-actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を使用した。一次抗体を洗浄後、希釈した二次抗体 (Cell signalling) にて 1 時間インキュベートした後、二次抗体の洗浄を行った。ECL kit (GE healthcare, Piscataway, NJ) で蛍光標識し、撮影機 (GE healthcare) にて画像化した。

5. 細胞周期解析

60mm dish に細胞 (5×10^5) をまき、SAR245409、pimasertib を各濃度で添加した後 72 時間培養した。トリプシン試薬で細胞を回収し、PBS で 2 回洗浄後、RNase (0.25mg/ml, Sigma-Ardrich) で 37°C 30 分間処理し、その後 PI (50 μ g/ml, Sigma-Ardrich) で 4°C 30 分間暗所で核染色し、フローサイトメトリー法 (BD FACSCalibur HG, Franklin Lakes, NJ) を用いて細胞周期を解析した。解析ソフトは CELLQuest pro ver.3.1 (Beckman Coulter Epics XL, Beckman Coulter) を用いた。

6. Annexin V-FITC アポトーシス解析

60mm dish に 5×10^5 個の細胞を撒き 24 時間インキュベートした上で、DMSO 及び薬剤を添加し、72 時間インキュベート後にトリプシン処理を行った。PBS で 2 回洗浄後、annexin-V FITC (QIAGEN) と PI で 2 重染色を行い、アポトーシス細胞数をフローサイトメトリーを用いてカウントした。アッセイは各 3 回行い、アポトーシス誘導率を算出した。

7. Small interfering RNA(siRNA)による遺伝子サイレンシング

培養細胞を 60mm dish に約 30%の細胞密度になるようにまき、24 時間インキュベートを行った。MEK1、MEK2、ERK1、ERK2 をそれぞれコードする *MAP2K1* (HSS108559, 108560)、*MAP2K2* (HSS183388, 183389)、*MAPK3* (HSS108538, 108539)、*MAPK1* (HSS183535, 183536) の small interfering RNA (siRNA) duplexes を用いて試薬と共に添加した。トランスフェクション試薬は Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA) と Opti-MEM medium (GIBCO) を使用した。siRNA は全て Invitrogen 社より購入した。Negative control Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) をコントロールとして使用した。

8. FRET (fluorescence resonance energy transfer) バイオセンサー発現細胞株の樹立

S6K と ERK の FRET バイオセンサーは青木一洋先生 (京都大学、京都、日本) より譲渡いただいた⁴⁷。まず培養細胞株に pT2Apuro-HistoneH1-mCherry と pCAGGS-T2TP を核マーカーとして導入し、ピューロマイシン (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1.0ug/ml により 7 日間薬剤選択をかけた後、pCMV-mPBase と pPBbsr-EKAREV-nls、または pCMV-mPBase と pPBbsr-Eevee-S6K-nes を導入し、ブラスチジン S (InvivoGen, San Diego, CA, USA) 1.0ug/ml により 7 日間薬剤選択をかけた⁴⁸。導入試薬は Fugene HD (Promega) をプロトコールに従って使用した。

9. FRET イメージング

EKAREV-nls/Histone H1-mCherry 発現細胞株 (ERK の FRET バイオセンサーを核に発現する細胞株) と Eevee-S6K/Histon H1-mCherry 発現細胞株 (S6K の FRET バイオセンサーを細胞質に発現する細胞株) を、96well プレートに 3×10^3 /well で撒き、細胞が接着してから、メディウムを 20mM HEPES、10%FBS、ペニシリンとストレプトマイシンを添加した Medium 199 溶液 (Sigma-Aldrich) 200ul でおきかえた。37°C 5%CO₂ 下で培養し、薬剤添加前、添加後 30 分、3 時間、24

時間、48 時間、と経時的に蛍光顕微鏡で観察した。薬剤は、96well プレーートの縦方向に SAR245409 の濃度を 8 段階、横方向に pimasertib の濃度を 8 段階設定し、64 通りの両薬剤の濃度の組合せの効果を同一条件下で経時的に検証した。画像は CCD カメラ (DOC CAM HR; Molecular Device, Sunnyvale, CA) 搭載の倒立顕微鏡で撮影した^{49,50}。

S6K 活性と ERK 活性のデータは“AND gate model”という数理モデルを用いて細胞増殖と細胞死との関連性を解析した⁵¹。アッセイの間、細胞が対数増殖期であると仮定した場合のシミュレーション上の総細胞数と死細胞数を MTT アッセイと LDH アッセイのデータから算出し、FRET イメージング法により測定された S6K 活性、ERK 活性（薬剤添加後 3 時間の活性）とを、AND gate model により統合することで、S6K と ERK が細胞増殖と細胞死にそれぞれどの程度寄与しているか定量化した。

10. 統計解析

各データは少なくとも 3 回の独立したアッセイから平均±標準偏差を求めた。2 群間の有意差に関しては student t 検定を行い、p 値が 0.05 以下のものを有意差ありと判定した。2 種類の分子標的薬の併用実験については、Chou-Talalay

method を用いて combination index (CI)を算出した⁵²。CI < 1 は synergism、CI = 1 は additive、CI > 1 は antagonism をそれぞれ意味している。

第3章 結果

I. 子宮体癌細胞株における SAR245409 と pimasertib の併用療法の抗腫瘍効果

I-1. 子宮体癌細胞株における SAR245409 と pimasertib 各単剤の抗腫瘍効果

各細胞株における、両薬剤の IC_{50} 値を図4に示した。SAR245409 の IC_{50} 値は 0.5 μ M-7 μ M に分布しており、一方で、pimasertib の IC_{50} 値は 0.1 μ M-20 μ M 以上と細胞株によって大きく異なった。

子宮体癌細胞株 12 株のうち、6 株 (50%) は pimasertib に対して $IC_{50} < 5\mu$ M と高い感受性を示した。一方、残りの 6 株は $IC_{50} > 5\mu$ M と感受性が低かった。それぞれを pimasertib 感受性株、pimasertib 抵抗性株として分類することとした。

各細胞株の *PIK3CA*, *PTEN*, *KRAS* の変異と IC_{50} 値は表1に示した。

AN3CA と Ishikawa はいずれも *PTEN* 変異陽性、*PIK3CA* 変異陰性であるが、SAR245409 に対して $IC_{50} < 1\mu$ M と感受性が高かった。しかし、*PIK3CA*、*PTEN* 変異の有無はいずれも SAR245409 の IC_{50} 値とは相関していなかった。さらに、pimasertib への感受性も、*KRAS* 変異と相関していなかった。例えば、*KRAS* 変異の4株のうち、HEC-1B, HEC-50B の2株のみが pimasertib 感受性であった。すなわち、SAR245409、pimasertib それぞれへの感受性と、遺伝子変異とには、いかなる相関も認められなかった。

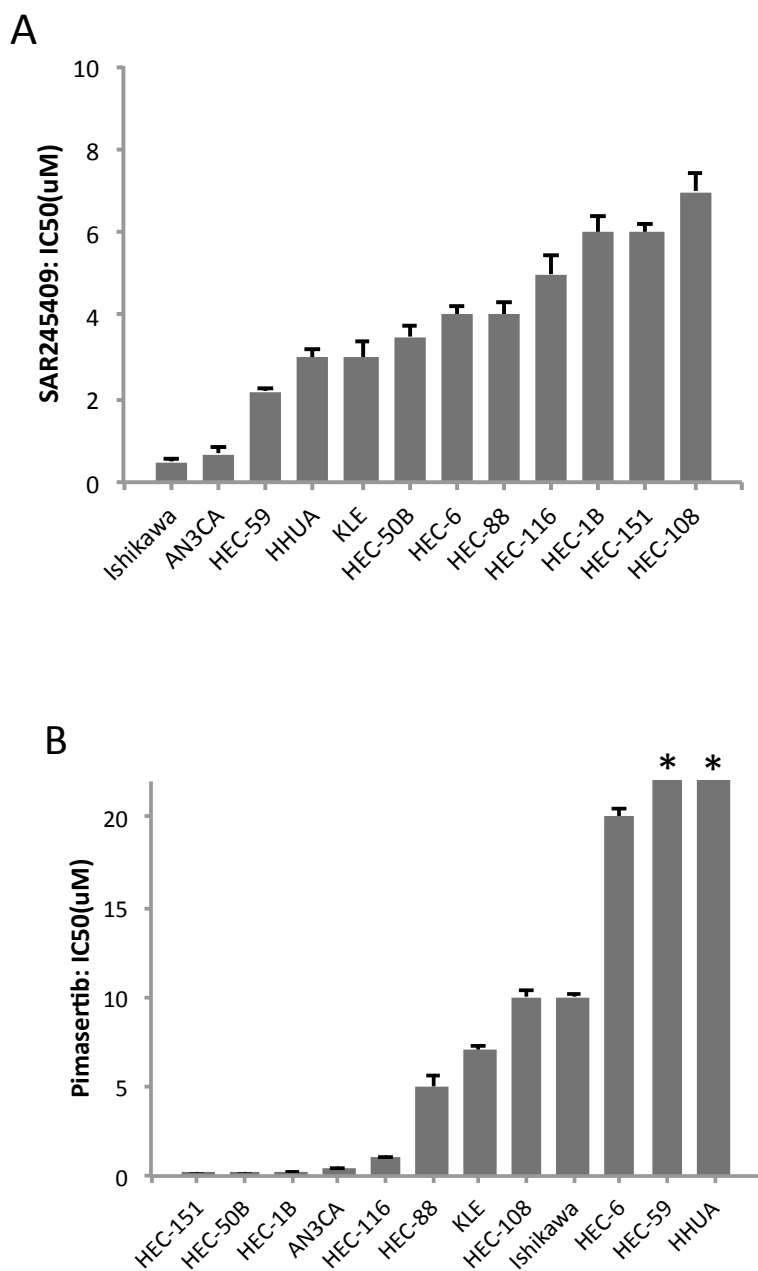


図4 子宮体癌細胞株における各薬剤の50%増殖抑制濃度 (IC₅₀ 値)
 (A) SAR245409、(B) pimasertib それぞれ単剤添加時の50%増殖抑制濃度。
 (A), (B) ともに、12種類の体癌細胞株に各薬剤を添加し、MTTアッセイにて増殖抑制曲線を作成し、IC₅₀ 値を算出した。各データは、3回の実験の平均値±標準誤差 (Standard Error: SE) である。*(B)における、HEC-59 と HHUA IC₅₀ 値は> 25 μM であった。

表 1 主要な遺伝子の変異の有無と各薬剤の IC50 値

	Mutation Status			SAR245409	Pimasertib
	<i>PIK3CA</i>	<i>PTEN</i>	<i>KRAS</i>	IC50 (uM)	
HEC-116	mut	mut	wt	5	1
HEC-1B	mut	wt	mut	6	0.15
HEC-88	mut	mut	wt	4	5
HEC-50B	wt	wt	Gain	3.5	0.1
AN3CA	wt	mut	wt	0.7	0.4
HEC-151	wt	mut	wt	6	0.1
HEC-6	mut	mut	wt	4	20
HEC-108	wt	mut	wt	7	10
HEC-59	mut	mut	wt	2.2	>20
Ishikawa	wt	mut	wt	0.5	10
HHUA	mut	mut	mut	3	>20
KLE	wt	wt	Gain	3	7

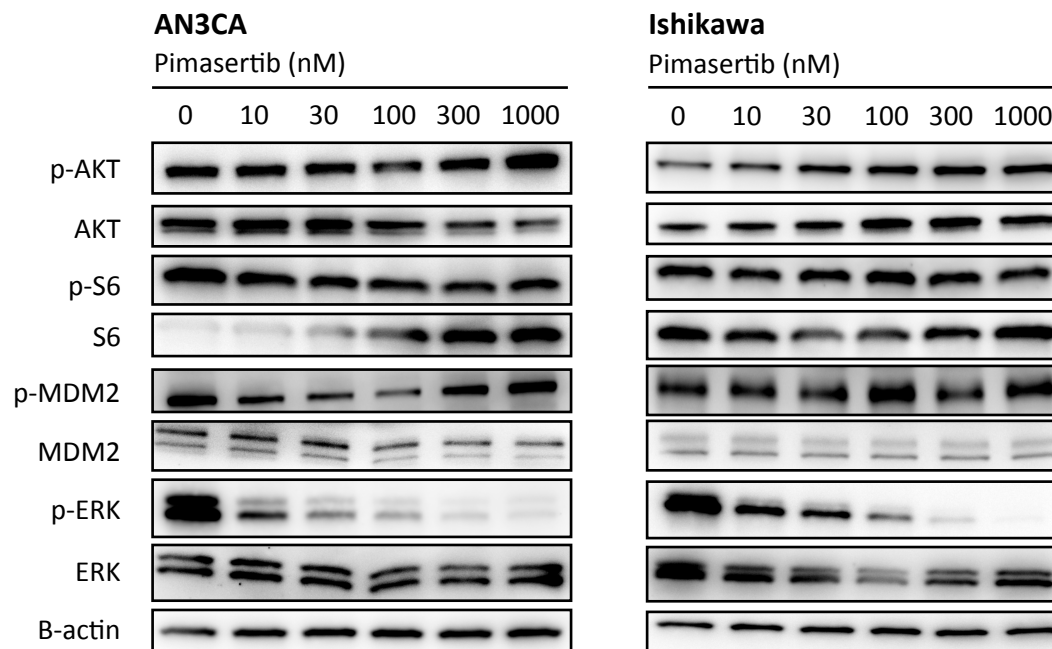
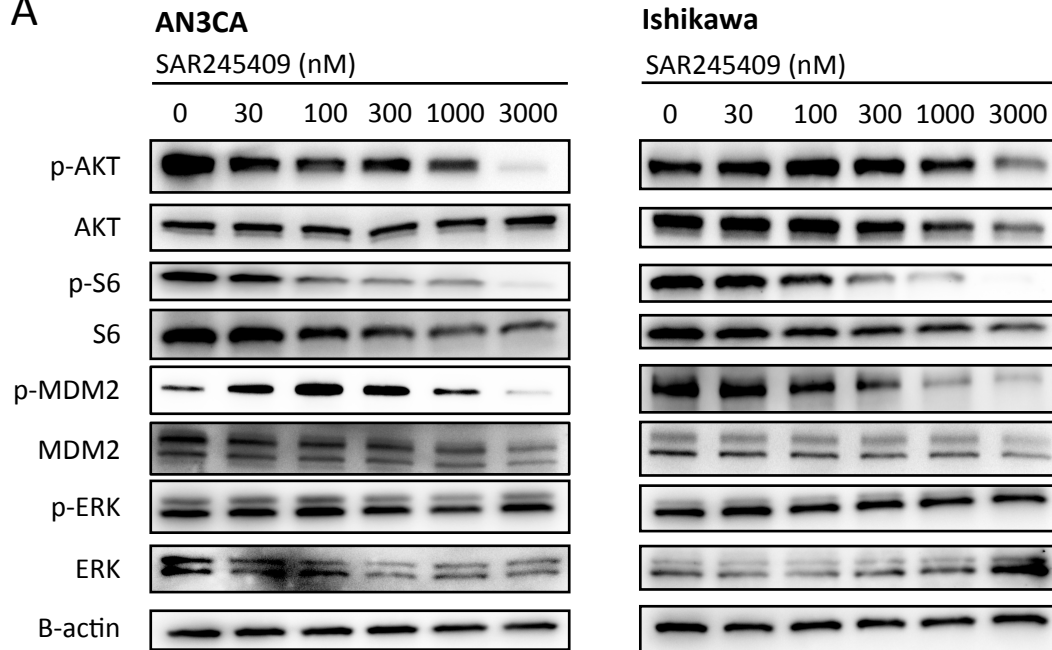
mut: 変異陽性、wt: 変異なし、Gain: コピー数異常

続いて、両薬剤の PI3K/mTOR 経路、MAPK 経路のシグナルへの効果をウエスタンブロット法で調べ (図 5 A)、標的分子のリン酸化レベルを Image J ソフトを用いて定量化した (図 5 B)。SAR245409 は AKT と MDM2 のリン酸化を 0.1-1uM 以上の濃度で抑制し、S6 のリン酸化は 100-300 nM 以上の濃度で抑制した。

Pimasertib は 10-30 nM 以上の濃度で ERK のリン酸化を抑制しており、Pimasertib の方が SAR245409 よりもより低濃度で標的タンパクのリン酸化を抑制していた。

また、Ishikawa (Pimasertib 抵抗性) よりも AN3CA (Pimasertib 感受性) の方が、Pimasertib 10nM からより十分に ERK のリン酸化を抑制した。

A



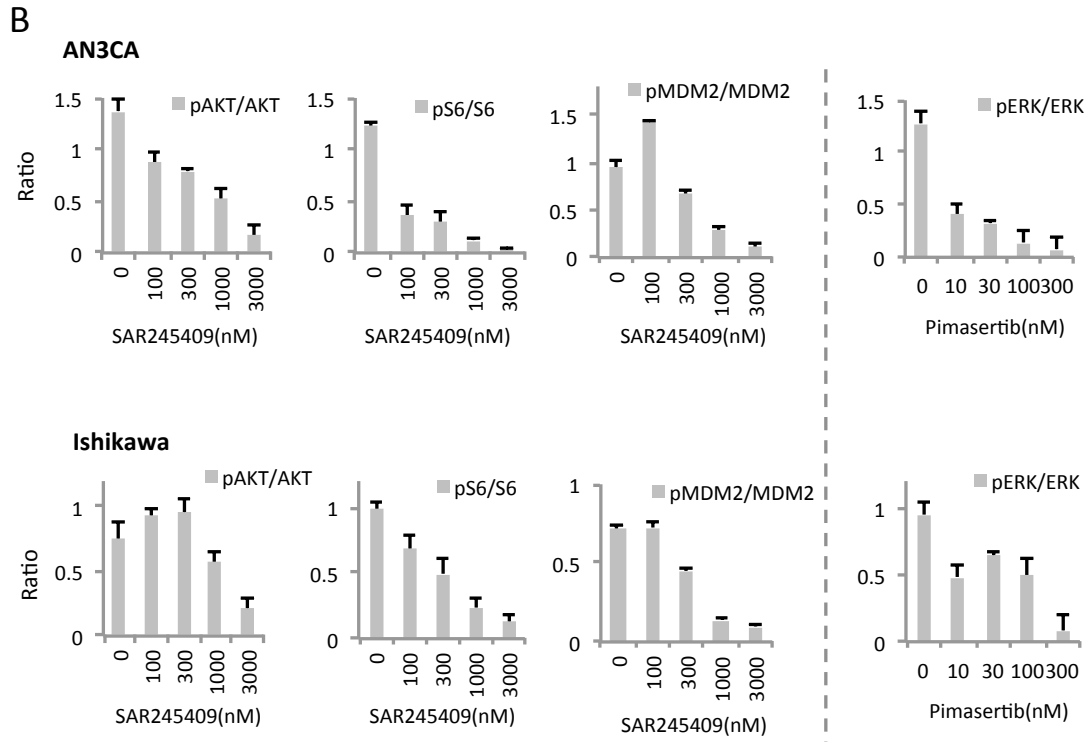


図5 SAR245409によるPI3K/mTOR経路の抑制とpimasertibによるMAPK経路の抑制

(A) SAR245409 (0–3,000 nM)またはpimasertib (0–1,000 nM)を添加したAN3CA (左：pimasertib感受性)、Ishikawa (右：pimasertib抵抗性)より蛋白を抽出してウエスタンブロットを行った。PI3K, mTOR, MAPKの抑制を評価するために、それぞれp-AKT, p-S6, p-ERKのリン酸化レベルを評価した。(B) SAR245409によるp-AKTとp-S6の抑制と、pimasertibによるp-ERKの抑制をImage Jソフトにより定量化した。それぞれ4段階の濃度設定で、総蛋白量に対するリン酸化蛋白量の比を求めた。各データは、3回の実験の平均値±標準誤差 (Standard Error: SE)である。

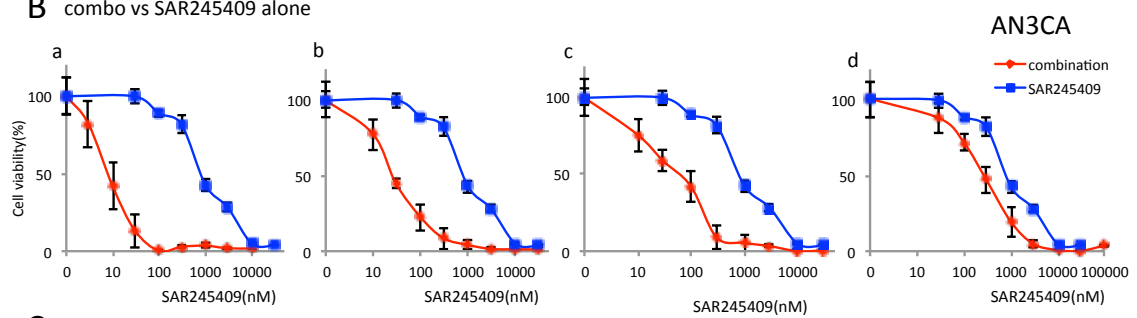
I-2. Pimasertib 感受性株における SAR245409 と低濃度の pimasertib との併用による相乗効果

AN3CA に対して pimasertib と SAR245409 を様々な濃度の組み合わせで同時に投与し、抗腫瘍効果を検討した。図 6 A に示す 4 通りの組合せで両薬剤を添加し、MTT アッセイを行った。両剤併用時の細胞増殖抑制曲線をそれぞれ単剤時 (SAR245409 のみ、または pimasertib のみ) のものと比較したところ、各薬剤単独に比べて、併用療法の方が著明に細胞増殖を抑制した。図 6B, 6C に示す通り、AN3CA 株において、SA245409 または pimasertib 単剤 (青線) に比べ、併用療法を行った場合 (赤線) は IC_{50} 値がいずれの濃度設定でも有意に低下していた。

A

a	SAR245409 (nM)	0	3	10	30	100	300	1000	3000	10000
	pimasertib (nM)	0	10	30	100	300	1000	3000	10000	30000
b	SAR245409 (nM)	0	10	30	100	300	1000	3000	10000	30000
	pimasertib (nM)	0	10	30	100	300	1000	3000	10000	30000
c	SAR245409 (nM)	0	10	30	100	300	1000	3000	10000	30000
	pimasertib (nM)	0	3	10	30	100	300	1000	3000	10000
d	SAR245409 (nM)	0	30	100	300	1000	3000	10000	30000	100000
	pimasertib (nM)	0	3	10	30	100	300	1000	3000	10000

B combo vs SAR245409 alone



C combo vs pimasertib alone

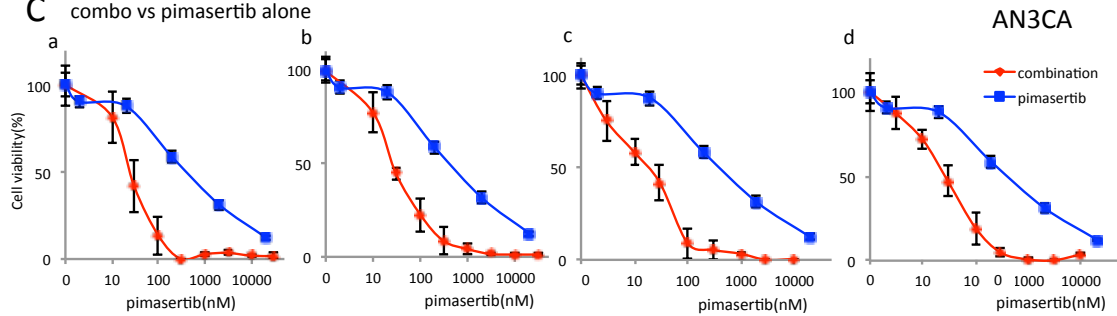


図6 pimasertib と SAR245409 の併用による抗腫瘍効果

(A) 4 種類のパターンで、各薬剤の濃度を増量していき、両薬剤併用下で MTT アッセイを行った。(B) AN3CA 株において SAR245409 単独の場合 (青線) と pimasertib 併用 (赤線 : a, b, c, d はそれぞれ (A) の濃度に対応) と比較検討した。(C) AN3CA 株において pimasertib 単独の場合 (青線) と SAR245409 併用 (赤線 : a, b, c, d はそれぞれ (A) の濃度に対応) とを比較検討した。(B), (C) ともに 3 回の実験を行い、平均値 ± SD 値を算出した。

続いて、併用効果が相乗的か否かを検証した。Pimasertib の濃度を 100nM, 30nM, 10nM に固定して、SAR245409 と併せて添加した。Pimasertib 感受性株においては、pimasertib 30nM との併用効果は pimasertib 100nM との併用効果と同等であった (図 7A-7C : 緑線と橙線参照)。しかし、pimasertib 10nM との併用では明らかな併用効果を認めなかった (赤線と青線を参照)。Ishikawa を含む pimasertib 抵抗性の 6 株においては、いかなる併用効果も認めなかった (図 7D)。pimasertib 感受性の 6 株全てにおいて、pimasertib 30nM との併用での CI (combination index) は 0.46 以下であった (相乗効果あり) (表 2)。一方、pimasertib 100nM との併用では 6 株中 2 株は CI が 1 より高く、pimasertib 10nM との併用では 6 株中 3 株は CI が 1 より高く、相乗効果を示さなかった。以上より、pimasertib 30nM と SAR245409 との併用が最も相乗効果が高いことが示された。

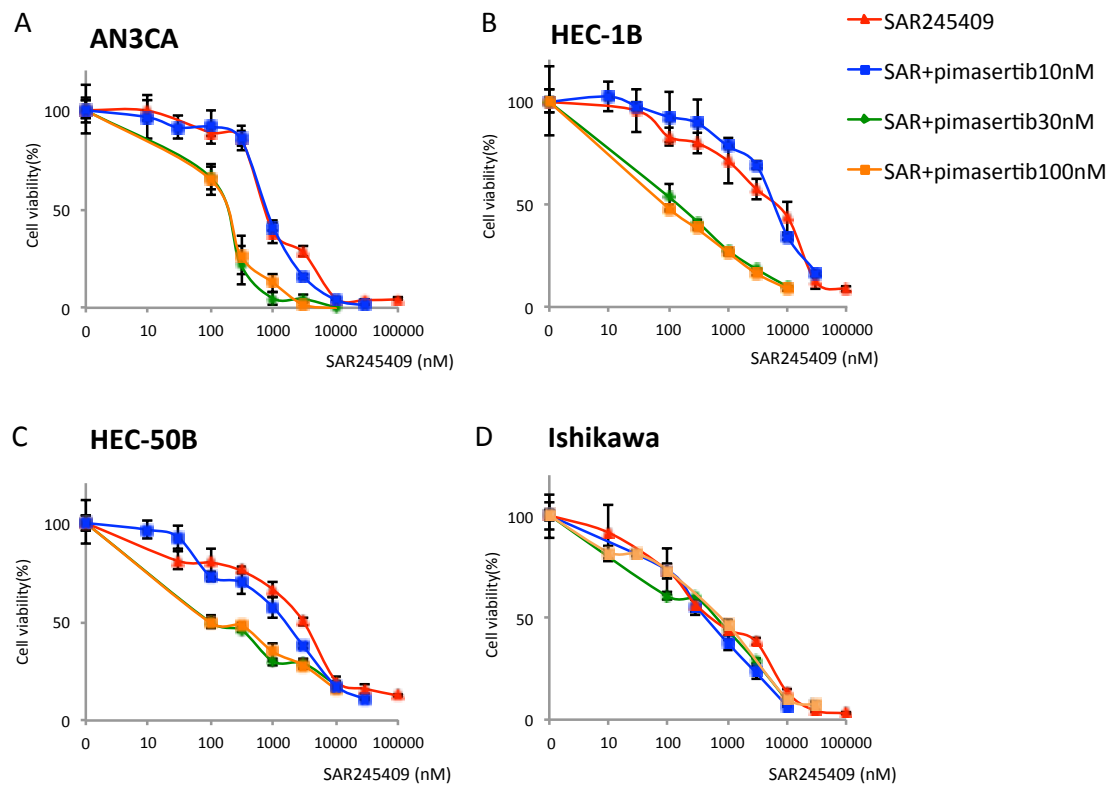


図7 (A-D) pimasertib と SAR245409 の併用による抗腫瘍効果。pimasertib 感受性の AN3CA (A)、HEC-1B (B)、HEC-50B (C) と、pimasertib 抵抗性の Ishikawa (D) において、SAR245409 と pimasertib の併用療法による MTT アッセイを行った。Pimasertib の濃度を 100nM, 30nM, 10nM に固定して、SAR245409 単剤の結果と比較した。いずれも 3 回の実験を行い、平均値±SD 値を算出した。

表2 pimasertib と SAR245409 の併用による相乗効果

	SAR245409	SAR245409 + Pimasertib 30nM		SAR245409 + Pimasertib 100nM	SAR245409 + Pimasertib 10nM
	IC50 (uM)	IC50 (uM)	CI	CI	CI
HEC-116	5	0.2	0.07	0.14	1.01
HEC-1B	6	0.1	0.22	0.68	1.07
HEC-88	4	1	0.25	0.52	0.25
HEC-50B	3.5	0.1	0.32	1.03	0.53
AN3CA	0.7	0.2	0.36	0.53	1.03
HEC-151	6	1	0.46	1.67	0.27
HEC-6	4	4	1		
HEC-108	7	7	1		
HEC-59	2.2	3	1.4		
Ishikawa	0.5	0.7	1.4		
HHUA	3	7	2.3		
KLE	3	9	3		

CI: combination index

CI < 1.0: synergism, CI=1.0: additive, CI > 1.0: antagonism

さらに、SAR245409 を 300nM, 1uM に固定して pimasertib と併用し MTT アッセイを行った。SAR245409 300nM との併用では併用効果を認めなかったが、pimasertib 感受性株 (AN3CA, HEC-1B, HEC-50B)においては、SAR245409 1uM との併用は SAR245409 単剤と比較して著明に増殖を抑制した (図 8A-8C)。

pimasertib 抵抗性株 Ishikawa においては、有意な併用効果は認められなかった (図 8D)。CI (combination index) を算出すると、SAR245409 300nM と pimasertib との併用では CI はいずれも 1.0 以上であり、相乗効果を認めなかった。

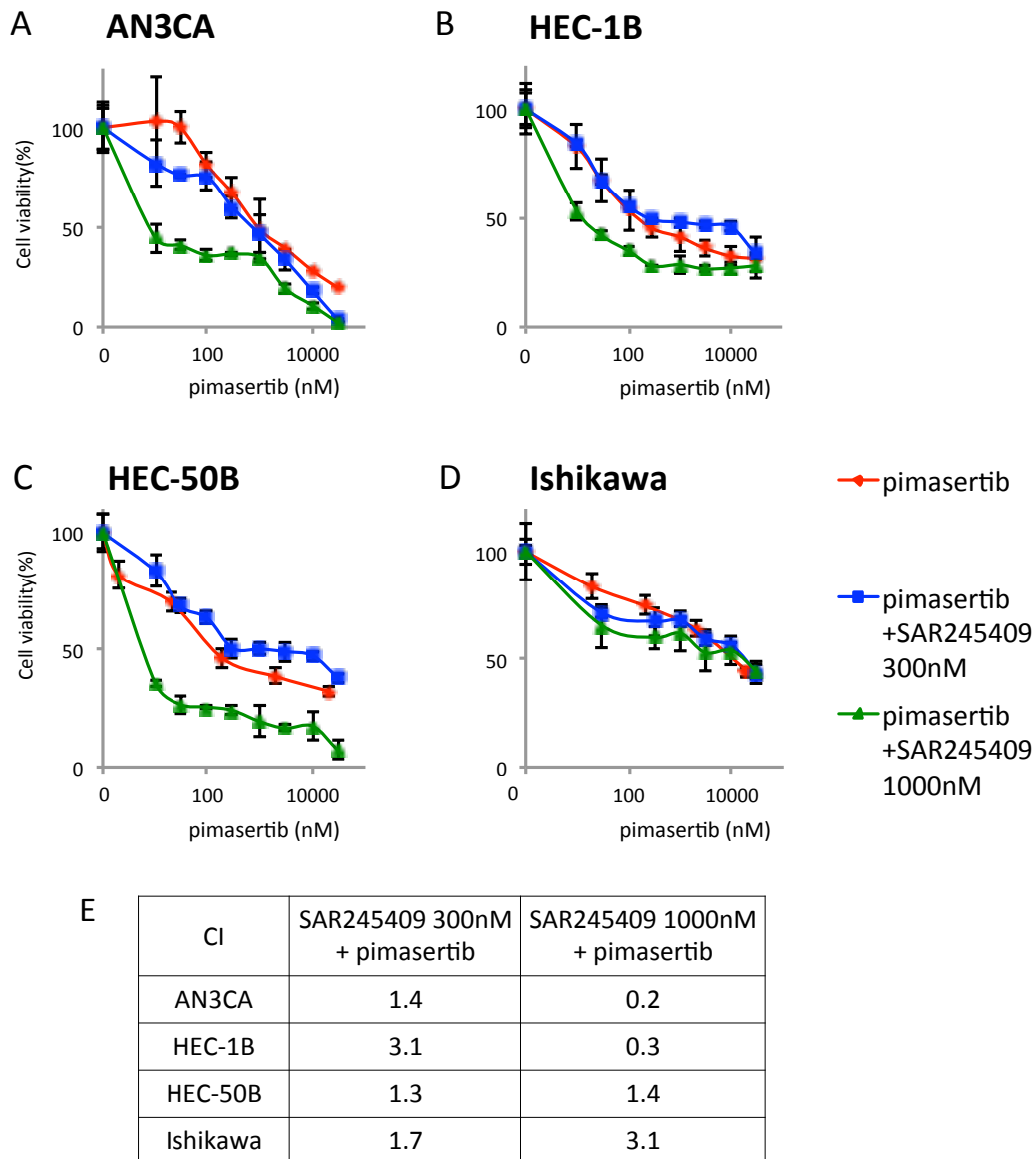


図 8 pimasertib と SAR245409 の併用による抗腫瘍効果

図 7 と同じ 4 細胞株(A:AN3CA, B: HEC-1B, C: HEC-50B, D: Ishikawa) において、SAR245409 の濃度を 300nM, 1000nM に固定して pimasertib と併用し MTT アッセイを行った。結果は pimasertib 単剤の結果と比較した。いずれも 3 回の実験を行い、平均値±SD 値を算出した。(E) CI (combination index)を Chou-Talalay 法により算出した。SAR245409 300nM もしくは 1000nM と pimasertib 10-30,000nM とを併用して各細胞株に添加した。CI < 1.0 は併用効果が相乗的であることを示している。

I-3. SAR245409 と低濃度の pimasertib との併用療法によるリン酸化抑制、細胞周期 G1 停止

図 1 で示す通り、MAPK 阻害によりリン酸化が抑制される標的タンパクとして、ERK が、PI3K/mTOR 同時阻害によりリン酸化が抑制される標的タンパクとして、AKT、S6、MDM2 が挙げられる。SAR245409 1 μ M と pimasertib 30nM による標的タンパクのリン酸化レベルをウエスタンブロット法にて検討した。両薬剤はそれぞれ単剤でも標的タンパクのリン酸化を抑制し、併用において、AKT、MDM2、S6、ERK 全てのタンパクのリン酸化(p-AKT, p-MDM2, p-S6, p-ERK) が抑制された (図 9)。

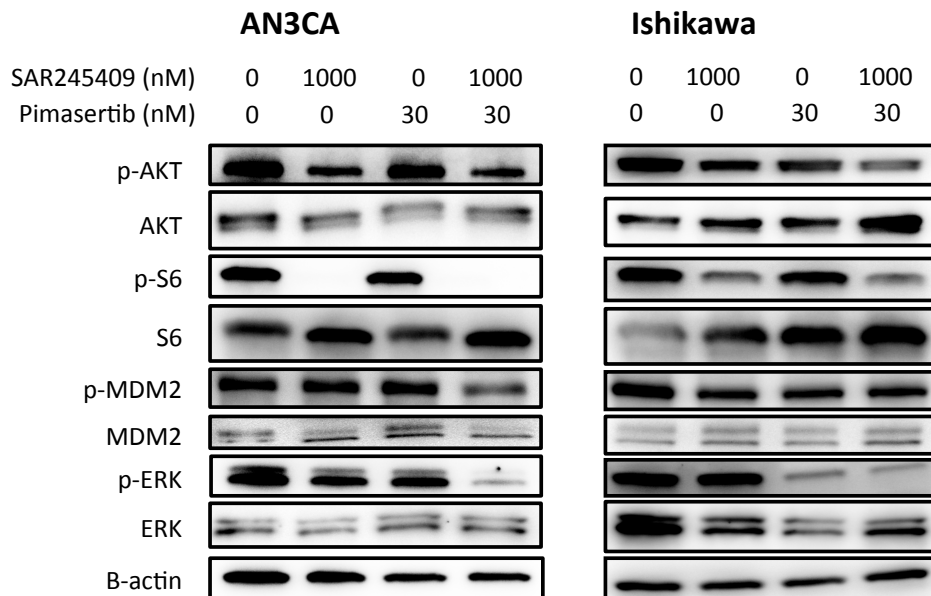


図 9 SAR245409 と pimasertib の単剤および併用時の標的タンパクの脱リン酸化 AN3CA, Ishikawa 株にそれぞれ SAR245409, pimasertib を単剤もしくは併用で図に示す濃度で添加し、MAPK 経路 (p-ERK)、PI3K/mTOR 経路(p-AKT, p-MDM2, p-S6)のリン酸化をウエスタンブロット法にて評価した。

続いて、SAR245409 1 μ M と pimasertib 30nM の併用療法下で細胞周期解析をフローサイトメトリー法にて行った。Pimasertib 感受性株においては併用療法により有意な S 期の減少と G1 期の増加を認めた。Sub-G1 期は単剤、併用いずれにおいても増加しなかった (図 10)。このことより子宮体癌細胞株における両薬剤の併用療法の相乗効果は主に細胞増殖抑制的な作用であると示唆される。

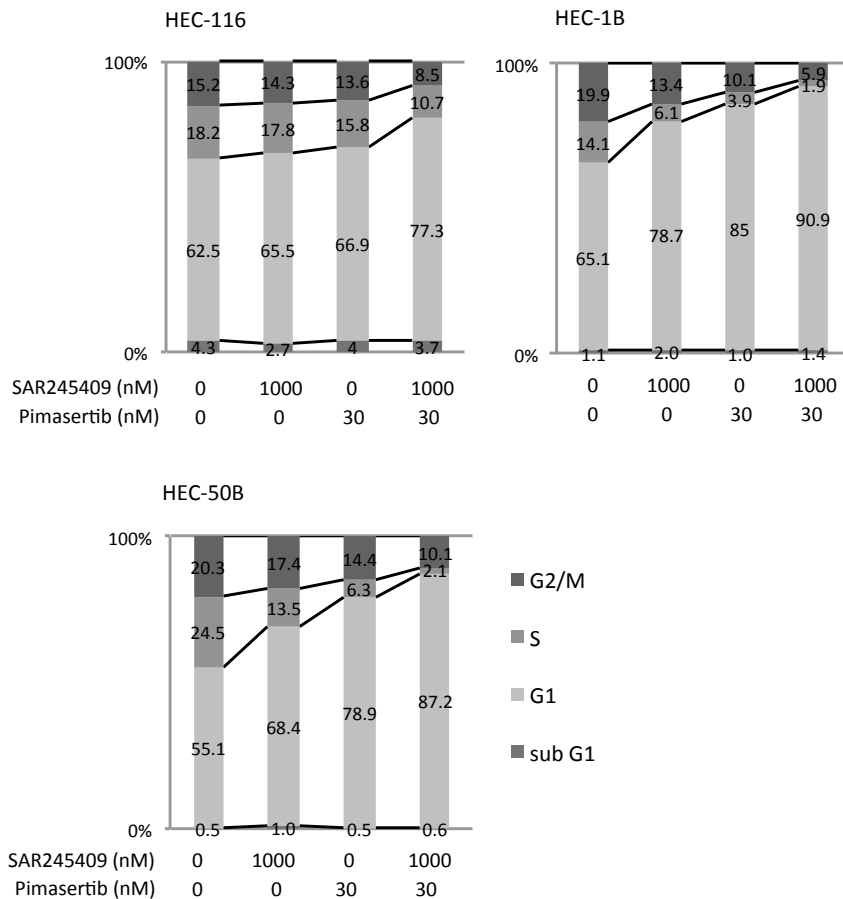


図 10 SAR245409 と pimasertib の併用療法下での細胞周期解析
HEC-116, HEC-1B, HEC-50B においてフローサイトメトリー法により細胞周期解析を行った。SAR245409 1 μ M、pimasertib 30nM 各単剤と、その併用療法による結果を、両薬剤を添加していないコントロールと比較した。

I-4. ERK1/2 ノックダウンによる SAR245409 感受性の増強効果

SAR245409 と MAPK 経路阻害との併用療法の抗腫瘍効果を裏付けるために、AN3CA の ERK1/2 をノックダウンしてから、SAR245409 単剤を添加して MTT アッセイを行った。ERK1/2 特異的な siRNA を 3 種類 (siERK1/2-1, 2, 3) 導入したところ、いずれの siRNA によっても、ERK1/2 の発現が 80%以上抑制されていることをウェスタンブロット法で確認した (図 11 A)。MTT アッセイにて、3 種類いずれの siRNA においても、ERK1/2 のノックダウンによる効果に加えて、ERK1/2 のノックダウンにより SAR245409 の増殖抑制効果が増強され、ネガティブコントロールと比較して有意に細胞増殖が抑制された (図 11 B)。

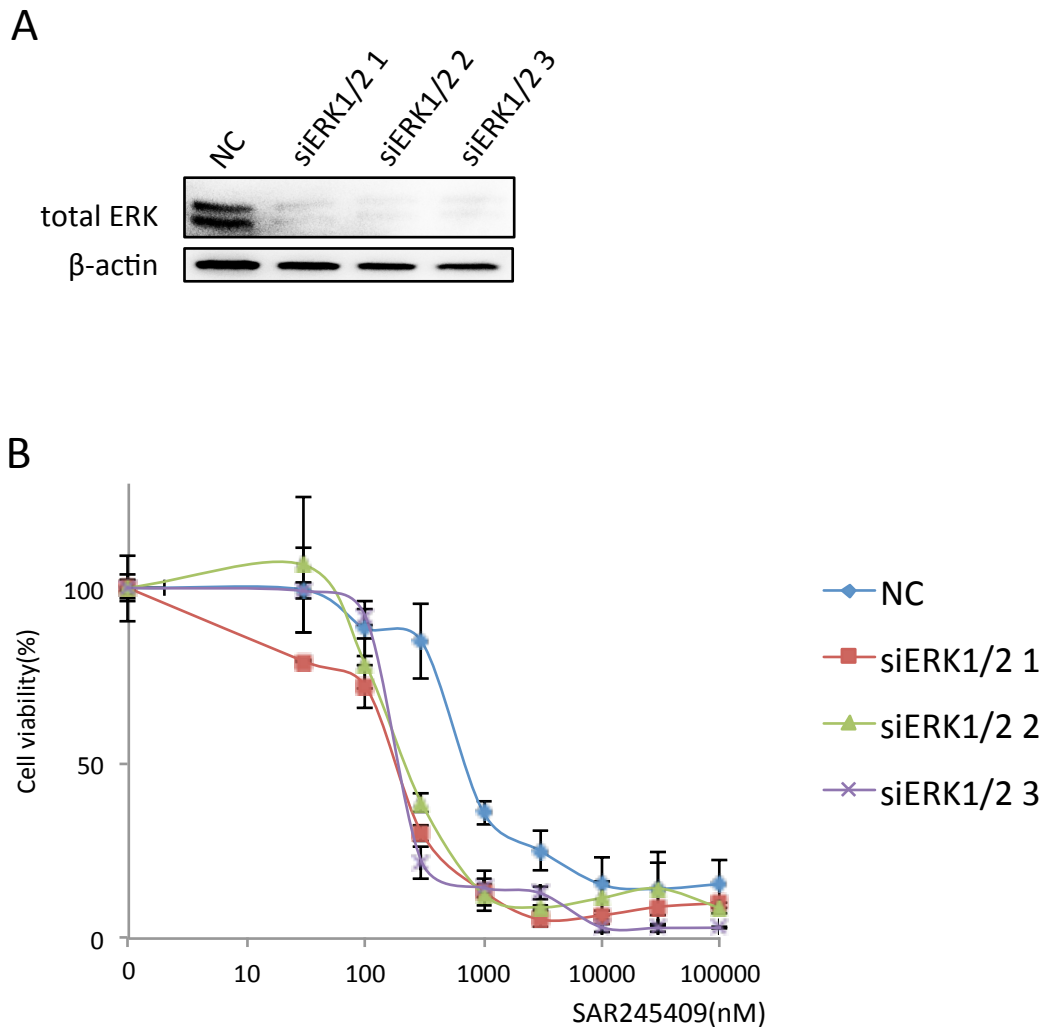


図 11 (A)AN3CA にて ERK1/2 を 3 種類の siRNA (siERK1/2 1, siERK1/2 2, siERK1/2 3) にてノックダウンし、ウエスタンブロット法にて total ERK の発現抑制を確認した。(B) (A)で用いた siRNA により、ERK をノックダウンした条件下で、SAR245409 を添加し、MTT アッセイを施行した。コントロール siRNA である NC (ネガティブコントロール) に比し、ERK1/2 のノックダウン併用では有意に細胞増殖が抑制された (青線と赤・緑・紫線を比較)。

II. 卵巣粘液性腺癌 (OMC) 細胞株における SAR245409 と pimasertib の併

用療法 of 抗腫瘍効果

II-1. 卵巣粘液性腺癌細胞株における SAR245409 と pimasertib 各単剤の抗

腫瘍効果

まず各単剤の抗腫瘍効果を MTT アッセイにより検証した。各細胞株における、両薬剤の IC₅₀ 値は図 12 の通りである (図 12A, 12B)。PTEN, PIK3CA, KRAS, BRAF (MAPK 経路) の変異についても図 12B に併記した。SAR245409 の IC₅₀ 値は 0.6uM-6uM であったが、一方で、pimasertib の IC₅₀ 値は 1.0uM-20uM 以上と細胞株によって大きく異なった (図 12)。OAW42 における pimasertib の IC₅₀ 値 (20 uM) は他の 5 細胞株よりも高かったが、OAW42 以外の 5 細胞株間においては pimasertib に対する感受性に明らかな差を認めなかった。

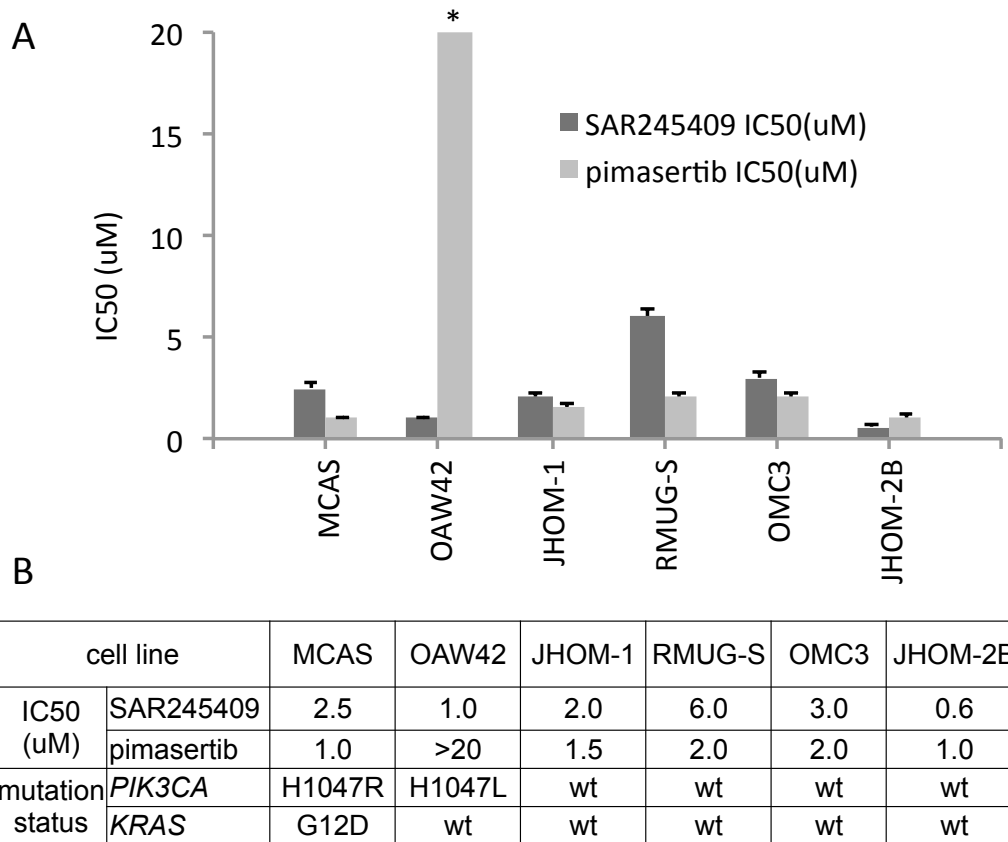


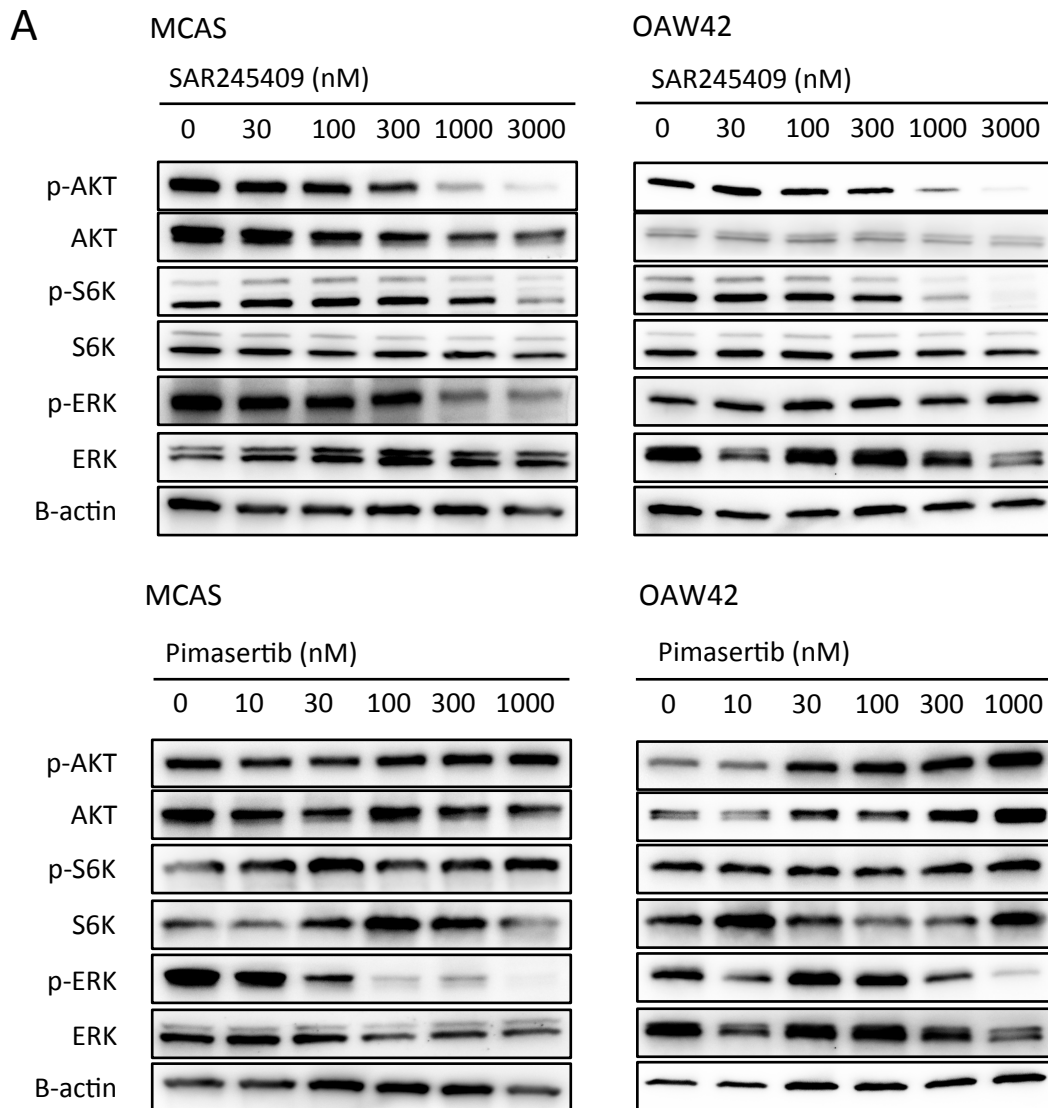
図 12 SAR245409、pimasertib 各単剤の抗腫瘍効果

(A) SAR245409、pimasertib 各単剤による IC₅₀ 値。IC₅₀ 値は MTT アッセイのデータより算出した。いずれも 3 回の実験を行い、平均値±SD 値を算出した。

*OAW42 の pimasertib に対する IC₅₀ 値は 20uM 以上であった。(B) 各細胞株の IC₅₀ 値と、*PIK3CA*, *KRAS* の変異の有無を示す。

続いて、これら 2 種類の阻害剤の単剤での各標的経路への効果をウエスタンブロット法で解析した (図 13 A)。標的蛋白のリン酸化レベルは Image J ソフトを用いて定量化した (図 13 B)。PI3K 経路の AKT, S6K のリン酸化を抑制するためには SAR245409 は 1uM 以上の濃度が必要であった。一方、pimasertib は 30-300nM 以上の濃度で MAPK 経路の ERK のリン酸化を抑制した。MCAS にお

いては pimasertib 30nM で十分に ERK のリン酸化が抑制されていたが、pimasertib 抵抗性の OAW42 においては、ERK のリン酸化抑制に pimasertib 300nM 以上必要であった。つまり両単剤の IC₅₀ 値は、標的蛋白のリン酸化を抑制する最低濃度よりもはるかに高いことが明らかとなった。



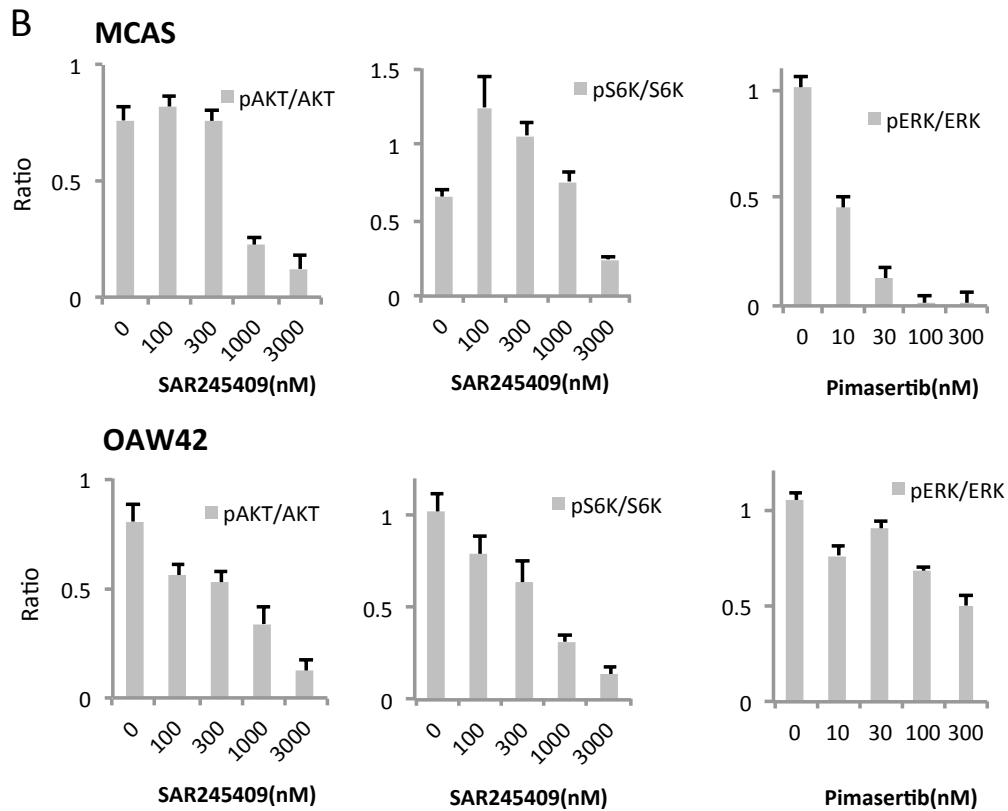


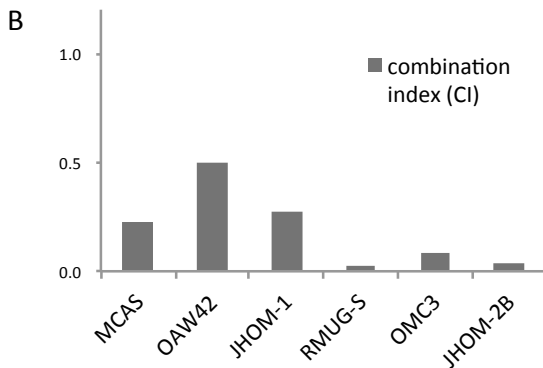
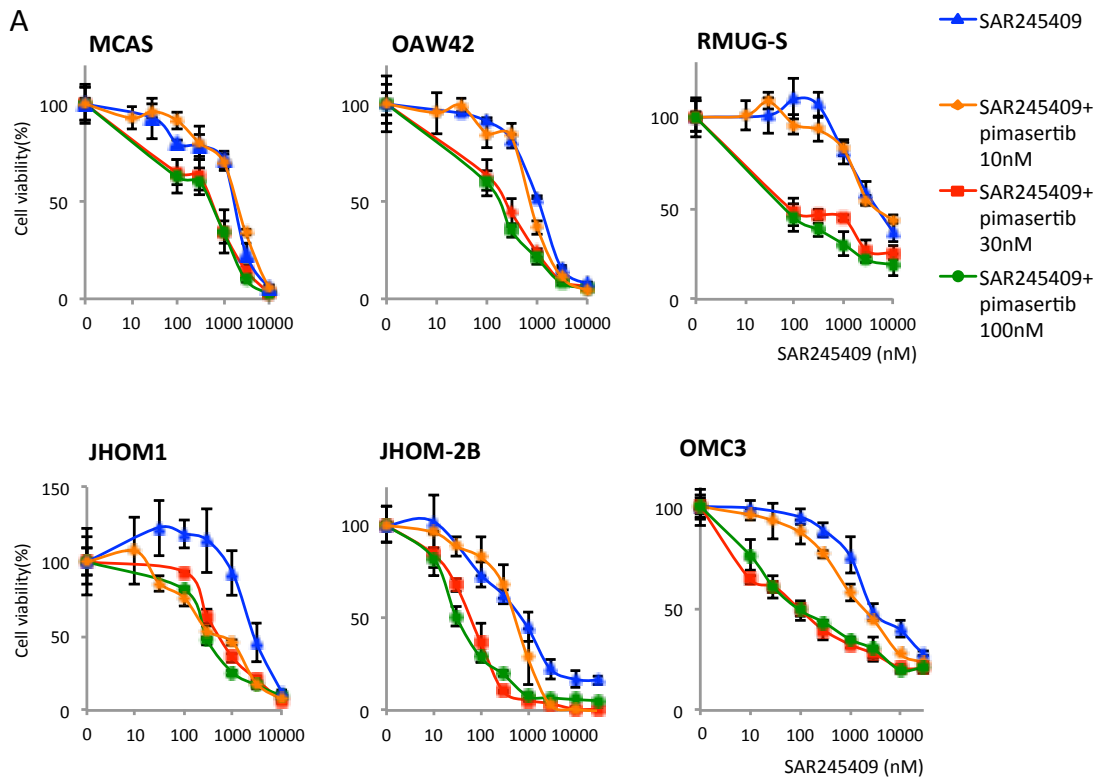
図 13 SAR245409 による PI3K/mTOR 経路の抑制と pimasertib による MAPK 経路の抑制

(A) SAR245409 (0–3,000 nM) または pimasertib (0–1,000 nM) を添加した MCAS, OAW42 の抽出蛋白を用いてウエスタンブロットを行った。PI3K, mTOR, MAPK の抑制を評価するために、p-AKT, p-S6, p-ERK をそれぞれ解析した。(B) SAR245409 による p-AKT, p-S6K の変化と、pimasertib による p-ERK の変化を、Image J ソフトを用いて定量化した。総蛋白量に対するリン酸化蛋白量の比を求めて定量化した。いずれも 3 回の実験を行い、平均値±SD 値を算出した。

II-2. 卵巣粘液性腺癌細胞株における SAR245409 と pimasertib の併用療法の抗腫瘍効果

の抗腫瘍効果

SAR245409 と pimasertib の併用療法が相乗効果を示すか否かを検討した。至適濃度の組合せを検証するため、pimasertib を 10nM, 30nM, 100nM に固定し、SAR245409 と併用して MTT アッセイを行った (図 14 A)。6 細胞株全てにおいて、pimasertib 30nM との併用効果は pimasertib 100nM と同等であった。しかし、pimasertib 10nM との併用では、JHOM-1 以外の細胞株では併用効果を認めなかった。そこで、pimasertib 30nM と SAR245409 との併用療法の CI を算出したところ、6 細胞株における CI は 0.03-0.50 であった (図 14 B)。KRAS や PIK3CA の変異にかかわらず、OMC 細胞株全般において相乗効果があることが示された。

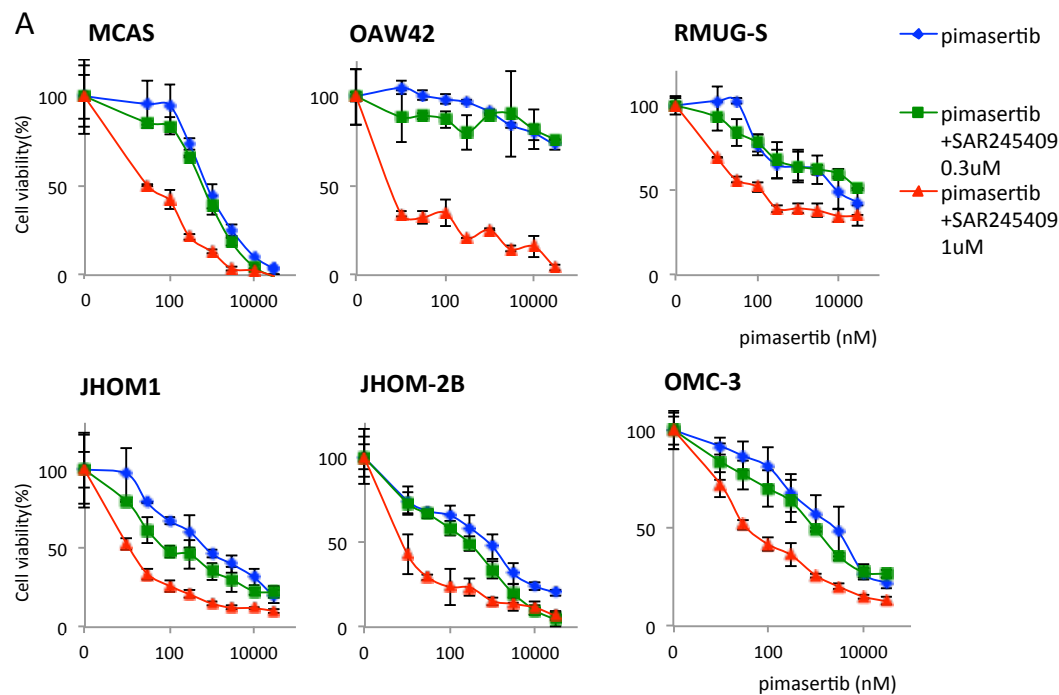


cell line	MCAS	OAW42	JHOM-1	RMUG-S	OMC3	JHOM-2B
combination index (CI)	0.23	0.50	0.27	0.03	0.08	0.04

図 14 SAR245409 と pimasertib の併用による抗腫瘍効果

(A) SAR245409 と pimasertib の併用による MTT アッセイ。Pimasertib の濃度を 100nM, 30nM, 10nM に固定し、SAR245409 単剤のデータと比較した。いずれも 3 回の実験を行い、平均値±SD 値を算出した。(B) CI (combination index)を Chou-Talalay 法により算出した。SAR245409 30-100,000nM と pimasertib 30nM とを併用して各細胞株に添加した。CI < 1.0 は併用効果が相乗的であることを示している。

さらに、SAR245409 を 300nM, 1uM に固定して、pimasertib と併用して MTT アッセイを行った。SAR245409 300nM を pimasertib と併用しても、細胞増殖抑制効果は pimasertib 単剤と同等であり（図 15 A）、CI（combination index）は 3 株（JHOM-1, JHOM-2B, OMC3）のみで 1.0 未満であった（図 15 B）。一方、SAR245409 1 uM を pimasertib と併用した場合には、抗腫瘍効果が著明に増強された（図 15 A）。



B

combination index (CI)	MCAS	OAW42	RMUG-S	JHOM-1	JHOM-2B	OMC3
SAR245409 300nM + pimasertib	1.1	1.3	3.1	0.4	0.9	0.6
SAR245409 1000nM + pimasertib	0.4	1.0	0.2	0.5	1.8	0.4

図 15 SAR245409 と pimasertib の併用による抗腫瘍効果

(A) SAR245409 と pimasertib の併用による MTT アッセイを行った。SAR245409 の濃度を 300nM, 1000nM に固定し、pimasertib 単剤のデータと比較した。いずれも 3 回の実験を行い、平均値±SD 値を算出した。(B) CI (combination index)を Chou-Talalay 法により算出した。SAR245409 300nM もしくは 1000nM と pimasertib 10-30,000nM とを併用して各細胞株に添加した。CI < 1.0 は併用効果が相乗的であることを示している。

SAR245409 1μM と pimasertib 30nM の併用療法が PI3K 経路と MAPK 経路の標的蛋白のリン酸化を抑制するかどうか、ウエスタンブロット法で検証した (図

16)。AKT と S6K のリン酸化は SAR245409 1 μ M で抑制され、pimasertib 併用による明らかな影響は認めなかった。ERK のリン酸化は pimasertib 30nM により抑制されたが、SAR245409 1 μ M と pimasertib 30nM との併用によりさらに抑制された。

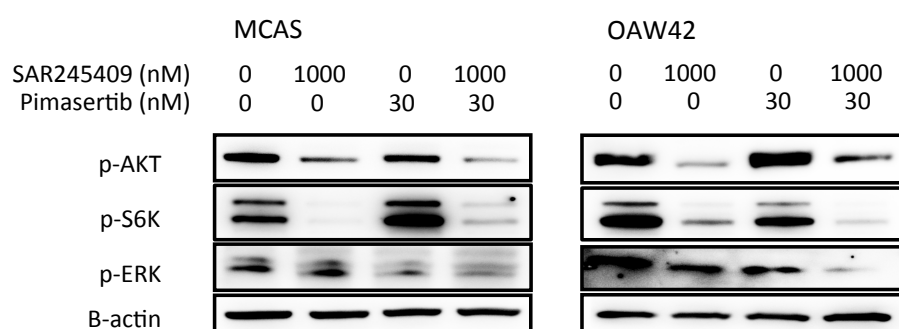


図 16 SAR245409 と pimasertib の単剤および併用時の標的タンパクの脱リン酸化
MCAS, OAW42 株にそれぞれ SAR245409 1000nM, pimasertib 30nM を単剤もしくは併用で添加し、MAPK 経路 (p-ERK)、PI3K/mTOR 経路(p-AKT, p-S6K)のリン酸化をウエスタンブロット法にて評価した。

II-3. SAR245409 と pimasertib の併用療法によるアポトーシス誘導

SAR245409 と pimasertib の併用下で細胞周期解析を行った。SAR245409 1 μ M と pimasertib 30nM の併用により S 期は著明に減少し、sub-G1 期は増加しており (図 17)、両剤併用による抗腫瘍効果は cytotoxic である可能性が示唆された。

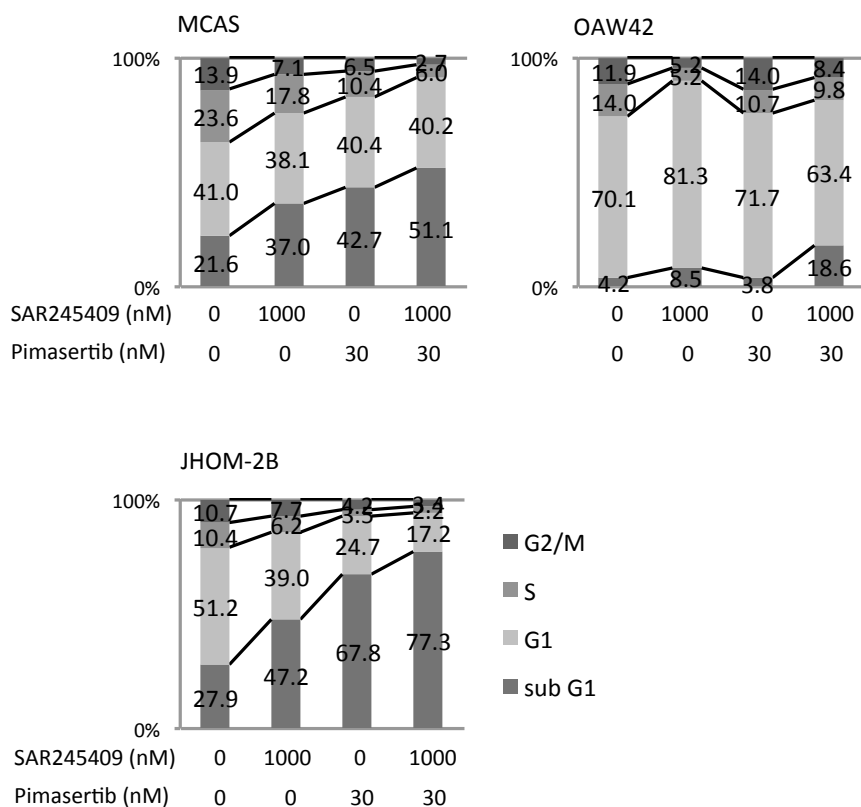


図 17 MCAS, OAW42, JHOM-2B における細胞周期解析
SAR245409 1 μ M、pimasertib 30nM を各単剤もしくは併用で添加した。いずれも 3 回の実験を行い、平均値を算出した。

そこで、Annexin V アッセイによりアポトーシス誘導能を検証した。

SAR245409 1 μ M と pimasertib 30nM の併用によりアポトーシスが有意に誘導されることが示され (図 18)、両薬剤の併用効果は cytotoxic な作用も含むことが明らかとなった。

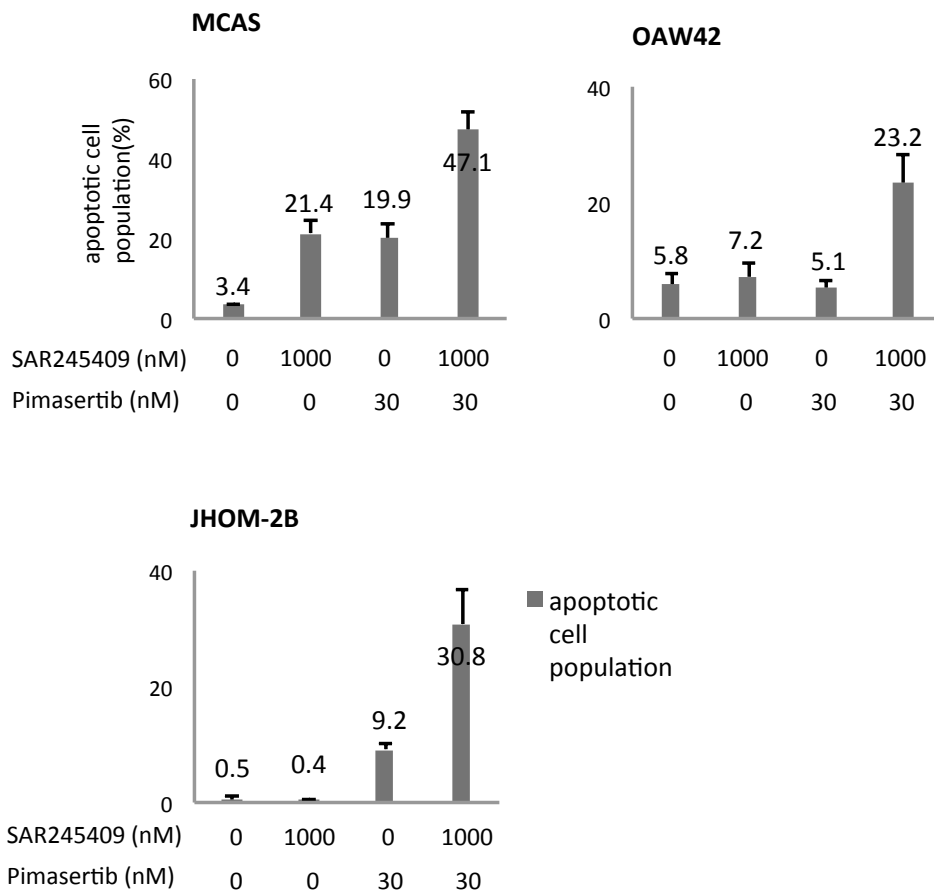


図 18 MCAS, OAW42, JHOM-2B における Annexin-V アッセイ
 SAR245409 1 μ M、pimasertib 30nM を各単剤もしくは併用で添加し、Apoptosis 細胞の比率を算出した。いずれも 3 回の実験を行い、平均値 \pm SD 値を算出した。

II-4. MEK1/2、ERK1/2 ノックダウンによる SAR245409 感受性の増強効果

併用療法における MAPK 経路抑制の効果を検証するために、OAW42 において MEK1/2 または ERK1/2 をノックダウンしてから SAR245409 を添加し MTT アッセイを行った。ウエスタンブロット法により、MEK1/2 に対する siRNA で MEK1/2 の発現が、ERK1/2 に対する siRNA で ERK1/2 の発現が、それぞれネガティブコントロールと比較して 80%以上抑制されていることを確認した (図 19

A)。MEK1/2 もしくは ERK1/2 のノックダウンによる効果に加えて、MEK1/2 もしくは ERK1/2 のノックダウンにより SAR245409 の増殖抑制効果が増強され、ネガティブコントロールと比較して有意に細胞増殖が抑制された (図 19 B)。

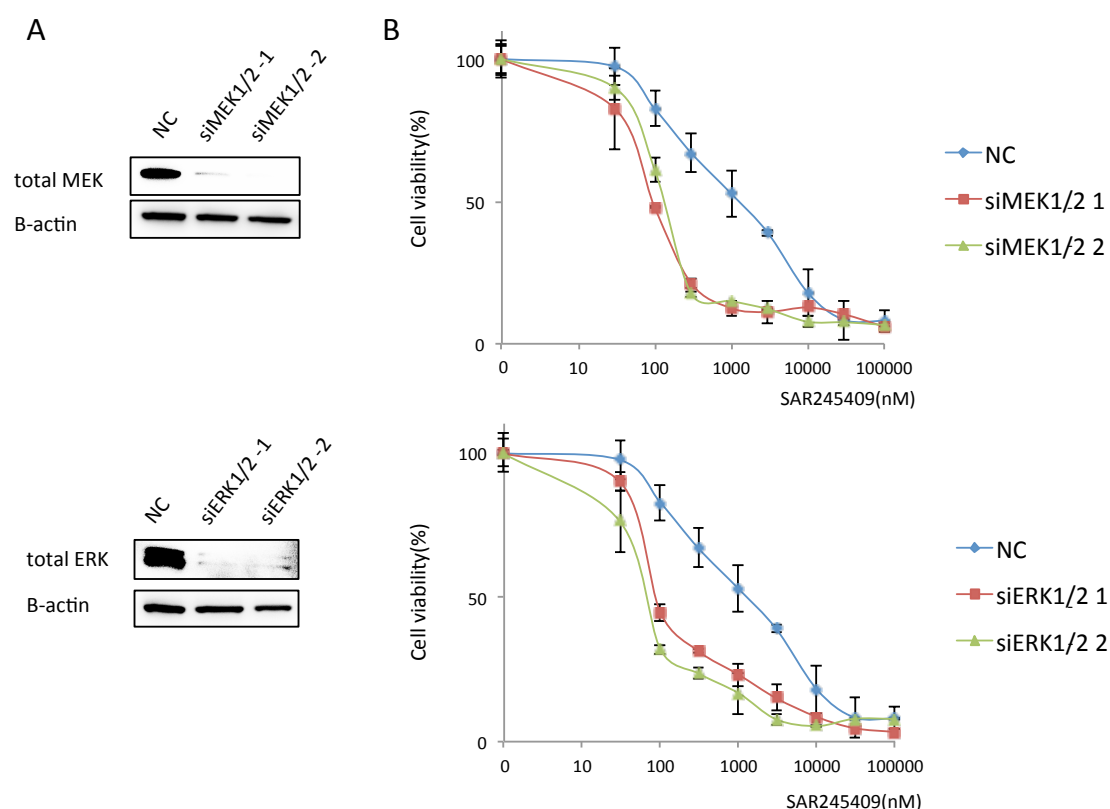


図 19 (A) OAW42 において MEK1/2, ERK1/2 をそれぞれ 2 種類の siRNA (siMEK1/2-1, siMEK1/2-2, siERK1/2-1, siERK1/2-2) にてノックダウンし、ウェスタンブロット法にてそれぞれ Total MEK, Total ERK の発現抑制を確認した。(B) (A) で用いた siRNA により、MEK, ERK をノックダウンした条件下で、SAR245409 を添加し、MTT アッセイを施行した。コントロール siRNA である NC に比し、MEK1/2, ERK1/2 のノックダウン併用では有意に細胞増殖が抑制された (青線と赤・緑線を比較)。

II-5. FRET イメージング法による S6K、ERK 活性の定量化

併用療法の抗腫瘍効果における PI3K/mTOR 経路と MAPK 経路それぞれの阻害作用の効果を評価するために、FRET バイオセンサーを用いて検証した。FRET バイオセンサーは、S6K に対しては Eevee-S6K-NES、ERK に対しては EKAREV-NLS をそれぞれ用いた (図 20 A)。内因性の S6K や ERK によりバイオセンサーがリン酸化されると、センサードメインとリガンドドメインが分子内で結合する。その形態変化により YFP が CFP に近接し、FRET が生じる⁵³。まず S6K と ERK に対する FRET バイオセンサーを安定発現する細胞株を樹立した。EKAREV-NLS 発現細胞株と Eevee-S6K-NES 発現細胞株を両薬剤に 3 時間曝露すると、ERK 活性は pimasertib 濃度依存性に徐々に低下していった (図 20 B)。S6K 活性は、SAR245409 低濃度 (-100nM) ではむしろ活性が上がり、高濃度では S6K 活性が抑制された (図 20 C)。この結果はウエスタンブロッティング法を用いたリン酸化の定量 (図 13) と矛盾しない結果であり、FRET イメージング法の定量解析法としての信頼性を確認できた。

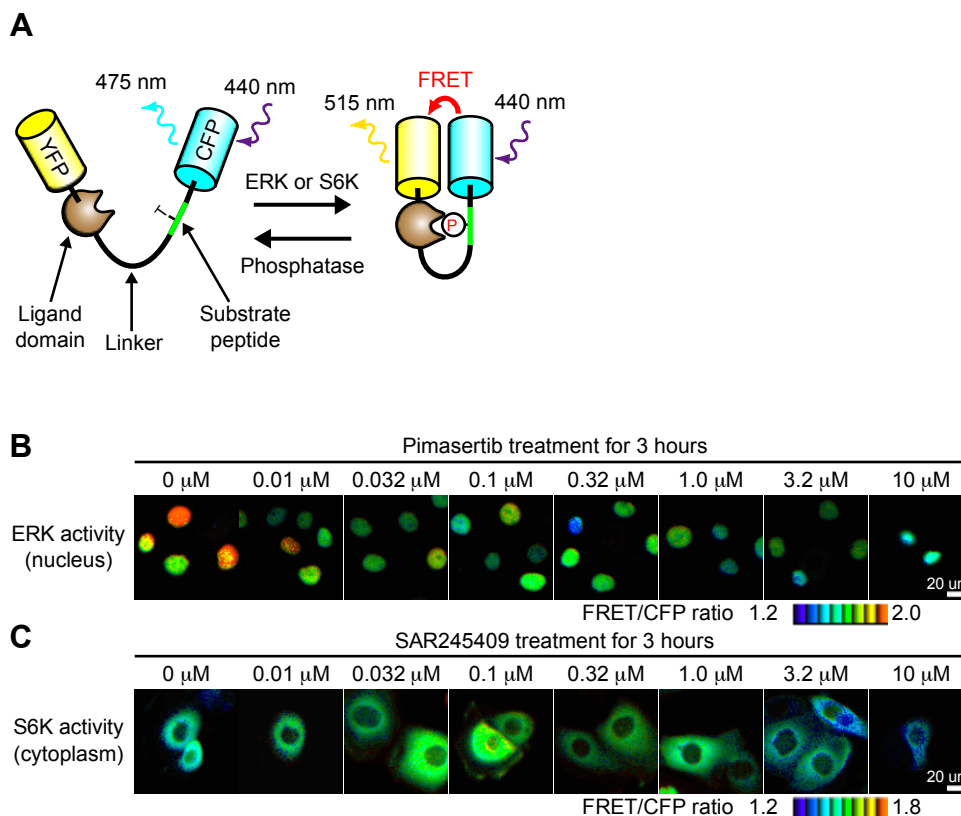
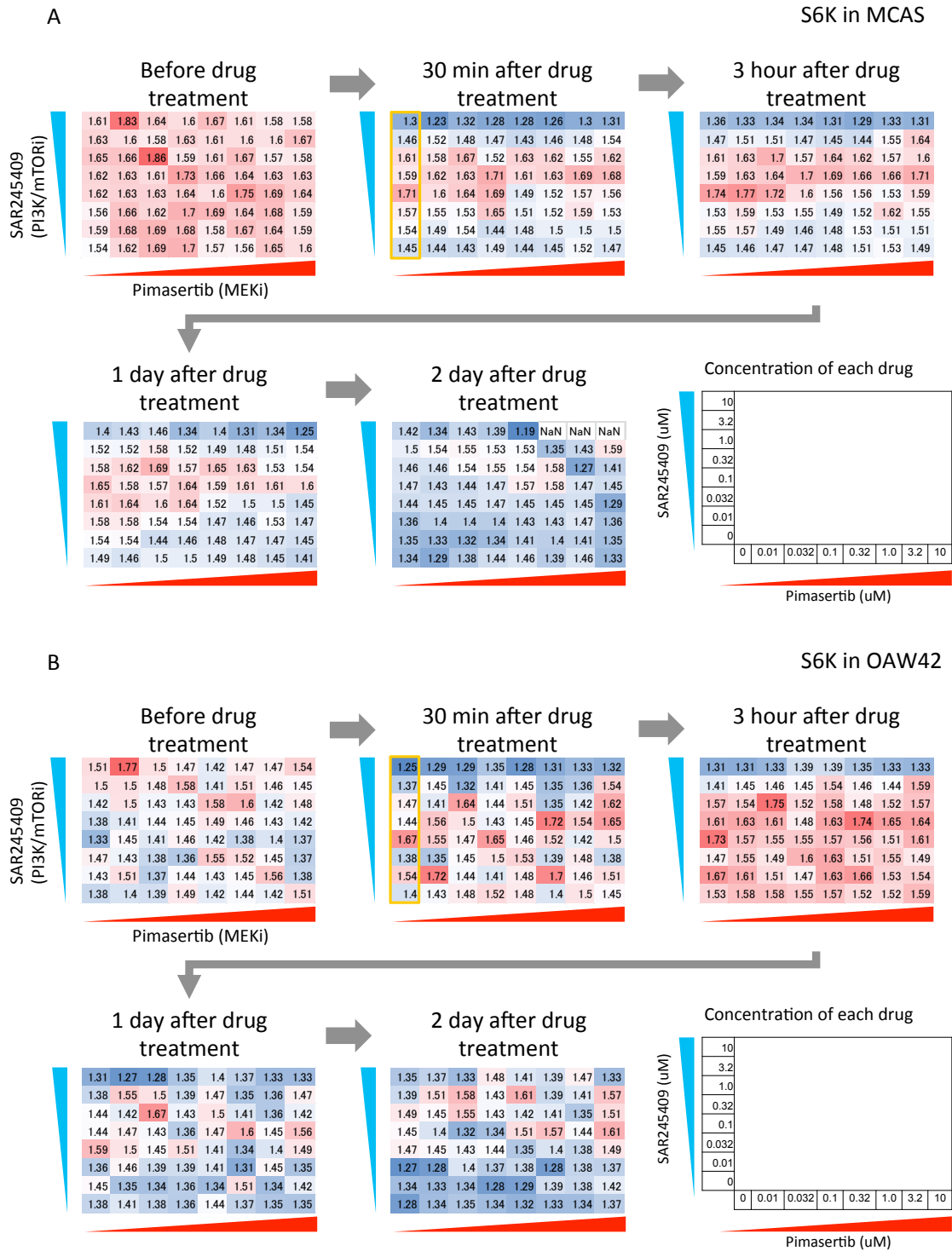


図 20 (A) FRET バイオセンサーの模式図。内因性の ERK や S6K によりバイオセンサーがリン酸化されると、形態変化を起こし FRET が生じる。FRET/CFP 比に従って染色され、青が低活性を意味する。(B, C) ERK(B)または S6K(C)に対するバイオセンサーの安定発現 MCAS 細胞株に、図に示す濃度で各薬剤を添加し、3 時間後に各濃度におけるキナーゼ活性を観察した。

続いて、MCAS, OAW42 において ERK, S6K 活性を定量化した (図 21)。細胞を 96 well plate に撒き、両薬剤を 64 通りの濃度の組合せで添加し、0 分、30 分、3 時間、24 時間、48 時間後に測定した。 SAR245409 による S6K の低下は、30 分以降、高濃度下 (>1.0 uM) で確認された (図 21A, B)。ERK 活性は低濃度の pimasertib (0.032-0.32uM) により薬剤添加 30 分後から速やかに抑制された (図 21C, D)。細胞間の接触により、キナーゼ活性は阻害されるため、両薬剤の添加

の有無によらず、48 時間後には S6K、ERK とともに、活性値が低下していた (図 21A-D)。



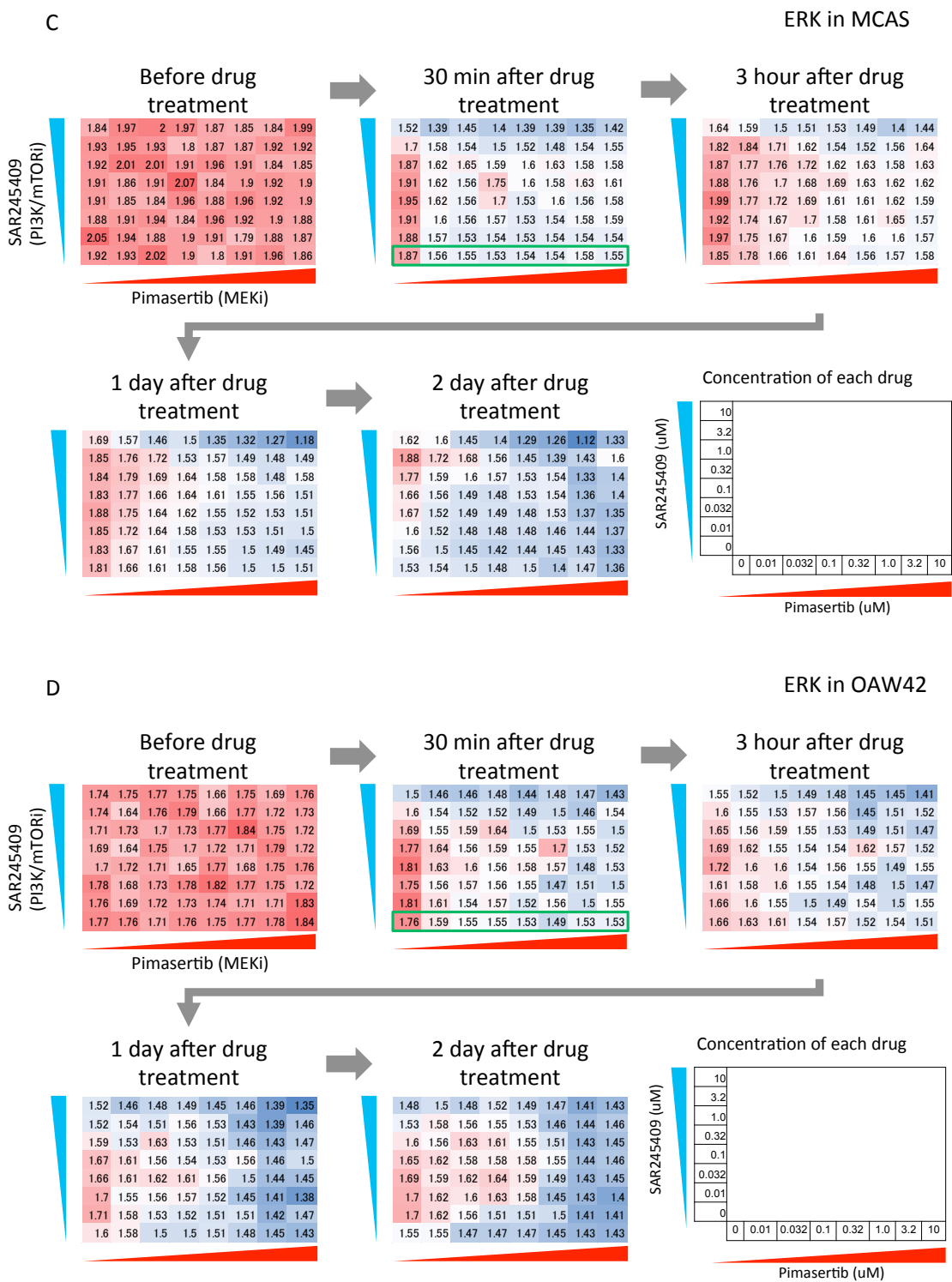


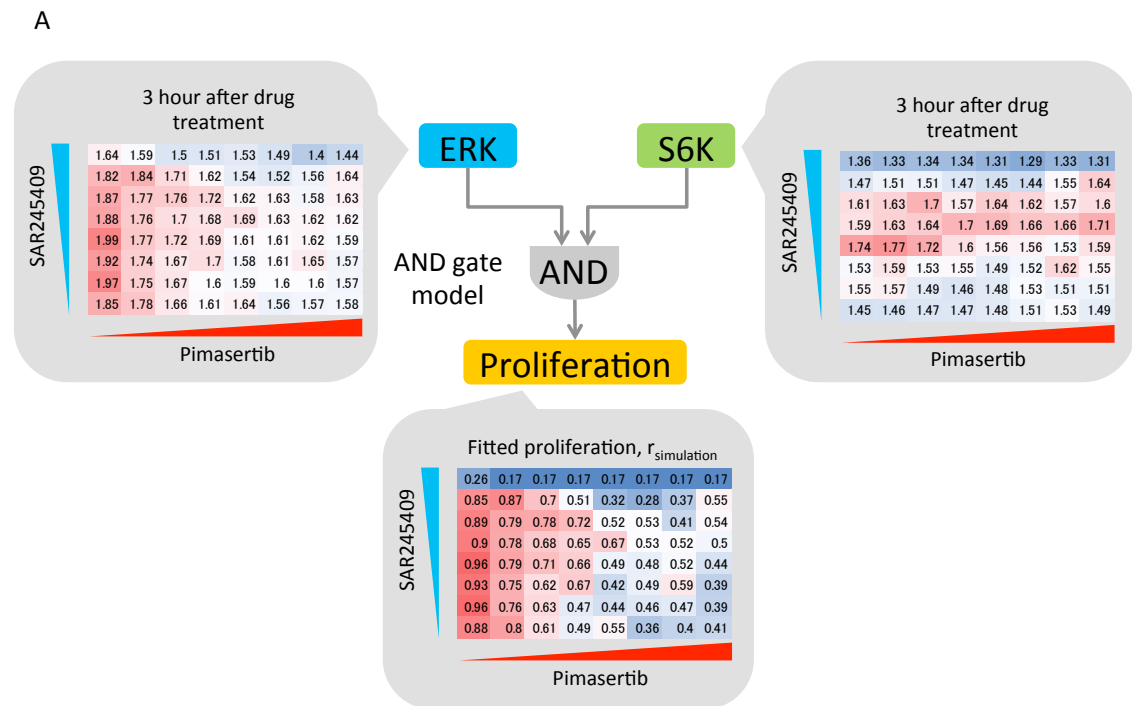
図 21 (A) SAR245409 と pimasertib を右下の図に示す様々な濃度の組み合わせで添加された MCAS における S6K 活性。薬剤添加前、添加から 30 分、3 時間、1 日、2 日後に測定し、定量化した。個々の数値は FRET/CFP 比の平均 (10 細胞以上)、つまり S6K 活性を意味している。赤や青の色分けは S6K 活性の高低を

表しており、赤色が濃いほど活性が高く、青色が濃いほど活性が低い。(B, C, D) (A)と同様の条件で測定された、OAW42におけるS6K活性(B)、MCASにおけるERK活性(C)、OAW42におけるERK活性(D)。

II-6. 細胞増殖、細胞死におけるS6K, ERK活性の役割

ERK, S6K活性と細胞増殖、細胞死との関連を調べるために、MTTアッセイとLDHアッセイを用いて、両薬剤のもとでの細胞増殖と細胞死のデータと、FRETイメージングのデータを数理モデルで統合し、S6K, ERK活性がどの程度細胞増殖や細胞死に関与しているか検証した(図22A)。細胞増殖とS6K活性、ERK活性との関連性を図22Bに、細胞死とS6K活性、ERK活性との関連性を図22Cに示す。MCAS、OAW42の両細胞株において、ERKは活性度依存的に細胞増殖や細胞生存を促進している(図22B, 22C)。すなわち、pimasertibによるERK活性の低下は、細胞増殖抑制能と細胞死誘導の双方において、濃度依存的に誘導されることが明らかとなった。一方、S6K活性は、細胞増殖と細胞生存において作用の仕方が異なり、細胞株による差も存在する結果を示した(図22B, 22C)。まず、細胞増殖に対してはONとOFFの“スイッチ”の切り替えが行われ、一定の活性度(閾値)を下回った場合に(MCASにおける閾値は-0.15、OAW42における閾値は-0.3)、細胞増殖抑制効果が強く誘導されていた(図22B)。閾値の比較からは、OAW42の方がPI3K/mTOR阻害剤に対してより感受性が高いことが示唆される。細胞死との関連については、S6K活性が株毎に異なった結果

となった (図 22C)。すなわち、MCAS においては S6K 活性度は細胞死には寄与しておらず、細胞死は ERK 活性度の低下とのみ相関していた。一方で、OAW42 においては S6K 活性は、ERK 活性と同様に、濃度依存的に細胞死と関連していた。以上のように、OMC 株においては、細胞増殖抑制的な側面と殺細胞的な側面の両者において、PI3K/mTOR 阻害剤、MEK 阻害剤のもたらす効果は細胞株ごとに異なることが、定量的に示された。



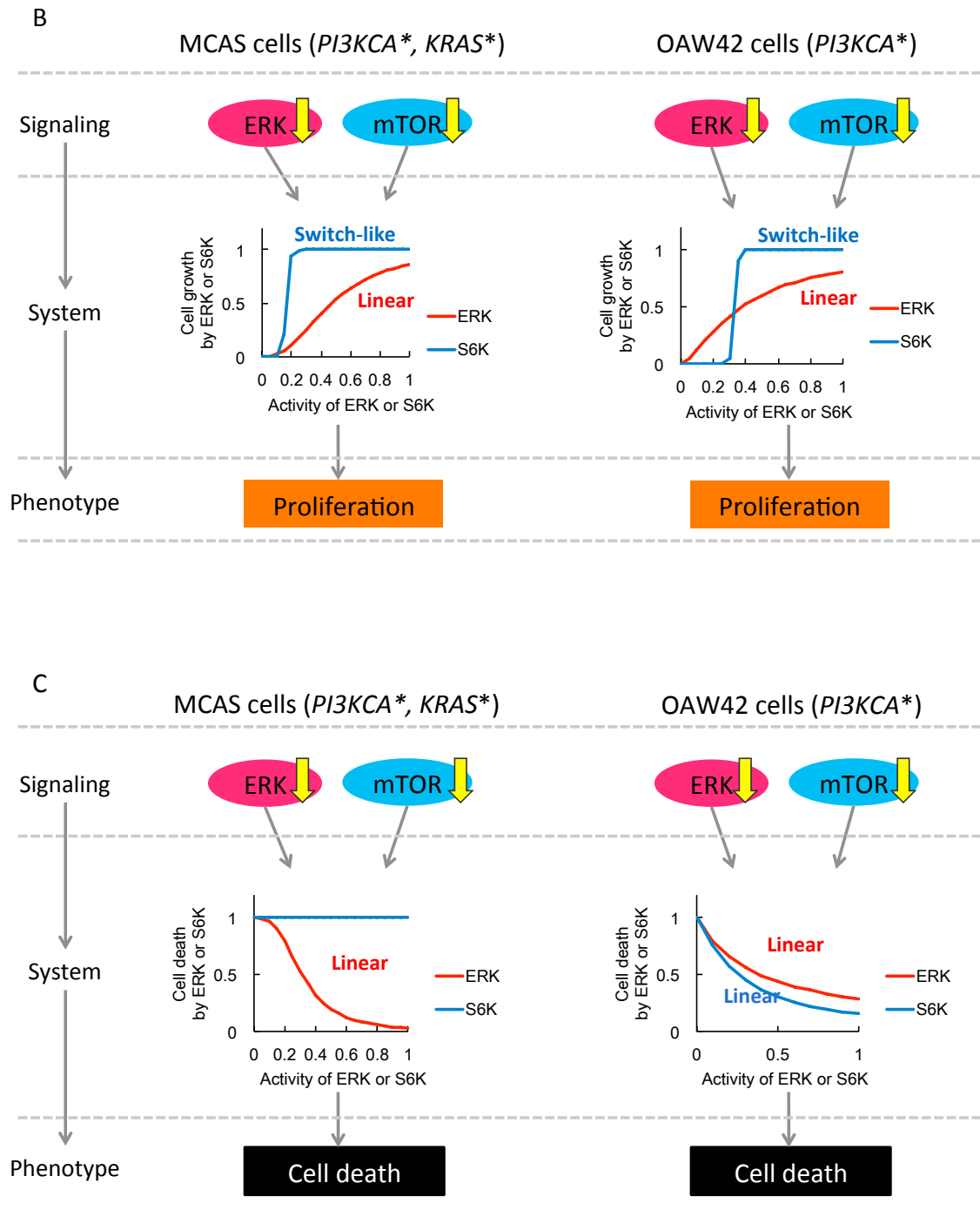


図22 (A) ERK活性とS6K活性のデータをAND gate modelにより統合し、MCASにおける細胞増殖への各活性の相関程度を算出する、イメージ模式図。(B, C) MCAS, OAW42の細胞増殖(B)、細胞死(C)に対する、薬剤添加3時間後のERK活性(赤線)とS6K活性(青線)それぞれの相関。横軸は蛋白活性レベルを、縦軸は細胞増殖または細胞死の程度の相対値を表している。

第4章 考察

I. 子宮体癌における SAR245409 (PI3K/mTOR 阻害剤) と pimasertib (MEK 阻害剤) の併用療法の検討

子宮体癌における SAR245409 (PI3K/mTOR 阻害剤) と pimasertib (MEK 阻害剤) の併用療法に注目し、MEK 阻害剤に対して感受性の高い細胞株において、SAR245409 と低濃度の pimasertib の併用療法が相乗的に細胞増殖を抑制することが明らかとなった。

まず SAR245409 と pimasertib の併用療法が、pimasertib に対して感受性が高い子宮体癌細胞株においてのみ相乗効果を示すことを明らかとした (表 2)。PI3K 経路と MAPK 経路の同時阻害による相乗的な抗腫瘍効果は、大腸癌、卵巣癌、肺癌、横紋筋肉腫などいくつかの癌腫の細胞株で報告がある^{39,54,55}。さらに、RAS/MEK の活性化が PI3K 経路と MAPK 経路の阻害剤の併用の相乗効果に關与しているとの報告もある⁵⁶⁻⁵⁸。しかしながら、本研究においては、KRAS 変異は MEK 阻害剤への感受性や併用療法の相乗効果の有無と關与していなかった。その一因としては、PI3K 経路の活性化が MEK 阻害剤への抵抗性に關与している可能性が考えられる。子宮体癌において KRAS 変異はしばしば PIK3CA 変異と共存している²⁸。例えば、pimasertib 抵抗性の HHUA は KRAS, PIK3CA, PTEN 全ての変異を有する。また別の機序としては、他の経路が MEK 阻害剤への抵抗性に

関与している可能性が挙げられる。β-カテニン(*CTNNB1*)やサイクリン D1 (*CCND1*)の変異により Wnt/beta-catenin/cyclin D1 経路が活性化され^{59,60}、その結果、今回の併用療法に対して様々な感受性を示したという可能性が考えられる。MEK 阻害剤に対する感受性がどのように制御されているかということや、なぜ MEK 阻害剤に対する感受性が併用療法の相乗効果のバイオマーカーとなりうるのか、ということをも明らかにするためには、さらなる研究が求められる。

次に、SAR245409 との併用で相乗効果を示すのに必要な pimasertib の濃度を検討したところ、30nM において、CI がもっとも低くなる（相乗効果が高い）結果となった（表 2）。30nM という pimasertib の濃度は、同剤単独の場合の IC₅₀ 値（図 4B）よりもずっと低いことがわかる。SAR245409 の至適濃度である 1μM も同剤単独の場合の IC₅₀ 値よりも低い、その差は pimasertib よりも小さい。これら 2 剤の至適濃度の組合せは、それぞれの阻害剤に対する薬理的なマーカーの重要性を示唆している。すなわち、PI3K/mTOR 経路の標的蛋白である AKT は SAR245409 1μM 以上という高濃度で抑制される（S6 は 100 nM 以上で抑制される）のに対し、MAPK 経路の標的蛋白である ERK のリン酸化レベルは、pimasertib 30nM 以上で著明に抑制されていた。以上より、単独で薬剤を添加する場合、標的タンパクの抑制が得られる濃度以上でないと目的とする Phenotype が得られない可能性があり、併用療法を構築していく必要性が示唆される。pimasertib 単

剤の IC₅₀ 値が、いずれも "uM" レベルとより高いことは、PI3K 経路の活性化が重要な因子となっていると考えられた。図 21 (OMC 株) において、pimasertib を "uM" レベルの高濃度下で添加した場合、S6K の活性が低下するクロストークが確認されている。従って、pimasertib 単剤での IC₅₀ 値 ("uM" レベル) においては、MEK のみの阻害効果のみでなく、クロストークによる S6K 経路の抑制も関与している可能性がある。

本研究のデータによると、AN3CA 以外の pimasertib 感受性細胞株では SAR245409 単剤での IC₅₀ 値が 2uM 以上であり、PI3K/mTOR 経路のみの阻害も MEK 阻害剤との併用療法に比べて有効性は低いといえる。細胞周期解析によると、併用療法による相乗効果は主に細胞増殖抑制的な効果であり (図 10)、低濃度の pimasertib (30nM) が細胞増殖抑制的効果を増強するのに十分であることを支持する結果であった。しかしながら、各薬剤に対する濃度依存性については株毎に異なる面も存在する。例えば、Ishikawa においては pimasertib 30nM より ERK のリン酸化レベルは抑制されているが (図 5 A)、pERK/ERK 比は pimasertib 30nM よりも 300nM の方がより robust に下がっている (図 5 B)。現在、SAR245409 と pimasertib の両薬剤を用いた臨床試験が卵巣癌を含めた固形癌で進行中である (clinicaltrials.gov/NCT01936363) が、標的タンパクの阻害が得られているかどうかをモニターする解析も今後重要性を増してくるであろう。手術不

能な進行子宮体癌では、腫瘍検体のサンプル収集は随時可能であり、薬物の作用を、体内動態と薬効強度の組み合わせ (Pharmacokinetic/Pharmacodynamic model)のもとに調べていくことが可能である。相乗効果を示さなかった株もあることより、薬剤の過剰投与は毒性をもたらす可能性があり、また、医療費が高額になってしまう一方で、濃度が低すぎると有効な治療効果が得られない。今回の研究成果をもとに、PI3K 経路阻害剤と MEK 阻害剤との併用療法による臨床試験において、特に pimasertib の至適濃度の検討は重要な課題と考えられた。

本研究のみでは、子宮体癌において、pimasertib 単剤もしくは SAR245409 と pimasertib の併用療法に対する感受性を予測するバイオマーカーの解明には至らず、さらなる研究が望まれる。

II. OMC における SAR245409 (PI3K/mTOR 阻害剤) と pimasertib (MEK 阻害剤) の併用療法の検討

OMC 細胞株における PI3K/mTOR 阻害剤と MEK 阻害剤の併用療法に焦点をあてて、下記3点について明らかとした。

- ① 併用療法が細胞増殖を相乗的に抑制する
- ② 相乗効果は cytostatic と cytotoxic 両方の効果に依存している
- ③ 併用療法における cytostatic と cytotoxic 効果に対する S6K, ERK 活性それ

それぞれの役割

KRAS, *PIK3CA* いずれの変異も有さない細胞株を含めて、OMC 細胞株 6 株全
てにおいて SAR245409 と pimasertib の併用療法が相乗効果を示す(CI: 0.50 以下)
ことが明らかとなった (図 14)。pimasertib 単剤に対する IC₅₀ 値は、子宮体癌株
と同様、ERK のリン酸化レベルの抑制に必要な pimasertib 濃度 30-300nM よりも
高濃度の 1μM 以上であった。ゆえに、*PIK3CA*, *PTEN* の変異の有無にかかわら
ず、PI3K/mTOR 経路は OMC の細胞増殖においても重要であると推測される。
このことは OSW42 が pimasertib 抵抗性 (IC₅₀ 値 > 20nM) であることとも矛盾し
ない。卵巣癌においては *KRAS* や *BRAF* の変異が MEK 阻害剤に対する感受性の
バイオマーカーとなりうるとの報告がある⁶¹。また、RAS/MAPK 経路の活性化
が PI3K 経路と MAPK 経路の同時阻害による相乗効果に関与しているとの報告
もある^{57,58}。

OMC 細胞株においては PI3K 経路の変異は頻度が低い³⁶にもかかわらず
MAPK 経路のみならず、PI3K/mTOR 経路の阻害も相乗効果においては重要であ
ることが明らかとなった。この結果を踏まえて、PI3K/mTOR 阻害剤と MEK 阻
害剤の併用療法の相乗効果のメカニズムを解明する上で、細胞増殖抑制的か殺
細胞的な効果かについても着目した。本研究により、同併用療法は、各単剤療
法に比べて、有意にアポトーシスを誘導することが明らかとなった (図 18)。子

宮体癌細胞株では、細胞周期 G1 停止が主たる相乗効果であったことより、子宮体癌と OMC で相乗効果の機序が異なる、すなわち、OMC における相乗効果は（少なくとも部分的には）cytotoxic な効果が関与していることが明らかとなった。OMC は一般的に従来の化学療法に抵抗性を示すため、SAR245409 と pimasertib の併用療法により synergistic に cytotoxicity をもたらすことは、腫瘍の増殖を抑制するのみでなく、縮小させる効果をもたらす可能性のある新規治療戦略としても期待される。

OAW42 において、pimasertib 単剤 (30 nM) と比較して、併用療法では、pimasertib が同濃度下で ERK のリン酸化レベルを著明に抑制していた (図 16)。さらに、同併用療法によりアポトーシスが著明に誘導された (図 18)。このことより PI3K 経路と MAPK 経路の間にクロストークが存在することが示唆される。卵巣癌の中でも類内膜腺癌、明細胞腺癌、低分化型漿液性腺癌においては PI3K 経路と MAPK 経路のいずれか (もしくは両方) が活性化している頻度が高い^{15,62} ため、OMC 以外の組織型においてもこの併用療法は相乗効果を発揮すると期待される。

続いて、FRET イメージング法により、異なる細胞株における併用療法の細胞増殖抑制的、殺細胞的効果の機序の違いを定量的に解析した。FRET イメージング法は乳癌、肺癌、大腸癌、前立腺癌などの研究においても用いられている⁶³⁻⁶⁵。

これまでのところ、卵巣癌細胞株における分子標的薬の研究に FRET バイオセンサーを用いた研究は未だ報告がない。

FRET イメージング法により、

①分子標的薬が単剤もしくは併用により、標的経路の活性にどのように影響するか

②標的経路がそれぞれそのようにフィードバック、フィードフォワードに制御し合っているか

③それぞれの経路が細胞増殖と細胞死にどの程度関与しているか

を、生きた細胞において、経時的に、様々な濃度設定で、しかも同一アッセイとして実験することにより、明らかにすることができた。

MCAS, OAW42 両細胞株において、ERK 活性の抑制は、細胞増殖抑制の点からも、細胞死誘導の点からも、重要な要素であることが示された。対照的に、S6K 活性は細胞増殖抑制に対して ON と OFF のスイッチのような働きで関与していた (図 22B)。この機序としては、SAR245409 が S6K 活性 (mTOR 経路) のみを阻害するわけではなく、PI3K/AKT 経路 (mTOR 非依存的経路) を阻害することに起因している可能性がある。S6K は SAR245409 が低濃度でも活性を抑えられるが、AKT のリン酸化にはより高濃度が必要である。従って、AKT のリン

酸化も影響を受ける段階に達する薬剤濃度が ON, OFF の切り替えに関わっている可能性が考えられた。

OAW42 においては細胞死の誘導に S6K 活性の抑制が必要であったが、MCAS における細胞死誘導に対しては S6K 活性の関与は認められなかった (図 22C)。こうした薬理作用の相違は、遺伝子変異プロファイルと関連している可能性がある。OAW42 は *PIK3CA* 変異のみ有しており、*KRAS* や *BRAF* 変異を有していないため、PI3K/mTOR 経路への依存度が高い可能性がある。一方、MCAS は *PIK3CA* 変異以外に、*KRAS* にも変異を有しており、MAPK 経路の活性度が高いと考えられる。こうした各経路の活性化に与える因子の変異の有無によって、分子標的薬の効果が異なる可能性がある。

本研究を踏まえ、PI3K/mTOR 阻害剤と MEK 阻害剤併用療法に関して、今後解明していくことが必要な事項としては、子宮体癌における相乗効果を予測するバイオマーカー、子宮体癌と OMC における細胞死誘導や細胞周期に与える影響に相違が生じる機序、子宮体癌や OMC における実地臨床への応用に向けた *in vivo* 研究、特に *in vitro* での至適濃度の *in vivo* への応用、といったことが挙げられる。

第5章 結論

本研究により、PI3K/mTOR 阻害剤と MEK 阻害剤が、多数の子宮体癌・OMC 細胞株において、相乗的に細胞増殖を抑制することが明らかとなった。また、併用療法における MEK 阻害剤の濃度は低濃度でも相乗効果を発揮しうることが示された。特に OMC 細胞株においては、細胞増殖抑制的のみならず、殺細胞的にも併用療法が効果を発揮した。FRET イメージング法を用いることにより、OMC において、PI3K/mTOR 経路と MAPK 経路の活性値と殺細胞的な効果がどのように相関するかを、細胞株毎に明らかとした。以上より、薬剤併用療法の相乗効果は、癌腫・個々の症例毎で異なっており、FRET イメージング法の活用を含めてその機序を解明していき、より合理的な併用療法を構築していくことが期待される。

参考文献

1. Jemal A, Bray F, Center MM, et al: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90, 2011.
2. Siegel R, Ma J, Zou Z, et al: Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 64:9-29, 2014.
3. Bokhman JV: Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 15:10-17, 1983.
4. Buring JE, Bain CJ, Ehrmann RL: Conjugated estrogen use and risk of endometrial cancer. *Am J Epidemiol* 124:434-441, 1986.
5. Ko EM, Walter P, Clark L, et al: The complex triad of obesity, diabetes and race in Type I and II endometrial cancers: prevalence and prognostic significance. *Gynecol Oncol* 133:28-32, 2014.
6. Japan RGfP-bCRi: Cancer incidence and incidence rates in Japan in 1998: estimates based on data from 12 population-based cancer registries. *Jpn J Clin Oncol* 33:241-245, 2003.
7. Nomura H, Aoki D, Takahashi F, et al: Randomized phase II study comparing docetaxel plus cisplatin, docetaxel plus carboplatin, and paclitaxel plus carboplatin in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma: a

- Japanese Gynecologic Oncology Group study (JGOG2041). *Ann Oncol* 22:636-642, 2011.
8. Sankaranarayanan R, Ferlay J: Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 20:207-225, 2006.
 9. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136:E359-386, 2015.
 10. Seidman JD, Horkayne-Szakaly I, Haiba M, et al: The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin. *Int J Gynecol Pathol* 23:41-44, 2004.
 11. Luvero D, Milani A, Ledermann JA: Treatment options in recurrent ovarian cancer: latest evidence and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol* 6:229-239, 2014.
 12. Robinson E, Fisher N, Stamelos V, et al: New strategies for the treatment of ovarian cancer. *Biochem Soc Trans* 42:125-129, 2014.
 13. Davidson B, Tropé CG: Ovarian cancer: diagnostic, biological and prognostic aspects. *Womens Health (Lond Engl)* 10:519-533, 2014.
 14. Scott CL, Swisher EM, Kaufmann SH: Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors:

- recent advances and future development. *J Clin Oncol* 33:1397-1406, 2015.
15. Cho KR, Shih IM: Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol* 4:287-313, 2009.
 16. Hart WR: Mucinous tumors of the ovary: a review. *Int J Gynecol Pathol* 24:4-25, 2005.
 17. Hess V, A'Hern R, Nasiri N, et al: Mucinous epithelial ovarian cancer: a separate entity requiring specific treatment. *J Clin Oncol* 22:1040-1044, 2004.
 18. Harrison ML, Jameson C, Gore ME: Mucinous ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 18:209-214, 2008.
 19. Liu T, Hu W, Dalton HJ, et al: Targeting SRC and tubulin in mucinous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 19:6532-6543, 2013.
 20. Kudoh A, Oishi T, Itamochi H, et al: 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. *Int J Gynecol Cancer* 24:444-453, 2014.
 21. Yuan TL, Cantley LC: PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27:5497-5510, 2008.
 22. Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, et al: Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol

- 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 7:1851-1863, 2008.
23. Serra V, Markman B, Scaltriti M, et al: NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res* 68:8022-8030, 2008.
 24. Cao P, Maira SM, García-Echeverría C, et al: Activity of a novel, dual PI3-kinase/mTor inhibitor NVP-BEZ235 against primary human pancreatic cancers grown as orthotopic xenografts. *Br J Cancer* 100:1267-1276, 2009.
 25. Shoji K, Oda K, Kashiyama T, et al: Genotype-dependent efficacy of a dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, and an mTOR inhibitor, RAD001, in endometrial carcinomas. *PLoS One* 7:e37431, 2012.
 26. Kong D, Suzuki A, Zou TT, et al: PTEN1 is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nat Genet* 17:143-144, 1997.
 27. Minaguchi T, Yoshikawa H, Oda K, et al: PTEN mutation located only outside exons 5, 6, and 7 is an independent predictor of favorable survival in endometrial carcinomas. *Clin Cancer Res* 7:2636-2642, 2001.
 28. Oda K, Okada J, Timmerman L, et al: PIK3CA cooperates with other phosphatidylinositol 3'-kinase pathway mutations to effect oncogenic

- transformation. *Cancer Res* 68:8127-8136, 2008.
29. Oda K, Stokoe D, Taketani Y, et al: High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 65:10669-10673, 2005.
 30. Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, et al: Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* 376:245-251, 2010.
 31. Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al: Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 361:123-134, 2009.
 32. Fong PC, Yap TA, Boss DS, et al: Poly(ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *J Clin Oncol* 28:2512-2519, 2010.
 33. Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, et al: Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet Oncol* 12:852-861, 2011.
 34. Tutt A, Robson M, Garber JE, et al: Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast

- cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* 376:235-244, 2010.
35. Gemignani ML, Schlaerth AC, Bogomolny F, et al: Role of KRAS and BRAF gene mutations in mucinous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 90:378-381, 2003.
 36. Kuo KT, Mao TL, Jones S, et al: Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol* 174:1597-1601, 2009.
 37. Kurman RJ, Shih IM: Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol* 42:918-931, 2011.
 38. Rodriguez-Viciana P, Tetsu O, Oda K, et al: Cancer targets in the Ras pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70:461-467, 2005.
 39. Sheppard KE, Cullinane C, Hannan KM, et al: Synergistic inhibition of ovarian cancer cell growth by combining selective PI3K/mTOR and RAS/ERK pathway inhibitors. *Eur J Cancer* 49:3936-3944, 2013.
 40. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, et al: The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483:603-607, 2012.
 41. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674, 2011.

42. Won JK, Yang HW, Shin SY, et al: The crossregulation between ERK and PI3K signaling pathways determines the tumoricidal efficacy of MEK inhibitor. *J Mol Cell Biol* 4:153-163, 2012.
43. Prahallad A, Sun C, Huang S, et al: Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 483:100-103, 2012.
44. Miyasaka A, Oda K, Ikeda Y, et al: Anti-tumor activity of olaparib, a poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, in cultured endometrial carcinoma cells. *BMC Cancer* 14:179, 2014.
45. Yu P, Laird AD, Du X, et al: Characterization of the activity of the PI3K/mTOR inhibitor XL765 (SAR245409) in tumor models with diverse genetic alterations affecting the PI3K pathway. *Mol Cancer Ther* 13:1078-1091, 2014.
46. Kim K, Kong SY, Fulciniti M, et al: Blockade of the MEK/ERK signalling cascade by AS703026, a novel selective MEK1/2 inhibitor, induces pleiotropic anti-myeloma activity in vitro and in vivo. *Br J Haematol* 149:537-549, 2010.
47. Komatsu N, Aoki K, Yamada M, et al: Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol Biol Cell* 22:4647-4656, 2011.
48. Aoki K, Komatsu N, Hirata E, et al: Stable expression of FRET biosensors: a new

- light in cancer research. *Cancer Sci* 103:614-619, 2012.
49. Komatsu N, Fujita Y, Matsuda M, et al: mTORC1 upregulation via ERK-dependent gene expression change confers intrinsic resistance to MEK inhibitors in oncogenic KRas-mutant cancer cells. *Oncogene*, 2015.
 50. Aoki K, Matsuda M: Visualization of small GTPase activity with fluorescence resonance energy transfer-based biosensors. *Nat Protoc* 4:1623-1631, 2009.
 51. Kirouac DC, Onsum MD: Using network biology to bridge pharmacokinetics and pharmacodynamics in oncology. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 2:e71, 2013.
 52. Chou TC: Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* 70:440-446, 2010.
 53. Jares-Erijman EA, Jovin TM: FRET imaging. *Nat Biotechnol* 21:1387-1395, 2003.
 54. Guenther MK, Graab U, Fulda S: Synthetic lethal interaction between PI3K/Akt/mTOR and Ras/MEK/ERK pathway inhibition in rhabdomyosarcoma. *Cancer Lett* 337:200-209, 2013.
 55. Roper J, Sinnamon MJ, Coffee EM, et al: Combination PI3K/MEK inhibition promotes tumor apoptosis and regression in PIK3CA wild-type, KRAS mutant

- colorectal cancer. *Cancer Lett* 347:204-211, 2014.
56. Engelman JA, Chen L, Tan X, et al: Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med* 14:1351-1356, 2008.
 57. Ihle NT, Lemos R, Wipf P, et al: Mutations in the phosphatidylinositol-3-kinase pathway predict for antitumor activity of the inhibitor PX-866 whereas oncogenic Ras is a dominant predictor for resistance. *Cancer Res* 69:143-150, 2009.
 58. Britten CD: PI3K and MEK inhibitor combinations: examining the evidence in selected tumor types. *Cancer Chemother Pharmacol* 71:1395-1409, 2013.
 59. Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, et al: Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 497:67-73, 2013.
 60. Ikeda Y, Oda K, Hiraike-Wada O, et al: Cyclin D1 harboring the T286I mutation promotes oncogenic activation in endometrial cancer. *Oncol Rep* 30:584-588, 2013.
 61. Nakayama N, Nakayama K, Yeasmin S, et al: KRAS or BRAF mutation status is a useful predictor of sensitivity to MEK inhibition in ovarian cancer. *Br J Cancer* 99:2020-2028, 2008.

62. Network CGAR: Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 474:609-615, 2011.
63. Lee SY, Tyler JY, Kim S, et al: FRET imaging reveals different cellular entry routes of self-assembled and disulfide bonded polymeric micelles. *Mol Pharm* 10:3497-3506, 2013.
64. Janssen A, Beerling E, Medema R, et al: Intravital FRET imaging of tumor cell viability and mitosis during chemotherapy. *PLoS One* 8:e64029, 2013.
65. Abe K, Zhao L, Periasamy A, et al: Non-invasive in vivo imaging of near infrared-labeled transferrin in breast cancer cells and tumors using fluorescence lifetime FRET. *PLoS One* 8:e80269, 2013.

謝辞

稿を終えるにあたり、本論文の作成において終始一貫して丁寧なご指導を賜りました東京大学医学部産科婦人科教室の織田克利准教授に深く感謝いたします。また、実験計画・実験手技につきご指導・ご協力いただいた、東京大学医学部産科婦人科教室の藤井知行教授、大須賀穰教授、矢野哲客員准教授、川名敬准教授、平池修准教授、有本貴英先生、池田悠至先生、曾根献文先生、上原ゆり子先生、樫山智子先生、宮坂亜希先生、神尊貴裕先生、福田友彦先生、牧井千波先生、栗川玲子様、京都大学の青木一洋先生に心より御礼申し上げます。最後に、本研究を遂行し本論文を作成するにあたり、暖かく見守り、時間を与えてくれた家族、特に夫と幼い息子に心からの謝意を表します。