

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 稲葉 可奈子

[序論]

新規治療法として分子標的薬の開発が進んでおり、婦人科癌においても、分子標的治療の確立が期待されている。しかし、子宮体癌では分子標的薬は未だ臨床応用されていない。子宮体癌では、*KRAS* 約 21%、*PIK3CA* 約 53%、*PTEN* に約 64% の頻度で遺伝子変異が認められ、その変異が共存している。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。しかしながら、臨床試験では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、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。

また、卵巣癌の中でも粘液性腺癌(ovarian mucinous carcinoma: OMC)は化学療法の奏率が特に低く、新規治療法が期待されている。OMC では *KRAS* 変異が 50-60% と高頻度に認められ、MAPK 経路は OMC の治療ターゲットともなりうる。OMC においては、PI3K を活性化する *PIK3CA* や *PTEN* の変異は頻度が低い (<10%) が、PI3K/mTOR 経路は *KRAS* 変異そのもので活性化されうる。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。

本研究では、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、相乗効果を示す至適濃度の組合せ、その併用効果は cytostatic (細胞増殖抑制的) か、cytotoxic (殺細胞的) か、感受性を予測するバイオマーカーはあるか、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か、以上を解明することを目的とした。

[方法]

(1) 子宮体癌細胞株、OMC 細胞株における SAR245409 と pimasertib の抗腫瘍効果の検討

子宮体癌細胞株 12 株、OMC 細胞株 6 株を用いて検討を行った。各単剤、併用療法による細胞増殖抑制効果を MTT アッセイにより評価した。併用効果の有無については、Chou-Talalay method により combination index(CI)を算出して判定した。ウエスタンブロット法により各薬剤による標的蛋白のリン酸化抑制効果を評価した。フローサイトメトリー法により細胞周期解析を行い、sub-G1 の増加が認められる場合には、Annexin V アッセイ法によりアポトーシス誘導能を調べた。さらに、MAPK

経路の MEK または ERK を siRNA によりノックダウンしてから SAR245409 を添加して、抗腫瘍効果が増強されるかどうか検討した。

(2) 細胞増殖、細胞死における S6K (PI3K/mTOR 経路)、ERK 活性 (MAPK 経路) の役割の検討

OMC 細胞株を用いて、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。両薬剤を添加し、FRET イメージング法により S6K 活性、ERK 活性を定量的に測定した。さらに、MTT アッセイと LDH アッセイにより測定した細胞増殖と細胞死のデータと AND gate model を用いて統合し、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。

[結果]

(1) 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

まず各単剤の抗腫瘍効果を調べたところ、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。しかし、SAR245409、pimasertib それぞれへの感受性と、遺伝子変異とは、相関が認められなかった。

両薬剤併用下での CI を算出したところ、pimasertib 感受性の 6 株全てにおいて、pimasertib 30nM との併用での CI は 0.46 以下 (相乗効果あり) であった。SAR245409 と併用するにあたっては pimasertib 30nM が最も相乗効果が高かった。SAR245409 1 μ M と pimasertib 30nM の併用療法下で細胞周期解析を行ったところ、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せず、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た。さらに、ERK をノックダウンして SAR245409 を添加したところ、SAR245409 の増殖抑制効果はネガティブコントロールと比較して有意に増強された。

(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

SAR245409 の IC_{50} 値は 0.6 μ M-6 μ M であったが、一方で、pimasertib の IC_{50} 値は 1.0 μ M-20 μ M 以上と細胞株によって大きく異なった。OAW42 における pimasertib の IC_{50} 値 (20 μ M) 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。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。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。

SAR245409 1 μ M と pimasertib 30nM の併用下で細胞周期解析を行ったところ、S 期は著明に減少し、sub-G1 期は増加した。Annexin V アッセイによりアポトーシス誘導能を検証したところ、併用療法によりアポトーシスが有意に誘導され、両薬剤の併用効果は cytotoxic であることが示唆された。

さらに、ERK または MEK をノックダウンして SAR245409 を添加したところ、SAR245409 の増殖抑制効果はネガティブコントロールと比較して有意に増強された。

(3)FRET イメージング法による細胞増殖、細胞死における S6K, ERK 活性の役割の検討

FRET イメージング法を用いて、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した。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、MCAS, OAW42 において ERK, S6K 活性を定量化した。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 アッセイにより得られた両薬剤のもとでの細胞増殖と細胞死のデータと、FRET イメージングによる ERK, S6K 活性のデータを数理モデル(AND gate model)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。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たが、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。細胞増殖に対しては一定の活性度（閾値）を下回った場合に細胞増殖抑制効果が強く誘導されていた。細胞死との関連については、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関連していた。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、細胞増殖抑制作用、殺細胞作用の両者において、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。

[考察]

子宮体癌については、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した。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関与していなかったが、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関与している、または、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。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 が最も低くなる（相乗効果が高い）結果となった。30nM という pimasertib の濃度は、同剤単独の場合の IC₅₀ 値よりもずっと低く、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た。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。

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し(CI: 0.50 以下)、その機序は殺細胞的であることが明らかとなった。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ことが判明した。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。

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することで、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。また、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。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。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。

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。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。