

論文の内容の要旨

論文題目 卵巣明細胞癌における p53-MDM2 結合阻害剤の抗腫瘍効果の検討

氏名 牧井 千波

[序論]

卵巣がんは全世界において女性の癌の中で7番目に多く、推定で年間約24万人が新規診断され、約15万人が死亡している。本邦では、卵巣明細胞癌(Ovarian clear cell carcinoma OCCC)が25%を占め、プラチナ製剤抵抗性の特徴を持つため、他の組織型と比較し予後が不良であることが知られている。そのため新たな治療戦略の開発が急務である。卵巣がんの中でも組織型による分子生物学的な相違が近年明らかとなっている。がん抑制遺伝子 TP53 変異は卵巣漿液性癌(Ovarian serous carcinoma OSC)では96%に認められるが、OCCCでは10%と稀である。TP53は細胞周期停止やアポトーシス誘導に重要であり、野生型 TP53 を有する癌では TP53 は腫瘍抑制因子としての機能が期待される。しかしながら、TP53 に変異のない場合でも、その分解によって TP53 が活性化されていない癌腫の存在が明らかとなっている。細胞内の TP53 発現レベルは E3 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おり、MDM2 発現増加と TP53 の不活化との関連が報告された。近年 MDM2 阻害剤が開発されており、多種癌で臨床試験が行われているが、OCCC 関連での報告はない。また PI3K-AKT シグナル経路は、細胞生存、タンパク合成や細胞増殖を促進する働きをしており、本経路の活性化の要因の一つとして、PI3K の触媒サブユニット p110 α をコードする PIK3CA の増幅または変異が知られている。PIK3CA 高発現は非小細胞性肺がんや乳がん、大腸がんや頭頸部癌の10~30%に存在し、OCCCでは11%に認められる。癌の浸潤や転移に関与し、予後に寄与するとされるため、PI3K-AKT 経路を標的とした分子標的治療薬が多数開発され、その多くが抗腫瘍効果を示している。

本研究では、OCCCにおいてTP53-MDM2経路とPI3K経路に着目し、MDM2とPIK3CAの発現と予後との関連を検討した。次にOCCCにおけるp53-MDM2結合阻害剤であるRG7112単剤、およびRG7112とPI3K/mTOR同時阻害剤であるDS-7423との併用における抗腫瘍効果の検討を行った。

[方法]

(1)臨床検体を用いたOCCCにおけるMDM2とPIK3CAの発現と予後との関連の検討

91例における卵巣がん組織(OCCC75例、OSC16例)におけるMDM2とPIK3CAの発現をマイクロアレイとリアルタイムPCRにて解析し、予後との関連につき Kaplan-Meier 法とログランクテストにより検討した。

(2)OCCC 細胞株における RG7112 の抗腫瘍効果の検討

in vitro では OCCC 細胞株 7 株を用いて検討を行った。RG7112 単剤による細胞増殖抑制効果を MTT アッセイにより評価した。ウエスタンブロット法で RG7112 による標的蛋白の発現を評価した。フローサイトメトリー法により細胞周期解析を行い、さらに Annexin V アッセイ法によりアポトーシス誘導能を調べた。MDM2 を siRNA によりノックダウンした場合の細胞抑制効果とアポトーシス誘導能の評価も行った。RG7112 が腫瘍血管増生に与える影響に関し、HIF-1 α (Hypoxia Inducible factor-1 α) および血管密度のマーカーである CD31 を用いて検討を行った。in vivo では OVICE, RMG-I 細胞株を用い皮下腫瘍モデルマウスを作製し、抗腫瘍効果を検討した。

(3)OCCC 細胞株における RG7112 と DS-7423 の抗腫瘍効果の検討

TP53 野生型である OCCC 細胞株 4 株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 MTT アッセイにより評価し、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発現を評価した。フローサイトメトリー法により細胞周期解析と 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 in vivo で併用療法の抗腫瘍効果を検討した。

[結果]

(1)臨床検体を用いた OCCC における MDM2 と PIK3CA の発現と予後との関連の検討

MDM2 発現は OCCC において OSC(P=0.0092)や正常組織(P=0.035)よりも有意に高かった。MDM2 高発現群は低発現群に比較し、無増悪生存期間 (Progression free survival ; PFS) と全生存期間 (Overall survival ; OS) とともに有意に予後が不良であった(P=0.0002, and P=0.0008)。PIK3CA 発現に関しては、高発現群が低発現群と比べて有意に予後が不良であった(P=0.0076)。また、MDM2 および PIK3CA がともに高発現だった 11 例においては MDM2 または PIK3CA 単独での解析と比し、より予後が不良であることが示された(P<0.0001)。

(2)OCCC 細胞株における RG7112 の抗腫瘍効果の検討

OCCC 細胞株 7 株における細胞増殖アッセイでは RG7112 は TP53 野生株においてのみ用量依存性に細胞増殖を抑制し、IC50 (50%増殖抑制濃度) は 1.0~2.2 μ M であった。一方で、全ての TP53 変異株では IC50 が 10 μ M 以上であり、これらの違いは統計学的に有意であった(P<0.001)。ウエスタンブロット法では RG7112 添加は時間と濃度依存的に MDM2 と TP53、および TP21 の発現を上昇させた。また、リン酸化 TP53(Ser-46)に代表される TP53 依存性のアポトーシス因子が誘導され、PUMA の発現上昇や survivin の抑制がみられた。RG7112 による細胞周期解析では、RG7112 の添加により濃度依存的に sub-G1 細胞の比率は上昇し、S 期の比率は低下した。さらに Annexin V アッセイでは、RG7112 5 μ M の添加によって 12~22%の細胞においてアポトーシスが誘導された。siRNA によって MDM2 発現をノックダウンした実験においても、同様に細胞増殖が有意に抑制され、アポトーシス細胞が有意に増加した。続いて RMG-I と OVICE 細胞株を使ってヌードマウス皮下移植モデルマウスを作製し RG7112(100mg/kg)もしくは vehicle (control)を各マウスに 3 週間連日経口投与した。RG7112 は RMG-I 腫瘍の増大を有意に抑制した(P=0.033)。薬剤投与中に明らかな有害

事象はみられず、RG7112 投与群における体重減少も 10%未満であった。RG7112 治療後のマウス腫瘍組織から蛋白を抽出し Western blotting 法で解析したところ、MDM2 と TP53、リン酸化 TP53(Ser-46 と Ser-15)の上昇がみられた。RG7112 投与によって TP21 や PUMA、BAX などの TP53 関連タンパクも誘導されており、in vitro の結果と同様に、cleaved PARP や survivin の上昇も見られた。また、RG7112 が腫瘍血管増生に与える影響に関する検討では、低酸素下(1% O₂)で上昇した HIF-1 α の発現は、RG7112 を添加後に有意に抑制された。siRNA による MDM2 発現の阻害においても、同様に HIF-1 α の発現は有意に抑制された。さらに in vivo の腫瘍切片における CD31 の免疫染色では、CD31 陽性細胞の比率は RMG-I と OVISe の両腫瘍組織において、RG7112 投与群で有意に減少した(P = 0.011、P = 0.016)。

(3)OCCC 細胞株における RG7112 と DS-7423 の抗腫瘍効果の検討

OCCC 細胞株のうち、TP53 野生型の 4 株を使用して細胞増殖アッセイを行った。DS-7423 単剤時よりも RG7112 を併用した場合で DS-7423 の IC₅₀ 値は有意に低下し、Chou-Talalay 法による Combination Index (<1) より、相乗的な効果があることが示唆された。Western blotting 法においても、DS-7423 の併用によって、TP53 とアポトーシス因子である PUMA や cleaved PARP の発現は RG7112 単剤時に比べ有意に上昇した。細胞周期解析では、RG7112 と DS-7423 は各々の単剤時よりも Sub-G1 期の比率が上昇し、25~50%の割合を示した。Annexin V assay でもアポトーシス細胞の比率は併用で有意に高かった。皮下腫瘍マウスモデルにおいて、DS-7423(3mg/kg)、RG7112(50mg/kg)をそれぞれ単独または併用で 3 週間連日経口投与し、コントロール群との比較を行った。その結果、併用療法群はいずれの単剤群と比べても有意に腫瘍径を縮小させる効果を示した。体重減少を含め、明らかな有害事象は認められなかった。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 免疫染色においても有意に染色陽性細胞が減少し、血管密度の低下を示した。

[考察]

今回の解析では TP53 野生型の OCCC では TP53 変異を有する OCCC および OSC と比し明らかに MDM2 の発現が高かった。MDM2 の過剰発現の理由に MDM2 の増幅や SNP が報告されているが、MDM2 の増幅に関しては OCCC では 10%以下であり、OCCC の MDM2 高発現の要因に MDM2 増幅があるとは考えにくい。MDM2 の SNP についてなど、更なる検討が必要である。また MDM2 の発現レベルは OCCC において PFS および OS と有意に相関し、その高発現は OCCC における独立予後不良因子であることが示された。PIK3CA の発現は OCCC において PFS と有意に相関し、その高発現は予後不良因子であることが示された。PIK3CA の高発現が OCCC において PI3K/mTOR シグナル経路の活性化の一因となり、予後不良に影響していると考えられる。さらに PIK3CA および MDM2 のどちらにも高発現を認めた場合、予後がさらに不良となることから OCCC では MDM2 および PI3K-mTOR シグナル経路は治療ターゲットとして有意義である可能性が高いと考えられた。

本研究において、TP53 と MDM2 との結合を阻害する選択的 MDM2 阻害剤である RG7112 は TP53 野生型の OCCC において、単剤においても高い抗腫瘍効果を示した。具体的には RG7112 の添加により細胞周期の sub G-1 の割合が増加し、アポトーシスを誘導した。同様の現象は *in vivo* においても確認され、TP53 の ser46 のリン酸化が促進され、TP53 誘導性アポトーシス因子である PUMA や BAX の発現が誘導されたことより、RG7112 により誘導されたアポトーシスは TP53 依存性の反応であったと考えられる。また *in vitro* において低酸素下で発現が上昇した HIF-1 α は RG7112 添加による TP53 の安定化に伴いその発現が低下した。RG7112 投与をされたマウスの腫瘍組織では、血管内皮細胞のマーカーである CD31 陽性細胞は減少を認めたことより、RG7112 の抗腫瘍効果はアポトーシスによるものだけではなく、腫瘍の新生血管の抑制も関わっていることが示唆された。

次に、TP53 野生型の OCCC において RG7112 と DS-7423 の併用は相乗的に細胞増殖を抑制することを明らかとした。具体的には併用により *in vitro* での細胞周期の sub G-1 の比率は上昇し、単剤使用時よりもアポトーシス細胞がさらに増強した。DS-7423 単剤治療と比し低濃度にてアポトーシスが誘導された。蛋白発現レベルでは TP53 と TP53 関連アポトーシス因子が併用でより発現が上昇していたことから、MDM2 を直接的に阻害する RG7112 を併用したことで TP53 依存性のアポトーシスが増強したと考えられた。*in vivo* では単剤と比較し有意に皮下腫瘍モデルマウスの皮下腫瘍の成長を抑制し、腫瘍切片においてアポトーシス細胞の増加と血管密度の減少、細胞増殖の低下も認めた。以上より MDM2 阻害剤は OCCC における有効な新規治療法となりうる可能性があり、また MDM2 阻害剤と PI3K/mTOR 同時阻害剤の併用療法は OCCC に対する治療選択の一つとして期待される。