

博 士 論 文

卵巣明細胞腺癌における PI3K/mTOR 同時阻害剤の
抗腫瘍効果及びアポトーシス誘導の検討

榎山 智子

目次

略語一覧	5
要旨	6
第1章 序文	
< 1 > 背景	7
1) 悪性腫瘍における PI3K/AKT 経路の活性化について	
2) 卵巣明細胞腺癌について	
3) 卵巣癌と分子標的薬について	
< 2 > 本研究の目的	20
第2章 対象と方法	21
1) 卵巣癌細胞株と薬剤	
2) DNA/RNA 抽出	
3) PCR 法及びシーケンシング	

- 4) ウェスタンブロッティング法
- 5) MTT アッセイ (細胞増殖抑制試験)
- 6) ノードマウス皮下移植モデルにおける DS-7423 の抗腫瘍効果
- 7) 細胞周期解析
- 8) Annexin V-FITC アポトーシス解析
- 9) 半定量的 RT-PCR
- 10) 遺伝子サイレンシング
- 11) Luciferase アッセイ
- 12) 統計解析

第3章 結果 34

1. OCCA 細胞株における *PIK3CA*、*PTEN*、*K-ras*、*TP53* 変異解析 34
2. OCCA 細胞株における RTK-PI3K-AKT 経路のリン酸化

3. PI3K/mTOR 同時阻害剤 (DS-7423)と mTOR 単独阻害剤 (rapamycin)による

腫瘍細胞増殖抑制試験

4. DS-7423 による PI3K-AKT 経路のシグナル抑制

5. OCCA 細胞株を用いたヌードマウス皮下移植モデルにおける DS-7423 の抗腫

瘍効果

6. DS-7423 による細胞周期への影響

7. DS-7423 によるアポトーシス誘導能

8. DS-7423 による *TP53* 依存性アポトーシスの誘導

9. DS-7423 によるアポトーシス誘導における *TP53* 活性化

第 4 章 考察	61
----------------	----

第 5 章 結論	72
----------------	----

参考文献

謝辞

略語一覽

OCCA: Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma

OSA: Ovarian Serous Adenocarcinoma

PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase

mTOR: Mammalian Target Of Rapamycin

RTK: Receptor Tyrosin Kinases

PTEN: Phosphatase and Tensin Homolog

HER2: Human Epidermal growth factor Receptor 2

HER3: Human Epidermal growth factor Receptor 3

FOXO: Forkhead box-O transcription Factors

要旨

本研究では、卵巣明細胞腺癌(OCCA)では PI3K - AKT 経路が高頻度に活性化している

ことをもとに、新規 PI3K/mTOR 同時阻害剤である DS - 7423 の抗腫瘍効果を検討した。

DS - 7423 は濃度依存的に腫瘍増殖抑制効果を発揮し、高濃度でアポトーシスを誘導

した。*TP53* 変異を有さない株で有意にアポトーシス誘導率が高く、アポトーシス誘導

時に *TP53* 下流遺伝子の発現増加を認めたことから、DS-7423 によるアポトーシスに

は *TP53* 活性化が関わっていることが示唆された。OCCA は *TP53* 変異率が低く、

DS-7423 は OCCA において有効な治療選択肢の 1 つとなりうることが示された。

第1章 序文

< 1 > 背景

1) 悪性腫瘍における **PI3K/AKT** シグナル経路の活性化について

PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)-AKT シグナル経路は増殖シグナル経路の 1 つであり、多癌種において活性化している。この経路の抑制を目的とした分子標的薬の開発は多数進行中であり、有望な治療戦略の 1 つとされている。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 (Receptor Tyrosine Kinases: RTK) の過剰発現により引き起こされる。遺伝子変異としては、癌遺伝子 *Ras* の変異や PI3K の触媒サブユニットである p110 α をコードする遺伝子である *PIK3CA* の変異、また PI3K を抑制的に制御する *PTEN*(Phosphatase and Tensin Homolog)の変異などが知られている(1)。PI3K は、細胞膜の構成成分であるイノシトールリン酸のイノシトール 3 位のリン酸化を触媒する脂質キナーゼであり、Class I PI3K は、p110 α 、p110 β 、 p110 γ 、 p110 δ の 4 つの触媒サブユニットアイソフ

フォームから構成されているが、これらのアイソフォームの中で $p110\alpha$ の活性化変異が様々な癌腫で高頻度に報告されている(2,3)。 $p110\beta$ 及び $p110\delta$ は PTEN の欠失を認める癌において活性化を認めることがあるとされている。活性化した PI3K はホスファチジルイノシトール二リン酸(PIP2)からホスファチジルイノシトール三リン酸(PIP3)へのリン酸化を促し、AKT を中心とした下流因子のリン酸化を通して、細胞増殖・細胞生存シグナルを伝達する(図1)。 PTEN は PIP3 を PIP2 に脱リン酸化する遺伝子であり、PI3K に拮抗する作用を有し、PIK3CA の活性化型変異と PTEN の不活性化型変異はともに、PI3K 経路を活性化する因子となりうる。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)

が腎細胞癌で使用されているにとどまっている。

mTOR は 2 種類の分子複合体において触媒サブユニットとしての役割を担っている。

mTOR 複合体 1 (mTORC1) は mTOR、mLST8/G β L (mammalian LST8/G-protein β -subunit like protein)、Raptor (regulatory associated protein of mTOR) および PRAS40 と DEPTOR からなる。この複合体はタンパク質生合成の制御に関わり、mTORC1 阻害剤である rapamycin により阻害される。上述のエベロリムス、テムシロリムス等の mTOR 阻害剤もこの mTORC1 のみを特異的に阻害する薬剤であり、rapalog と称される。一方、mTOR 複合体 2 (mTORC2) は mTOR、G β L、Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR)、および mSIN1(mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1) からなる。mTORC2 は rapamycin による阻害は受けない(7)。

mTORC2 は AKT をリン酸化し AKT を活性化する(4)。PI3K により活性化された AKT は mTORC1 を活性化するとともに、GSK3 β や forkhead box-O transcription factors (FOXO)、MDM2 といった他の下流分子をリン酸化する(5)。FOXO はアポトーシス

の制御に関わる分子として知られている。mTORC1 は、さらに下流の 4E-BP1 や S6 kinase 1 (S6K1) のリン酸化を介してタンパク合成や細胞増殖をコントロールしている (6)。また、AKT 下流の分子である MDM2 は TP53 と結合することによってそのユビキチン化を介して TP53 を分解することにより、TP53 を制御する役割をもつ (8)。

このように 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。この経路を抑制することは新しい治療戦略として理にかなっており、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 (9-12)。これまでのところ、mTORC1 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で有効性が高い可能性があり、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 DS-7423 である。また、PI3K-AKT 経路にはアポトーシス制御に関わる分子が存在していることから、この経

路の抑制により静細胞的効果だけでなく、殺細胞効果ももたらされる可能性がある。

なお、従来より「mTOR」の用語は「mTORC1」を指して用いられており、本論文に

においても、以下 mTORC1 を mTOR と称することとする(図1)。

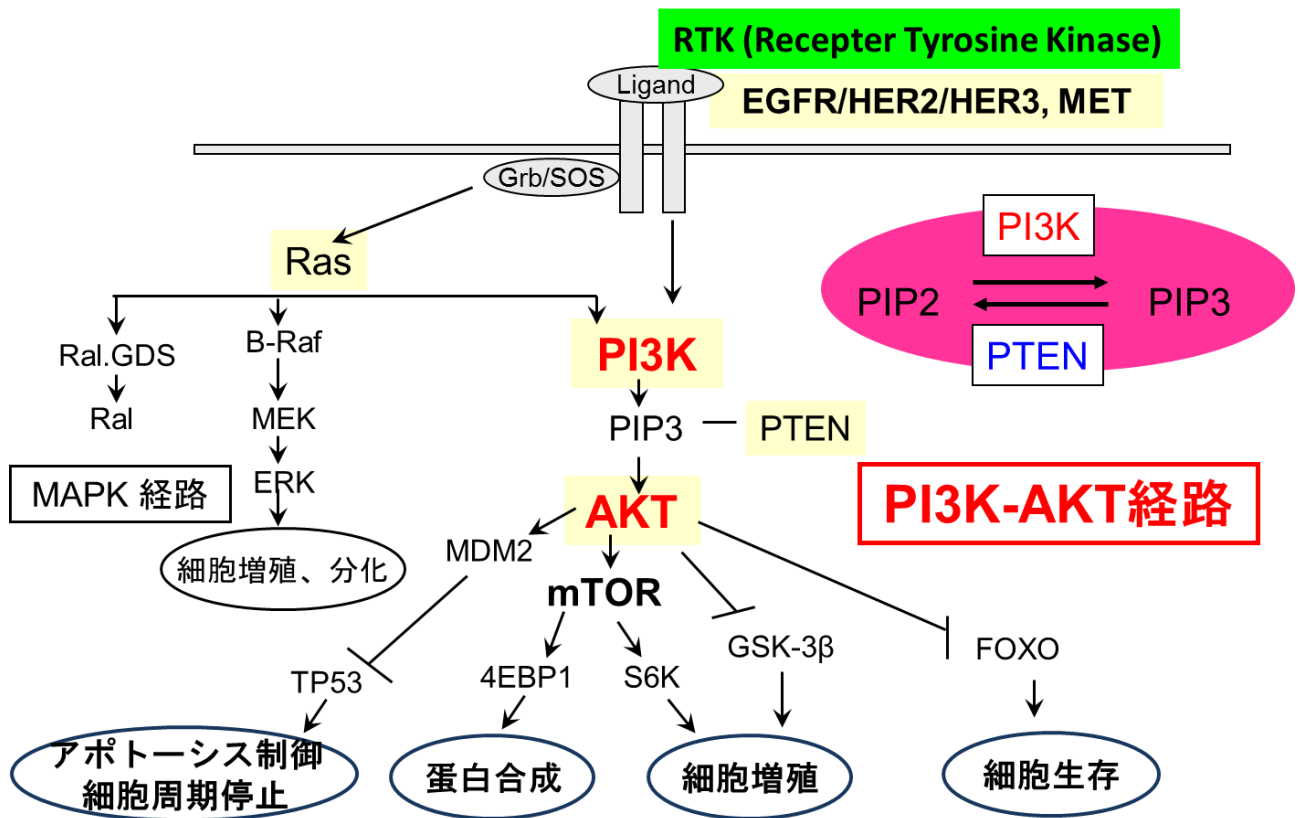


図1 RTK-PI3K-AKT 経路

細胞膜上のチロシンキナーゼ受容体に増殖因子が結合することにより、下流の増殖シグナル経路が活性化する。PI3KによりPIP2がPIP3にリン酸化されることでAKTのリン酸化が起こる。AKTの下流には、mTOR、MDM2、GSK3 β 、FOXOなどの因子が存在し、タンパク合成や細胞増殖、アポトーシス制御に関わっている。

2) 卵巣明細胞腺癌について

卵巣癌は女性の癌として 8 番目に多く診断され、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 23 万人の女性が卵巣癌と診断され、約 14 万人が死亡している。(WHO, IARC GLOBOCAN, Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008) その中で卵巣明細胞腺癌(Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma : OCCA)は卵巣癌における死亡症例が 2 番目に多い組織型とされている。また、その発症頻度は欧米では 5-10% と低頻度であるのに対し、アジアで高く、特に日本では卵巣癌の約 25% と高頻度に認められる組織型である(13)。OCCA は子宮内膜症性卵巣嚢胞を発生母地として多段階的に発癌すると考えられており、上皮性卵巣癌で標準治療であるプラチナ製剤を用いた化学療法に抵抗性を示す症例が多く、早期に再発を来すことも多く予後不良とされている(14)。そのため、OCCA では新たな治療戦略の開発が期待されている。

卵巣癌の組織型の中では、卵巣漿液性腺癌(Ovarian Serous Adenocarcinoma: OSA)

の割合が最も高い(15)。OSAはプラチナ製剤を使用した化学療法への反応性が高く、標準治療であるTC療法(パクリタキセル・カルボプラチン療法)の奏効率は70%以上である。OCCAとOSAでは分子生物学的な特徴も異なっており、OSAではその96%以上にTP53の変異を認めるのに対し、OCCAではTP53の変異率は10%程度と低率である(15,16)。癌抑制遺伝子RBIや遺伝性乳癌卵巣癌の原因遺伝子であるBRCA1/2の変異はOSAでは高率に認めるが、OCCAでの変異率は低い。その一方、PI3K-AKT経路を直接活性化するPIK3CAの変異はOCCAの40%に認められるのに対し、OSAでは10%以下と報告されている(17)。また、OCCAではKRASやPTENの変異は10%以下と低率であるが、HER2の過剰発現が約30%、cMETの過剰発現が約30%に認められるなど、RTK(Receptor Tyrosine Kinase)の過剰発現が高頻度に認められる(18-21)(図2)。これらの分子生物学的な背景から、OCCAにおいてはPI3K-AKT経路が活性化している率が高いことが予想され、この経路に対する分子標的薬のよいターゲットとなりうると考えられる。

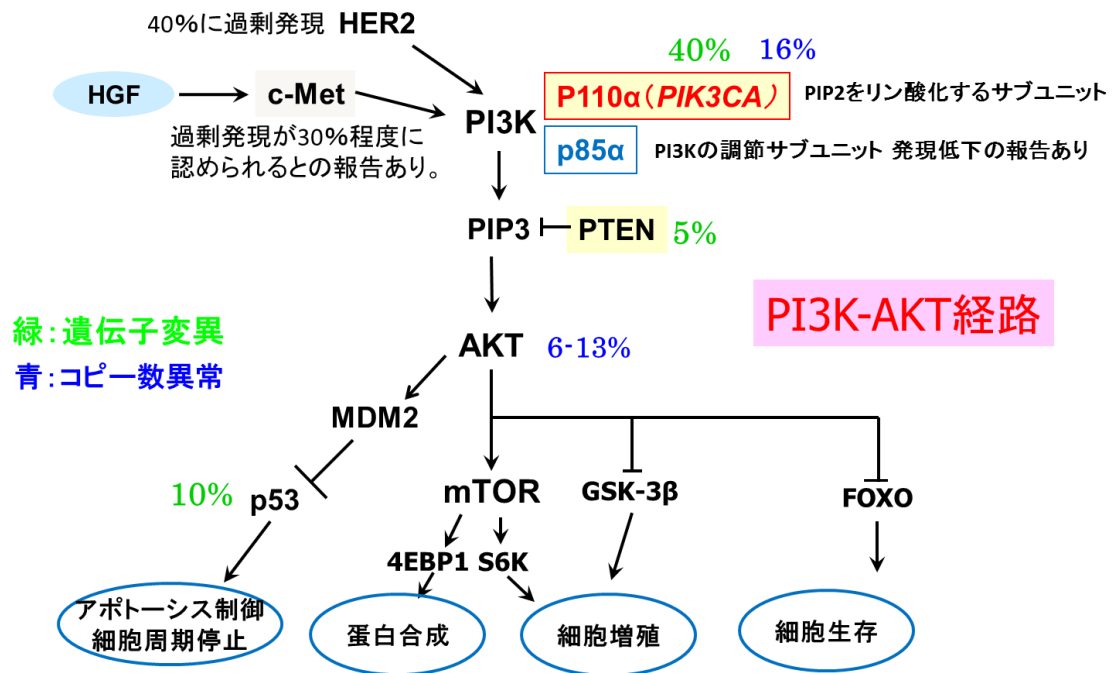


図2 OCCAにおけるPI3K-AKT経路の遺伝子異常

OCCAではPI3K (*PIK3CA*)の変異が約40%と高率であり、HER2やcMETといったRTKの過剰発現も高頻度に認めるため、この経路が活性化している可能性が高い。*TP53*の変異は10%程度と、他の組織型と比較して頻度が低いのが特徴である。

3) 卵巣癌と分子標的薬について

分子標的薬は、癌細胞の分子生物学的特性に基づいた制御因子を標的とする薬剤であり、その標的因子から血管新生阻害剤、増殖因子受容体・シグナル伝達阻害剤、DNA修復・転写制御因子阻害剤に分類される。現在、婦人科領域において保険適応となっている分子標的薬は、子宮肉腫で使用される **multiple kinase inhibitor** であるパゾパニブ塩酸塩と上皮性卵巣癌で使用されるベバシズマブのみであるが、主に卵巣癌において様々な分子標的薬の治験が行われている。

米国婦人科腫瘍グループ (Gynecologic Oncology Group : GOG) の GOG218 試験では、TC 療法と bevacizumab (BEV : 血管内皮増殖因子受容体抗体) との併用化学療法に BEV による維持療法を加えると、TC 療法に比して無増悪生存期間 (PFS) の有意な改善を認めた (22, 23)。ICON-7 試験では、TC 療法と BEV との併用療法に BEV 維持療法を加えた群では TC 療法に比して PFS を有意に延長することが示された。また、本試験対象患者の 30% を占めるⅢ期の 1.0cm 以上の残存腫瘍を有する Suboptimal 群

とⅣ期症例(Highrisk 群)では、TC+BEV→BEV 維持療法が TC 療法に比して有意な全生存期間(OS) の改善を示した。一方、Low-risk 群では TC+BEV→BEV 維持療法と TC 療法との差はみられなかった。白金製剤感受性再発卵巣癌 484 例を対象としてゲムシタビン・カルボプラチン併用化学療法(GC 療法)における BEV の追加意義を検討した第Ⅲ相試験(OCEANS)の結果では、GC+BEV→BEV 維持療法は GC 療法に比して有意な PFS の延長(4.0 カ月)を示した。これらの成績から、卵巣癌では High-risk 症例や白金製剤感受性再発例が BEV の適応となることが示唆され、日本においても 2013 年 11 月に保険収載された。

PARP(poly ADP-ribose polymerase)阻害剤は DNA 修復・転写制御因子阻害剤の 1 つであり、二本鎖 DNA 鎖切断修復に関与する BRCA が欠損した癌細胞に細胞死を誘導する。2 レジメン以上の化学療法治療歴を有する白金製剤感受性再発 High-grade 漿液性卵巣癌 265 例を対象とした Olaparib の内服維持療法としての有効性を検討した第Ⅱ相無作為化試験の結果、Olaparib による維持療法群はプラセボ群に比して無増悪生存

期間(PFS)の有意な延長(3.6 カ月)を示し、増悪のリスクを 65%低下させた (27)。

さらにプラチナ製剤感受性初回再発上皮性卵巢癌，原発性腹膜癌，卵管癌 41 例を対象

とし，GC 療法と iniparib(PARP 阻害剤)との併用療法(GCI 療法)に関する第Ⅱ相試

験では，GCI 療法は奏効率 65%と高い抗腫瘍効果を示し，GC 療法に比して明らかな

毒性の増強もみられなかった。また、白金製剤抵抗性初回再発上皮性卵巢癌に対して

も GCI 療法は奏効率 32%を示した(26)。

このように、進行・再発卵巢癌において分子標的薬の有効性が示されつつあり、今

後臨床応用される可能性が高いと考えられる。

mTOR 阻害剤は、本邦においても腎細胞癌に対して臨床応用されている薬剤である。

PIK3CA 変異が高率に認められる OCCA は mTOR 阻害剤のよいターゲットと考えられ

ている。動物実験において mTOR 阻害剤が OCCA に対し有効であるとの報告がある

(28 - 31)。また日本におけるヒトへの使用経験では、6 例中 1 例が partial response、さ

らに 1 例が stable disease の結果であった(32)。現在、OCCA に対するエベロリムス と

テムシロリムスの臨床試験が開始されている。

PI3K/mTOR 同時阻害剤も多数の癌種で臨床試験が行われている。乳癌、婦人科癌患者 140 人(卵巣癌症例 60 例を含む)を対象とした第 1 相試験が行われ、*PIK3CA* 変異癌患者での有効性が示唆された(33)。登録患者中 23 人が *PIK3CA* 変異を有しており、7 例(30%)で奏功(partial response)が得られたのに加え、2 例(9%)においても 6 か月以上の無増悪生存が得られた。これに対し、*PIK3CA* 変異を有さない 70 例においては PI3K/mTOR 阻害剤に反応を示した症例は 10%に留まった($p=0.04$)。今後、第 II 相・第 III 相試験でさらなる検討が求められる。その一方、OCCA に症例を絞った PI3K/mTOR 同時阻害剤の臨床試験は行われておらず、前臨床試験も含めてその有用性は明らかではない。

このように、卵巣癌において分子標的薬の治験が多数進行中であり、今後分子標的薬が実地臨床に用いられるようになる可能性が高いと考えられるが、多様な組織型を有する卵巣癌の分子生物学的特性に応じた治療法の確立が求められている。

< 2 > 本研究の目的

卵巣明細胞腺癌(OCCA)細胞株において、PI3K/mTOR 同時阻害剤 (DS-7423)を用い、

以下のことを明らかにすることを研究の目的とした。

①RTK の蛋白発現、PI3K 経路等の遺伝子変異検索により OCCA における PI3K-AKT 経

路の活性化因子を各株毎に検索する。

②mTOR 単独阻害剤である rapamycin との比較を通して、DS-7423 の薬効の特徴を明ら

かとする。

③in vivo においても抗腫瘍効果を検証する。

④細胞増殖抑制作用において、アポトーシスの関与について解析する。

⑤DS-7423 の感受性を予測するバイオマーカーを同定する。

⑥上記の①～⑤を通して、OCCA において PI3K/mTOR 同時阻害剤が新規治療法となり

うるかを検討する。

第2章 対象と方法

1) 卵巣癌細胞株と薬剤

OCCA 細胞株として、OVTOKO、OVISe、OVMANA、JHOC7、JHOC9、RMG1、SKOV3、ES-2、TOV-21 の9株を用いた。また、OSA 細胞株として、OVSAHO、OVKATE、OV1063、HTOA、JHOS-2、JHOS3、JHOS4 の7株を用いた。OVTOKO、OVISe、OVMANA、OVSAHO、OVKATE、OV1063 は JCRB Cell Bank (Osaka, Japan)より購入した。JHOC7、JHOC9、RMG1、HTOA、JHOS-2、JHOS-3、JHOS-4 は RIKEN Cell Bank (Ibaraki, Japan)より購入した。TOV-21、ES-2、SKOV3 は American Type Culture Collection (Manassas, VA)より購入した。

OVISe、OVTOKO、TOV21、ES2 は 10% 仔ウシ血清(FBS)(Invitrogen)添加 RPMI1640 培地 (GIBCO)で培養した。OVMANA は 20% FBS 添加 RPMI1640 培地で培養した。JHOC7 は 10% FBS 添加 DMEM/F12 培地 (GIBCO)で培養した。JHOC9 と RMG1 は 20%FBS 添加 DMEM/F12 培地で培養した。SKOV3 は 10%FBS 添加 DMEM 培地

(Sigma-Ardrich)で培養した。OVSAHO、OVKATE、OV1063、HTOA、JHOS-2、JHOS-3

と JHOS-4 は 10% FBS 添加 DMEM 培地で培養した。以上の細胞株は全て、37℃

5%CO₂ 下で培養した。SKOV3 株の組織型については、OSA として解析されているも

のもあるが、病理学的な解析により OCCA として扱うのが妥当であることが報告され

ている(34)。

PI3K/mTOR 同時阻害剤 DS-7423 は開発元である第一三共株式会社(Tokyo, Japan)よ

り提供を受けた。従来の PI3K/mTOR 阻害剤は mTOR の阻害が主であり、PI3K の阻害

は高濃度でのみ認められるものが多かったのに対し、本薬剤は同濃度から PI3K と

mTOR を阻害することを目標として開発された薬剤である。数種類のヒト癌細胞株を

用いた実験での抗腫瘍効果が報告されている(35)(表 1)。mTOR 単独阻害剤

Rapamycin は Cayman Chemical(Michigan, USA) 社より購入した。各薬剤の標的分子は

図 3 のとおりである。各薬剤はジメチルスルホキシド(DMSO)(Sigma-Ardrich)に溶解

し凍結保存し、用事調整により各濃度に希釈して実験に使用した。

細胞株		<i>PTEN</i> または <i>PIK3CA</i> の変異	IC ₅₀ 値(nM)
AN3CA	子宮体癌	<i>PTEN</i>	9.4
U-937	急性骨髄性白血病	<i>PTEN</i>	29
NCI-H460	大細胞癌	<i>PIK3CA</i>	20
HCT-15	大腸癌	<i>PIK3CA</i>	32
ES-2	卵巣明細胞腺癌	no	40
TOV-21	卵巣明細胞腺癌	<i>PIK3CA</i> , <i>PTEN</i>	48

表 1 ヒト癌細胞株における DS-7423 の腫瘍増殖抑制効果

数種類のヒト癌細胞株における DS-7423 の腫瘍増殖抑制効果を示す。いずれの株でも IC₅₀ 値は 50nM 以下であった。

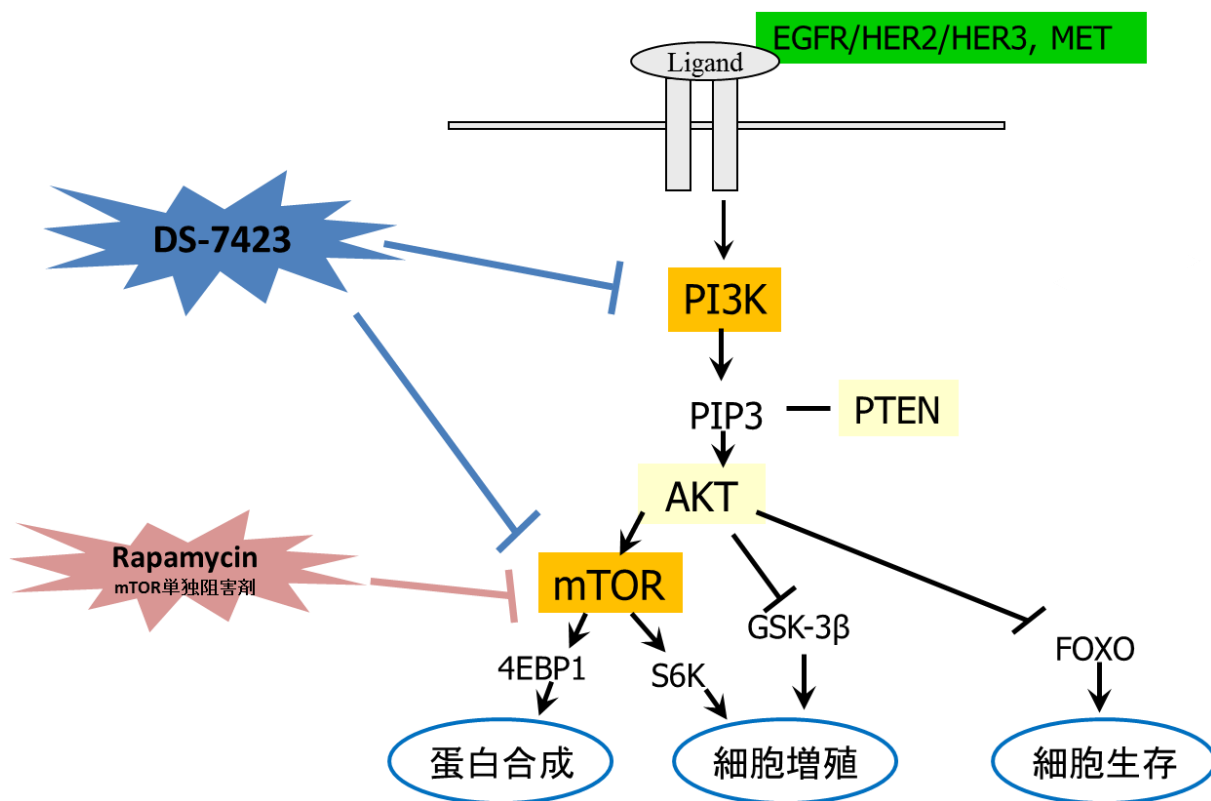


図3 DS-7423 (PI3K/mTOR 同時阻害剤)

DS-7423 は PI3K 及びその下流の mTOR を同時に阻害する。海外で固形癌を対象に第 I 相臨床試験施行中。本研究では mTOR 単独阻害剤として rapamycin を使用した。

2) DNA/RNA 抽出

OCCA 細胞株 9 株から Qiaamp DNA Mini および micro Kit(QIAGEN, Valencia, CA) を

使用してプロトコールに従い DNA を抽出、精製した。DNA の濃度は Nano Drop

ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop) にて決定した。また、この 9 株から RNase mini

kit (QIAGEN)を用いて total RNA を抽出し、Super scriptIII First-Strand Synthesis System

for RT-PCR(Invitrogen)を用いてプロトコールに従い cDNA を精製した。

3) PCR 法及びシーケンシング

OCCA 細胞株 9 株における *PTEN*、*K-Ras*、*PIK3CA*、*TP53* の変異の有無を PCR 法及びダイレクトシーケンス法を用いて解析した。

PIK3CA、*PTEN* に関しては cDNA を精製した後、LA-Taq (Takara BIO, Madison, WI)

を用いて RT-PCR を行い、全 Coding region を含む PCR 産物をもとに変異の有無を調べ

た。*K-Ras* (exon 1 and 2)、*TP53* (exons4-8)、*PIK3CA* 及び *PTEN* 変異解析で用いたプ

ライマーを表 2 に示す。

4) ウェスタンブロッティング法

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 western blotting による解析を行った。培養細胞に DS-7423、Rapamycin 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 1% Triton 溶液 (Cell Signaling Technology)を用いて 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。蛋白濃度は Bradford assay (Bio-Rad) にて測定した。SDS-PAGE 法にて泳動し、immobilon トランスファーメンブレン (Millipore) にて転写した。抗体は total PTEN、phospho-PTEN (Ser380), total AKT、phospho-Akt (Ser473, Thr308), phospho-GSK3beta (Ser9), total S6、phospho-S6 (Ser235/236, Ser240/245), phospho-4EBP1 (Thr37/46), phospho-FoxO1 (Thr24), phospho-FoxO3a (Thr32), phosphor-MDM2 (Ser166), total HER2、phospho-HER2 (Tyr1221/1222), total HER3、phospho-HER3 (Tyr1289), phospho-TP53 (Ser15), cleaved-PARP、PARP (Cell Signaling Technology), phospho-TP53 (Ser46) (Calbiochem, Billerica, MA), TP53 (Santa Cruz

Biotechnology, Santa Cruz, USA)、beta-actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を使用した。転写されたバンドは ECL advance または ECL select (GE Healthcare, Piscataway, NJ) を使用して X 線下で感光しバンドの強さを比較した。

5) MTT アッセイ (細胞増殖抑制試験)

DS-7423 と Rapamycin を 0nM から 2500nM までの 7 点の希釈系列で培養細胞に添加し、tetrazolium salt, WST-8 を用いた Cell counting Kit (Dojindo, Tokyo, Japan) を用いてプロトコールに従い、細胞生存率を計測した。薬剤添加前日に 96Well Plate に 2×10^3 個/well の細胞を撒き、薬剤添加から 72 時間後にアッセイを行った。アッセイは各々 4 回行い、細胞増殖抑制曲線を作成した。450nm 波長の吸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、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。

6) ノードマウス皮下移植モデルにおける DS-7423 の抗腫瘍効果

週齢 6 週のノードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu)(CLEA Japan, Inc ,Tokyo, Japan)の皮下にそれぞれ細胞数 10×10^6 個の TOV-21、RMG-1、ES-2 を含む PBS500 μ L を注入した。腫瘍が増大したところで切り出し、3mm 大の腫瘍塊を別のマウスの皮下へ移植し、皮下移植モデルを作成した。DS-7423 は滅菌 0.5w/v% メチルセルロース 400 溶液(Wako Pure Chemical Industries, Japan)に溶解し、移植 1 週間後(細胞数 5×10^6 - 6×10^6 cells/0.1mL 相当)より連日経口投与を開始した。DS-7423 の濃度は、0、1.5 mg/kg、3 mg/kg、6 mg/kg の 4 段階とし、それぞれの群を 5 匹ずつとした。腫瘍体積の計算式は、[長径] \times [短径]²/2 とした。腫瘍を取り除いた後に腫瘍重量を測定し、それぞれの群の平均値を算出した。また、最終投与から 2 時間後及び 6 時間後にタンパクを抽出し、標的タンパクのリン酸化評価のため western blotting を行った。

7) 細胞周期解析

DS-7423 による細胞周期への効果を Flow cytometry 法で解析した。 5×10^5 の細胞を 60mm プレートにまき、各薬剤を添加した後 48 時間培養した。トリプシン試薬で細胞を回収し、PBS で 2 回洗浄したのち、70%エタノールで固定し-20℃で保存した。PBS で 2 回再洗浄後、RNase (0.25mg/ml, Sigma-Ardrich) で 37℃30 分間処理し、その後 PI ($50 \mu\text{g/ml}$, Sigma-Ardrich) で 4℃ 30 分間暗所で核染色し、Flow cytometry (FACSCalibur HG, Franklin Lakes, NJ) で細胞周期解析した。解析ソフトは CELLQuest pro ver.3.1 (Beckman Coulter Epics XL, Beckman Coulter) を用いた。

8) Annexin V-FITC アポトーシス解析

60mm プレートに 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、48 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。

9) 半定量的 RT-PCR

OCCA 細胞株に DMSO 及び各濃度の DS-7423 または Rapamycin を添加し 24 時間インキュベートした後、RNeasy Mini Kits (QIAGEN, Valencia, CA)を用いてプロコールに従って total RNA を抽出した。 Super Script III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて total RNA から cDNA を精製し、半定量的 RT-PCR 法を行った。半定量的 RT-PCR 法において、半定量的比較が可能となる増幅サイクル数は 15-30 サイクルであった。使用したプライマー構造は表 2 の通りである。

それぞれの反応は、94℃、30 秒の変性反応、55-60℃、30 秒のアニーリング、72℃、60

秒の増幅反応を 15-30 サイクル施行した。これらの反応は Thermal Cycler Gene Atlas

(ASTC, Fukuoka, Japan)を用いて行った。

10) 遺伝子サイレンシング

トランスフェクションに先立って、各細胞を 100mm プレートに約 30%の細胞密度になるように撒き 24 時間インキュベートを行った。*TP53* の 2 種類の siRNA を用いて、ト

ランスフェクション試薬とともに添加した。トランスフェクション試薬として

Lipofectamine 2000 RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA) と Opti-MEM medium

(GIBCO)を使用した。*TP53*siRNA は 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。

11) Luciferase アッセイ

TP53 発現プラスミド (0.1 μ g/ μ l)と pp53 TA Luc (0.25 μ g/ml)は Effectene reagent

(QIAGEN) を用いてプロトコールに従い同時にトランスフェクションを行った。トラン

スフェクション効率を計測するためのコントロールとして phRL CMV-Renilla plasmid

(Promega, Madison, WI, USA) を全てのアッセイでトランスフェクションを行った。それ

ぞれに DS-7423 156nM または 2500nM を添加し、24 時間後に *TP53* の転写活性を

Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Wisconsin, USA)でプロトコールにのっ

とって蛍光させた後、活性値を計測した。これらのアッセイ結果は 3well での計測値の

平均を算出し、またアッセイは 3 回行った。

12) 統計解析

各データは3回のアッセイの 平均 \pm 標準偏差であらわした。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。

KRAS	Exon1	Forward	GGTGGAGTATTTGATAGTGTA
		Reverse	GGTCCTGCACCAGTAATATGCA
	Exon2	Forward	TTCCTACAGGAAGCAAGTAG
		Reverse	AATTACTCCTTAATGTCAGC
TP53	Exon4	Forward	CTGGTAAGGACAAGGGTTG
		Reverse	CAAAGGGTGAAGAGGAATCC
	Exon5	Forward	TGTTCACTTGTGCCCTGACT
		Reverse	CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG
	Exon6	Forward	GCCTCTGATTCCTCACTGAT
		Reverse	TTAACCCCTCCTCCCAGAGA
	Exon7	Forward	ACTGGCCTCATCTTGGGCCT
		Reverse	TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC
	Exon8	Forward	GAGCTTAGGCTCCAGAAAGG
		Reverse	AGGAAAGAGGCAAGGAAAGG
PIK3CA	PCR primer	Forward	CCCGAGCGTTTCTGCTTTGGGACAACC
		Reverse	TAACAGTGCAGTGTGGAATCCAGAGCTTTC
	Sequence primer	①	TCCCTAAGATCCACAGCTTC
		②	TTGTGTAGCTGTGGAAATGC
		③	TGCTGAACCAGTCAAACCTCC
		④	AATCTCACAAGCAAGTTATCC
		⑤	AAGTGTTAGCATATCTTGCCG
		⑥	ACGAGAACGTGTGCCATTG
		⑦	GCCTTGTAACACATCTCCTG
PTEN	PCR primer	Forward	GCCGTTTCGGAGGATTATTCGTCTTCTC
		Reverse	CTGGTAATCTGACACAATGTCCTATTGCC
	Sequence primer	①	ACCAGCAGCTTCTGCCATCT
		②	ACCAATGGCTAAGTGAAGATG
		③	CACACAGGTAACGGCTAGGG
		④	CAGTTTATTCAAGTTTATTTTCATGG
TP53AIP1		Forward	CCTTAGGGACTGGCCCTAAC
		Reverse	AGCTGAGCTCAAATGCTGAC
PUMA		Forward	TGAGACAAGAGGAGCAGCAG
		Reverse	ACCTAATTGGGCTCCAT CTC
p21		Forward	GTTCCTTGTGGAGCCGGAGC
		Reverse	GGTACAAGACAGTGACAGGTC
GAPDH		Forward	ACAACAGCCTCAAGATCATCAG
		Reverse	GGTCCACCACTGACACGTTG

表 2 変異検索及び RT-PCR で用いたプライマー

第3章 結果

1. OCCA 細胞株における *PIK3CA*, *PTEN*, *K-ras*, *TP53* 変異解析

OCCA 細胞株 9 株において *K-Ras* (exon1 and 2), *TP53* (exon 4-8)、 *PTEN*、 *PIK3CA* (exon1-20)のダイレクトシーケンスを行い、変異を検索した(図 4)。変異の有無は表 3 の通りである。

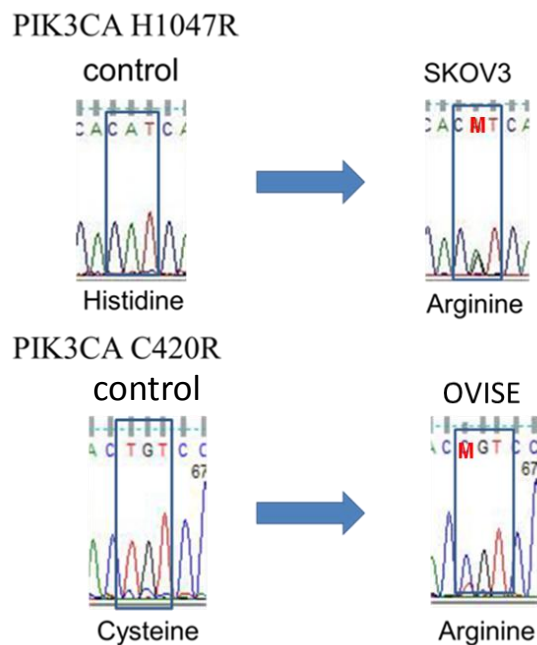


図 4 *PIK3CA* の遺伝子変異

変異好発部位であるコドン 1047 に点突然変異を認め、histidine から arginine へのアミノ酸置換が生じている。コドン 420 にも変異を有する株が存在した。

cell line	mutational status			
	<i>PIK3CA</i>	<i>PTEN</i>	<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>
TOV21	H1047Y	G143fs*4/K267fs*9	G13C	WT
OVISE	C420R	WT	WT	WT
OVMANA	E545V	WT	WT	WT
ES-2	WT	WT	WT	S241F
OVTOKO	WT	WT	WT	WT
JHOC7	WT	WT	WT	WT
JHOC9	WT	WT	WT	R175H
RMG1	WT	WT	WT	WT
SKOV3	H1047R	WT	WT	S90fs*33

表 3 OCCA 細胞株 9 株における *PIK3CA*, *PTEN*, *KRAS*, *TP53* 変異の有無

OCCA 細胞株 9 株における *PIK3CA*, *PTEN*, *KRAS*, *TP53* の変異の有無を示す。*PIK3CA* の変異を 4 株 (変異率 44%)、*PTEN*, *KRAS* の変異を 1 株に認めた。TOV21 は *PIK3CA*, *PTEN*, *KRAS* の重複変異株であった。TP53 変異は 3 株に認められた。

PIK3CA の変異は 9 株中 4 株に認められた。これは既存の報告における OCCA の

PIK3CA 変異率 30-50% と比較して同等の変異率である (17)。すべてアミノ酸置換を伴う

点変異 (図 4) であり、3 株は変異の hot spot である 545 番アミノ酸と 1047 番アミノ酸

に変異を生じていた。OCCA では *PTEN* 及び *KRAS* の変異は低頻度と報告されているが、本研究で用いた 9 株の中では、TOV21 だけに認められた。TOV21 は *PIK3CA*、*PTEN*、*KRAS* の重複変異株であった。*TP53* の変異は 9 株中 3 株で認められた。

2. OCCA 細胞株における RTK-PIK3CA-AKT 経路のリン酸化

OCCA 細胞株 9 株よりタンパクを抽出し、western blotting を行い、OCCA 細胞株における PI3K-AKT 経路のリン酸化レベルを評価した。コントロールとして子宮内膜症性卵巣嚢胞由来の不死化上皮細胞株より抽出したタンパクを用いた。画像処理ソフト Image J を用いて western blotting のバンドの濃度を半定量化し、 β -actin の値で補正した後有効数字 2 桁の数値であらわした。コントロールを 1.0 とし、1.1 倍以上の濃さを示したものを上昇と定義した。AKT の Thr-308 のリン酸化レベル上昇は 9 株中 7 株で認められた (図 5A)。シグナル経路における AKT の下流分子についてみると、mTOR のターゲ

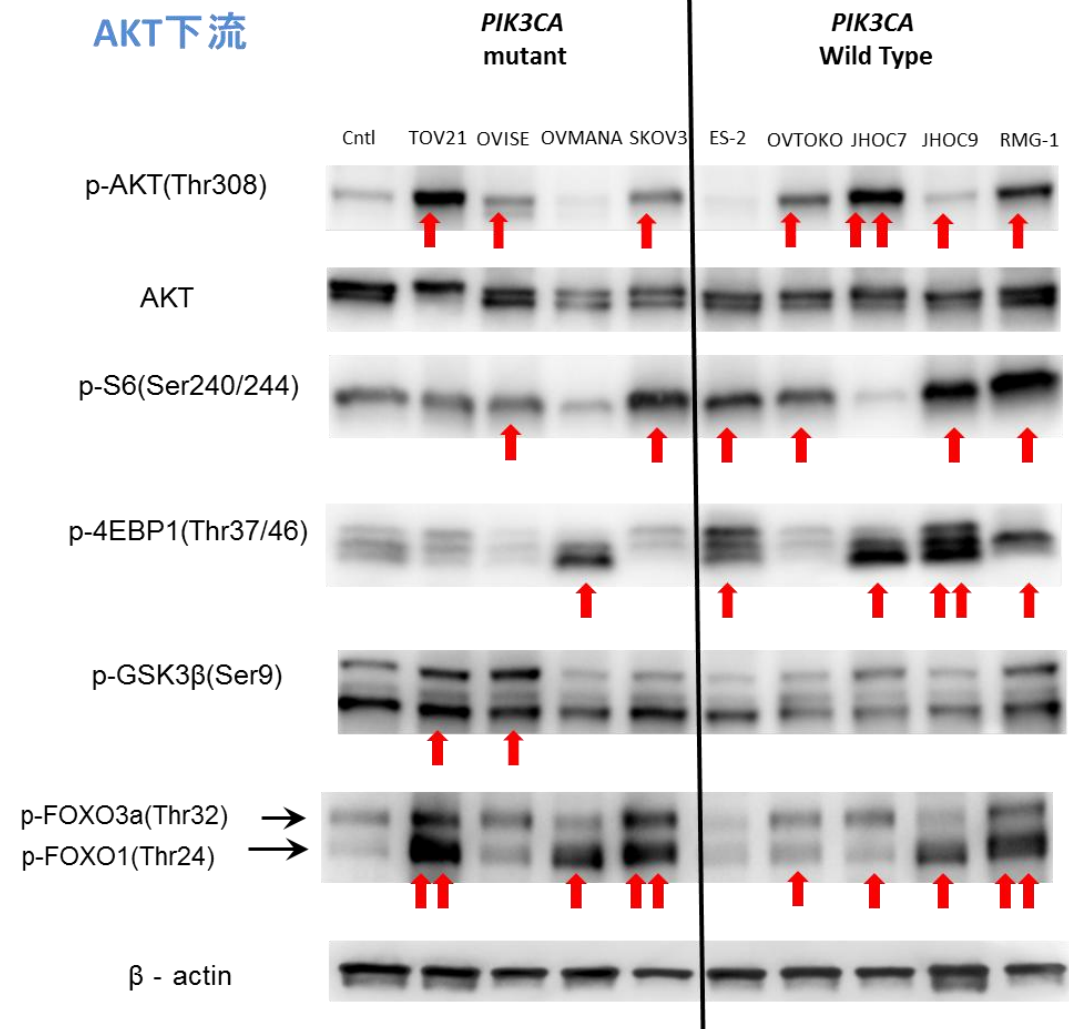
ット分子である S6、4E-BP1 のリン酸化、mTOR に依存しない FOXO1 のリン酸化がコントロールより上昇している株が多く、全株で少なくとも 1 分子のリン酸化レベルがコントロールより上昇していた。また、*PIK3CA* の変異の有無に関わらず、AKT 及びその下流分子のリン酸化レベルは上昇していることが分かった。次に、AKT より上流の RTK (HER2, HER3 and MET) のリン酸化レベルを western blotting で評価した。これら RTK の過剰発現は既に報告されている (18-21) が、リン酸化レベル上昇に関する研究は充分に行われていない。また、HER2 と HER3 はヘテロダイマーを構成し、2 量体として機能する。本研究における western blotting では、HER2 のリン酸化レベルは 6 株、HER3 のリン酸化レベルは 7 株で上昇しており (図 5B)、あわせると HER2/HER3 のリン酸化レベル上昇は、JHOC9 を除く 8 株で認められた。また、MET の発現はコントロールと比較すると、9 株全てにおいて上昇しており、リン酸化 cMET の発現レベルは 9 株中 2 株 (JHOC7 と RMG-1) で著明に上昇していた。*PIK3CA*、*PTEN*、*KRAS* 変異の有無と上流の RTK の発現上昇の有無を表にまとめると、付表のようになる。*PIK3CA* 変異を有す

る株では、全てに RTK-PI3K 経路を活性化させるような RTK 変化を有していた。また

PIK3CA 変異を有さない株においても少なくとも 1 つの RTK の発現レベル上昇がみられ

ており、PI3K-AKT 経路の活性化に寄与していると考えられた。

A



B AKT上流

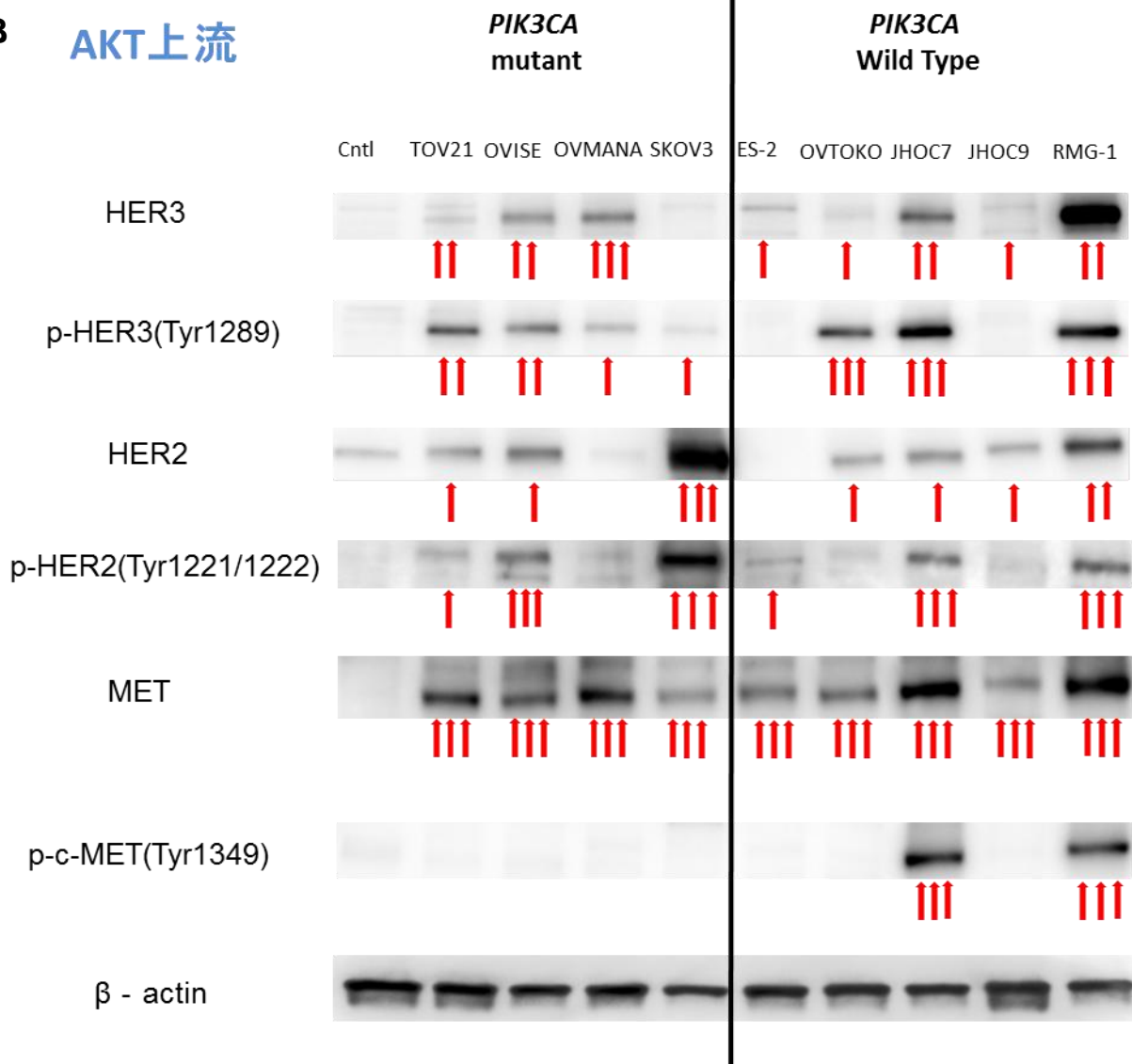


図5 OCCA細胞株におけるRTK-PIK3CA-AKT経路のリン酸化

OCCA細胞株9株から抽出したタンパクを用いてwestern blottingを行い、RTK-PI3K-AKT経路の分子のリン酸化レベルを評価した。Controlとして卵巣子宮内膜症不死化上皮細胞を用いた。画像解析ソフトImage Jを用いてバンドを半定量化し、controlを1.0として1.1～4.9の濃さを示すものを↑、5.0～9.9を↑↑、10.0～を↑↑↑で表した。

A. AKT下流因子を示す。AKT(Thr-308)のリン酸化レベル上昇は9株中7株で認められており、PIK3CAの変異の有無との相関性は明らかではなかった。AKTのリン酸化レベルが低い株においても下流分子のリン酸化レベル上昇が認められた。

B. AKT上流のRTKを示す。トータルの発現量、リン酸化レベルの上昇を示す株が多い。

		TOV21	OVISe	OVMANA	SKOV3	ES-2	OVTOKO	JHOC7	JHOC9	RMG-1
活性化因子	<i>PIK3CA</i> mu	○	○	○	○					
	<i>PTEN</i> mut	○								
	<i>KRAS</i> mut	○								
	HER3	○	○	○		○	○	○	○	○
	p-HER3	○	○	○	○		○	○		○
	HER2	○	○		○		○	○	○	○
	p-HER2	○	○		○	○		○		○
	MET	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	p-cMET							○		○

図 5 の附表 OCCA 細胞株における RTK-PI3K-AKT 経路の活性化因子

PIK3CA, PTEN, KRAS の変異及び図 5 で示した RTK の発現・リン酸化レベル上昇を

PI3K-AKT 経路の活性化因子として、各細胞株毎に活性化因子を有するものに○を付けた。OCCA 細胞株において *PIK3CA* 変異以外にも PI3K-AKT 経路を活性化する因子は広く存在する。

3. PI3K/mTOR 同時阻害剤 (DS-7423)と mTOR 単独阻害剤 (rapamycin)による腫瘍

細胞増殖抑制試験

DS-7423 と rapamycin を OCCA 細胞株にそれぞれ添加し、細胞増殖抑制能を MTT

アッセイにて解析した (図 6)。添加濃度を振って細胞増殖曲線を作成したところ、

全ての細胞株において DS-7423 添加による曲線と rapamycin 添加による曲線は交差し

た。すなわち、20-70nM 以下の低濃度域では DS-7423 に比較し rapamycin の方が強い

増殖抑制効果を示したが、その後増殖抑制効果は頭打ちとなり、高濃度下においても

50-60%の増殖抑制効果であるのに対し、DS-7423 は 100nM 以上の高濃度域では全株で

90%前後の高い増殖抑制効果を示した。

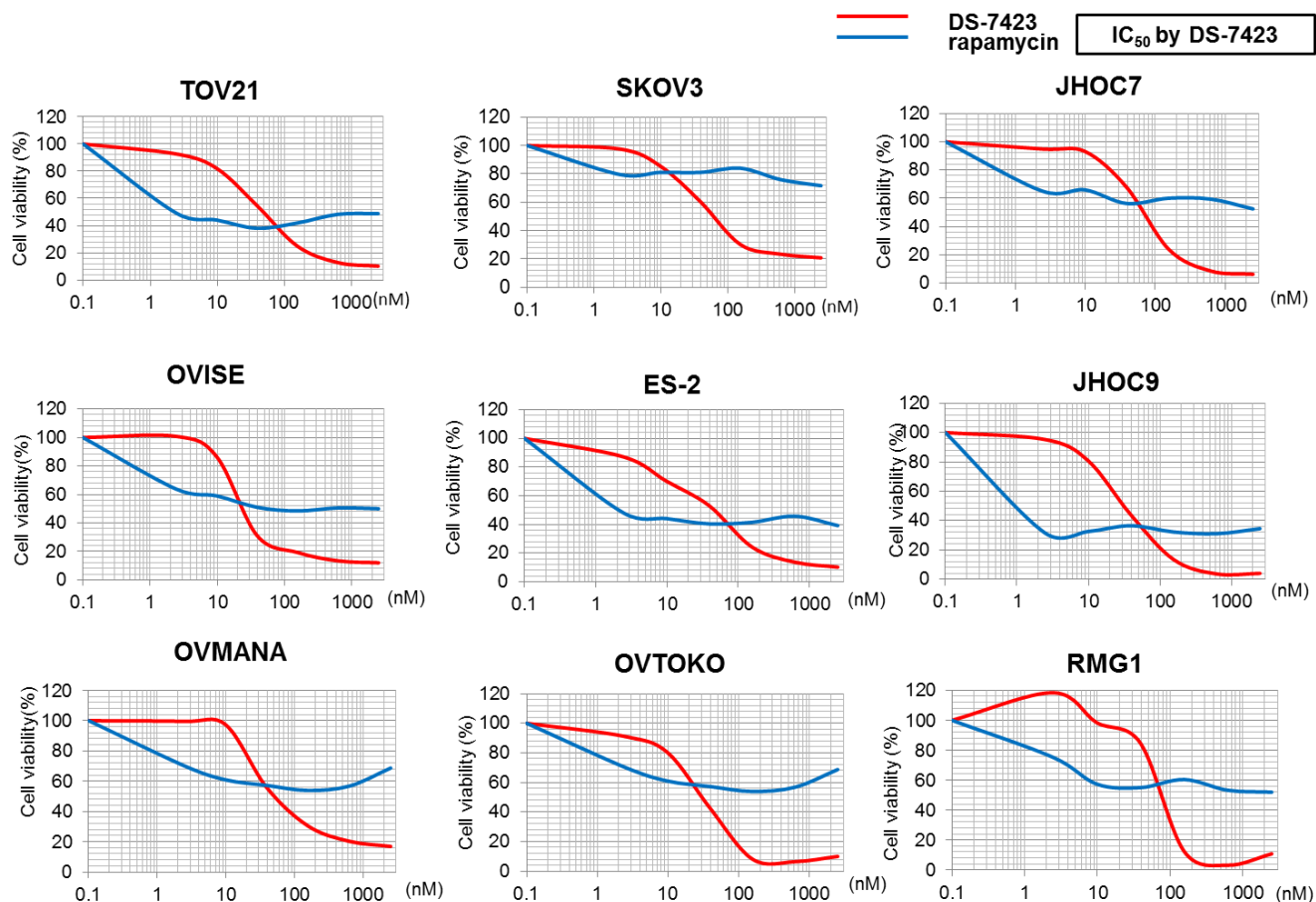


図 6 OCCA 細胞株 9 株における DS-7423, rapamycin の腫瘍増殖抑制効果

OCCA 細胞株 9 株に DS-7423 及び rapamycin を添加し、MTT assay により腫瘍増殖抑制効果を評価した。グラフの横軸に薬剤濃度、縦軸に細胞生存率を表す。全ての細胞株において、高濃度下においても rapamycin の増殖抑制は 40-50%に留まったが、DS-7423 は 80-90%とより強い増殖抑制効果を示した。各細胞株における DS-7423 の 50%増殖阻害濃度 (IC_{50} 値)を右上に示す。

続いて、比較として卵巣漿液性腺癌(OSA)の細胞株 7 株における DS-7423 による腫

瘍増殖抑制効果を MTT assay で評価した。

OSA	IC ₅₀ (nM)
JHOS-3	45
HTOA	60
OVSAHO	65
JHOS-4	120
JHOS-2	250
OV1063	700
OVKATE	>2,500

表 3

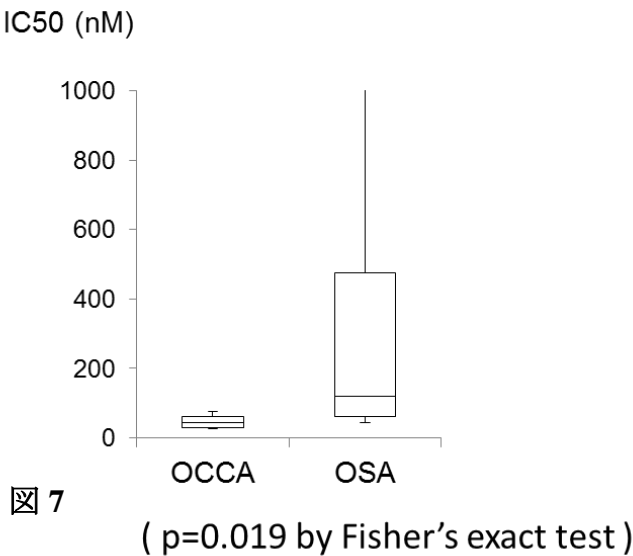


表 3 卵巣漿液性腺癌(OSA)細胞株 7 株における DS-7423 の IC₅₀ 値

OSA 細胞株 7 株に DS-7423 を添加し、MTT assay を行い IC₅₀ 値を求めた。

図 7 OCCA 細胞株と OSA 細胞株における IC₅₀ 値の比較

OSA 細胞株 7 株中 4 株では IC₅₀ 値は 100nM 以上であり、DS-7423 による増殖抑制効果が低い細胞株 (IC₅₀ > 100 nM) の率は OSA において優位に高かった。(p=0.019 by Fisher's exact test)

OCCA 細胞株では 9 株全ての IC_{50} 値が 25-75nM の範囲であるのに対し、OSA 細胞株では、7 株中 4 株の IC_{50} 値は 100nM 以上であった(表 3)。 $IC_{50} > 100nM$ である細胞株(抵抗性)の比率は、OCCA 細胞株では 0 株(0%)であるのに対し、OSA では 4 株(57%)であり有意に抵抗性株の率が高かった($p=0.019$ by Fisher's exact test)。 OCCA では OSA に比較して DS-7423 に対する反応が高いものが多い可能性が示された。

4. DS-7423 による PI3K-AKT 経路のシグナル抑制

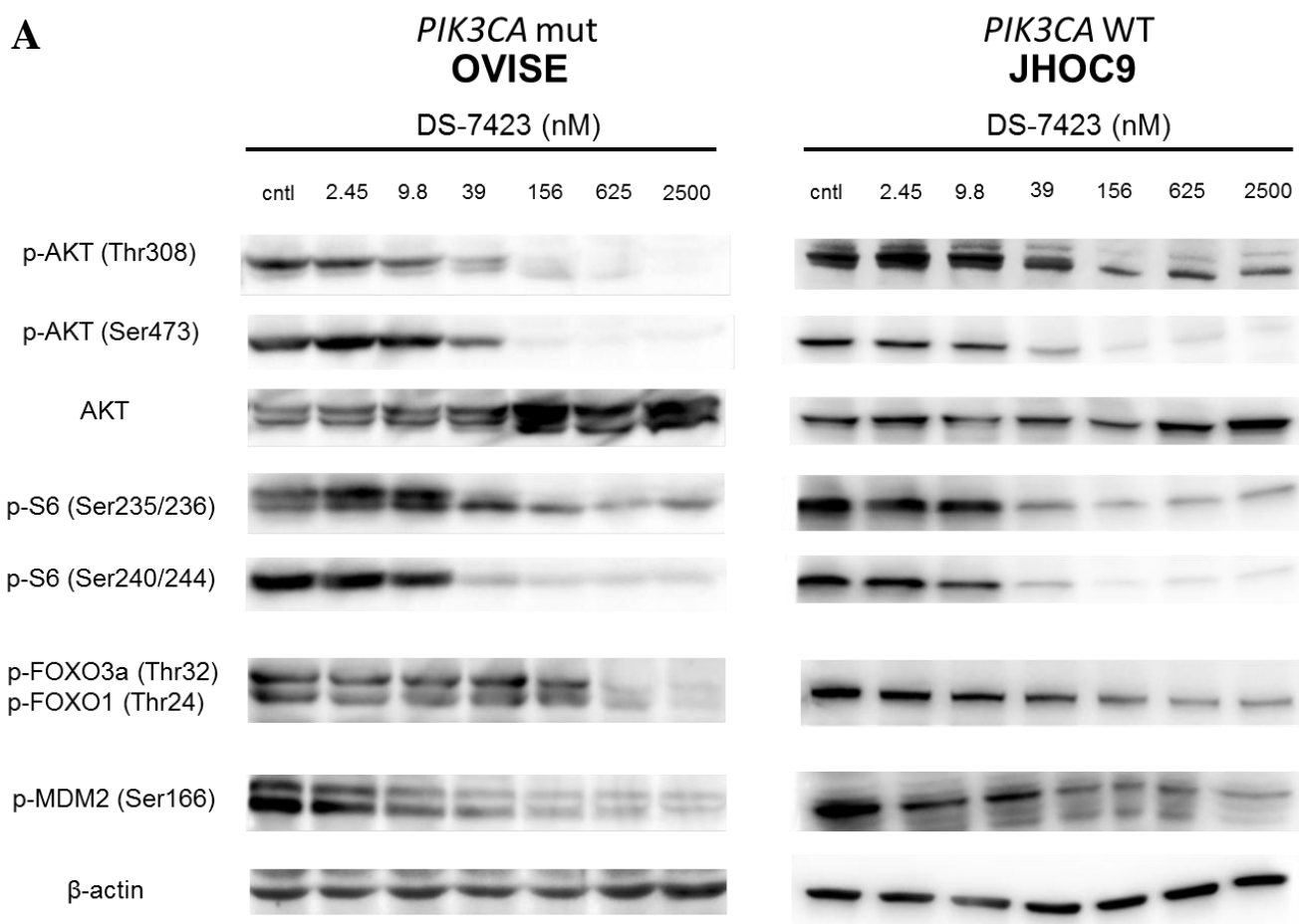
0-2500nM 間 6 種類の濃度の DS-7423 及び rapamycin を OCCA 細胞株に添加して蛋白を回収し、western blotting を施行した。DS-7423 は AKT (Thr308)及び S6 (Ser240/244)のリン酸化を濃度依存的に抑制した(図 8 A)。 両者のリン酸化抑制効果は 39-156nM で明らかであり、OVISe、JHOC-9 ではほぼ同濃度で PI3K と mTOR に対するシグナル抑制効果が出現していた。また mTOR 以外の AKT の下流因子 (FOXO1/3a、MDM2)のリン酸化も抑制されていた。

ン酸化レベルも濃度依存的に抑制された。Rapamycin は 2.45nM の低濃度下においても

S6 のリン酸化を抑制したが、いずれの濃度においても AKT 及び mTOR 以外の AKT 下

流因子のリン酸化は抑制しなかった(図 8B)。 また、rapamycin2500nM では Foxo1/3a

のリン酸化レベルの上昇を認めた。



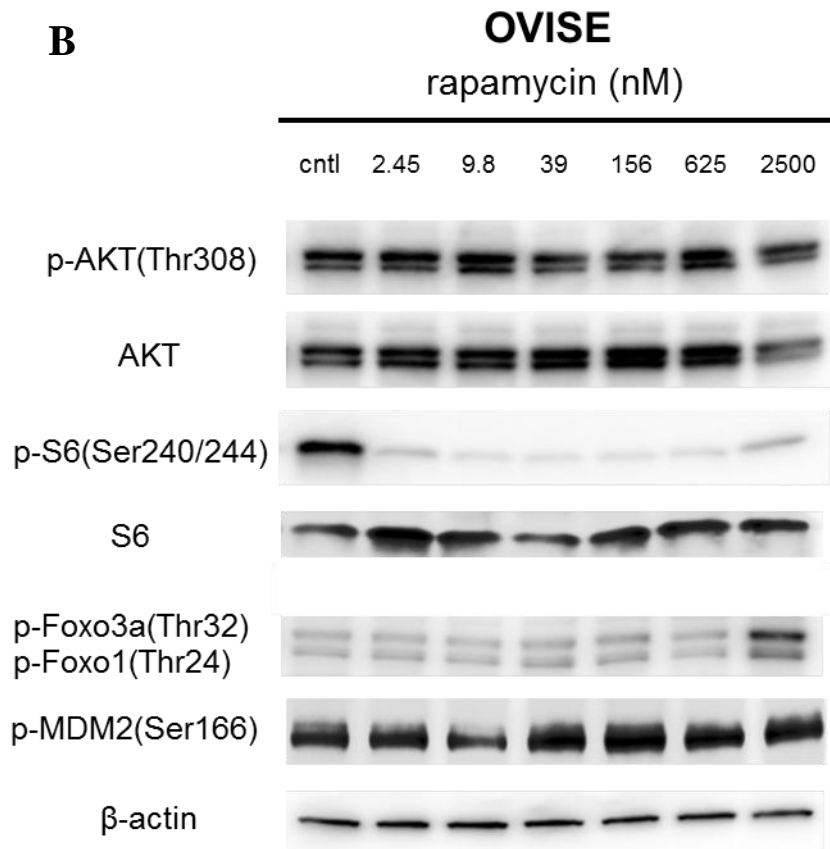


図 8 DS-7423 及び rapamycin 添加による PI3K-AKT 経路のシグナル抑制

A. *PIK3CA* 変異を有する OVISE と *PIK3CA* 変異を有さない JHOC9 での DS-7423 添加によるシグナル抑制を western blotting で評価した。DS-7423 添加により、PI3K の下流である AKT(Thr308)のリン酸化が 39nM 以上で認められた。また mTOR 下流の S6(Ser240/244)のリン酸化も同濃度で認められた。さらに mTOR 以外の AKT 下流分子である MDM2、Foxo3a/1 のリン酸化が抑制された。

B. OVISE 株に rapamycin を添加した際のシグナル抑制。mTOR 下流の S6 のリン酸化は 2.45nM 以降抑制されたが、AKT 及び MDM2, Foxo のリン酸化抑制は認められなかった。

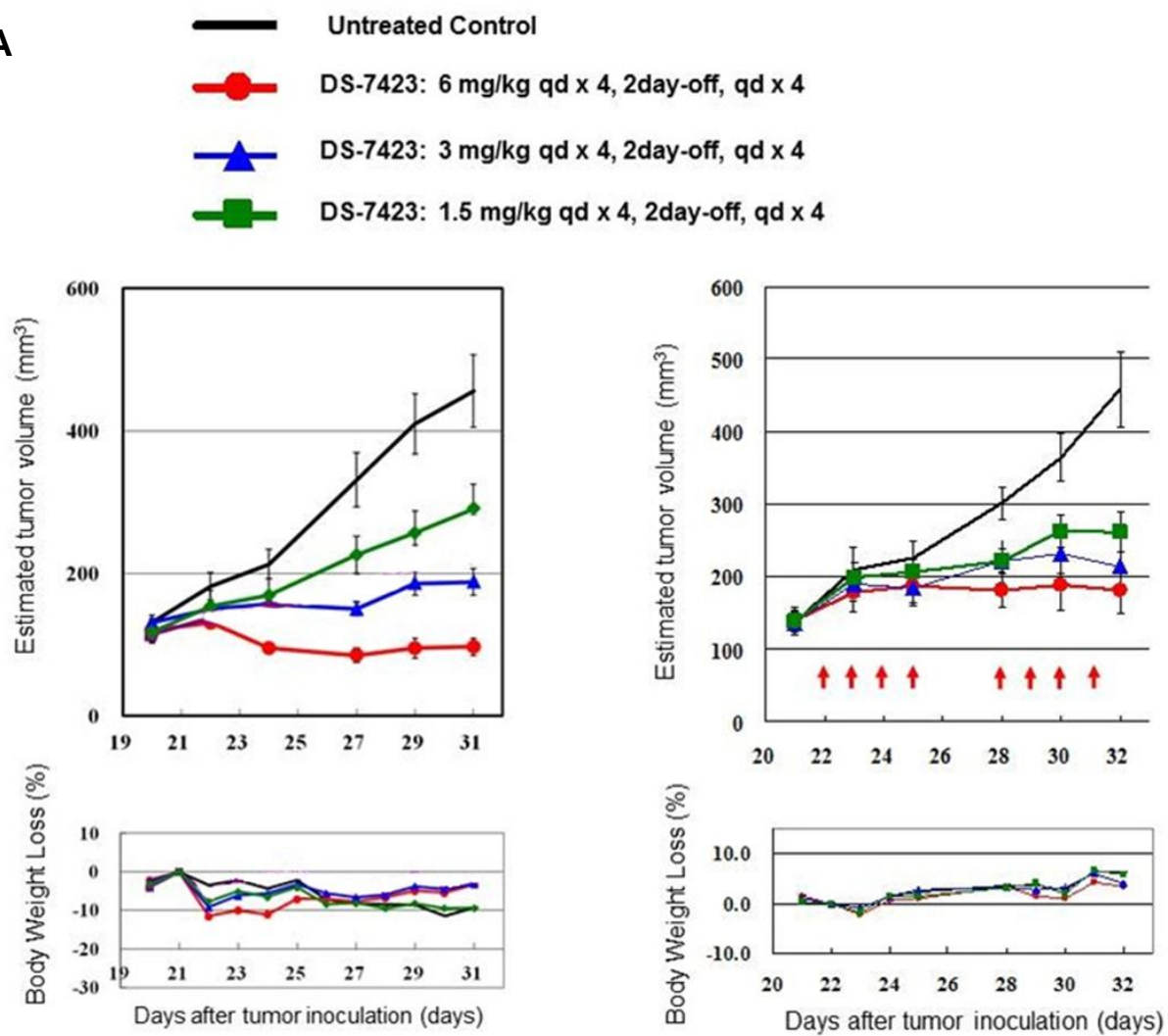
5. OCCA 細胞株を用いたヌードマウス皮下移植モデルにおける DS-7423 の抗腫瘍

効果

TOV-21 及び RMG-1 を用いた皮下移植モデルを作成したヌードマウスに DS-7423 を 1.5mg/kg～6mg/kg で連日経口投与し、その抗腫瘍効果を検討したところ、濃度依存的な抗腫瘍効果を示しコントロール群に比べて有意に腫瘍サイズが小さかった(図 9)。

DS-7423 投与により、いずれの群のマウスにおいても肉眼的に観察される有害事象はなく、10%以上の体重減少を含む明らかな合併症を認めなかった。(図 9)。

A



B

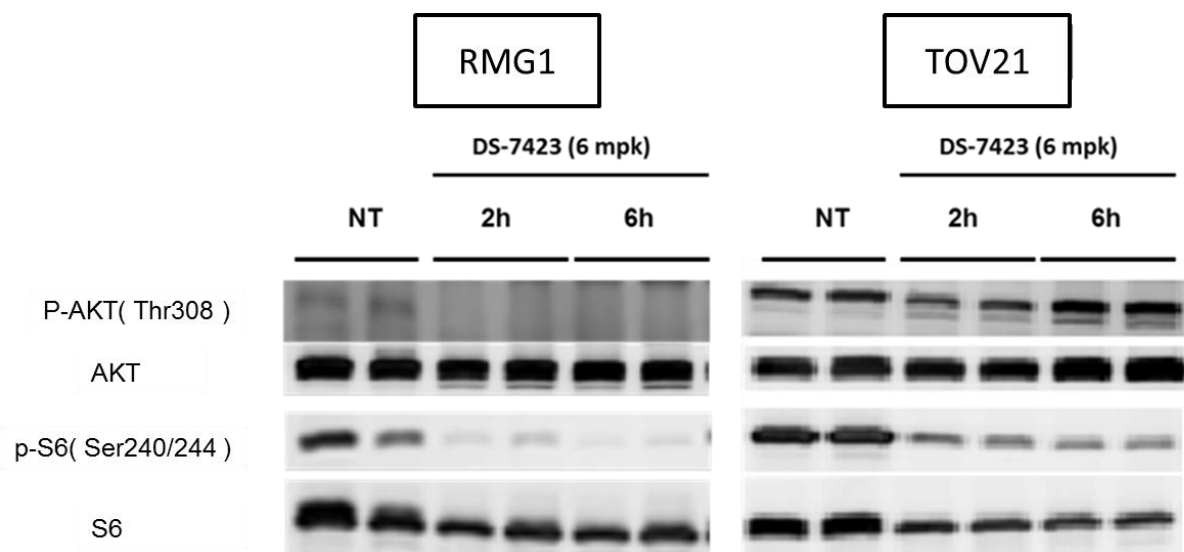


図9 RMG1 及び TOV21 を用いた皮下移植モデルにおける DS-7423 の抗腫瘍効果

A. 各群 5 匹ずつのマウスを用い、腫瘍サイズが全マウスで 100mm^3 を超えたところから DS-7423 を連日経口投与し、体重の推移・腫瘍サイズについて評価した。両細胞株において濃度依存的な腫瘍増殖抑制効果を認めた。10%以上の体重減少を含む明らかな有害事象は認められなかった。

B DS-7423 投与後 2 時間及び 6 時間後の腫瘍から抽出したタンパクを用いて western blotting を行い、シグナル抑制を確認した。RMG-1 及び TOV21 いずれの移植モデルにおいても、最終投与から 2 時間の時点で p-AKT (Thr308) 及び p-S6 (Ser240/244) の抑制を認めた。

6. DS-7423 による細胞周期への影響

DS-7423 による細胞周期への効果を Flow cytometry 法で解析した。ES-2 以外の全ての細胞株において、DS-7423 添加により濃度依存的に S 期の割合が減少した(図 10)。

G1 期細胞の比率の増加は 6 株 (OVTOKO、RMG1、SKOV3、TOV21、ES-2、JHOC9)

で認められた。Sub-G1 期細胞の濃度依存的増加は 9 株中 6 株(OVISE、OVMANA、

OVTOKO、JHOC7、RMG1、SKOV3)で認められた(図 10)。

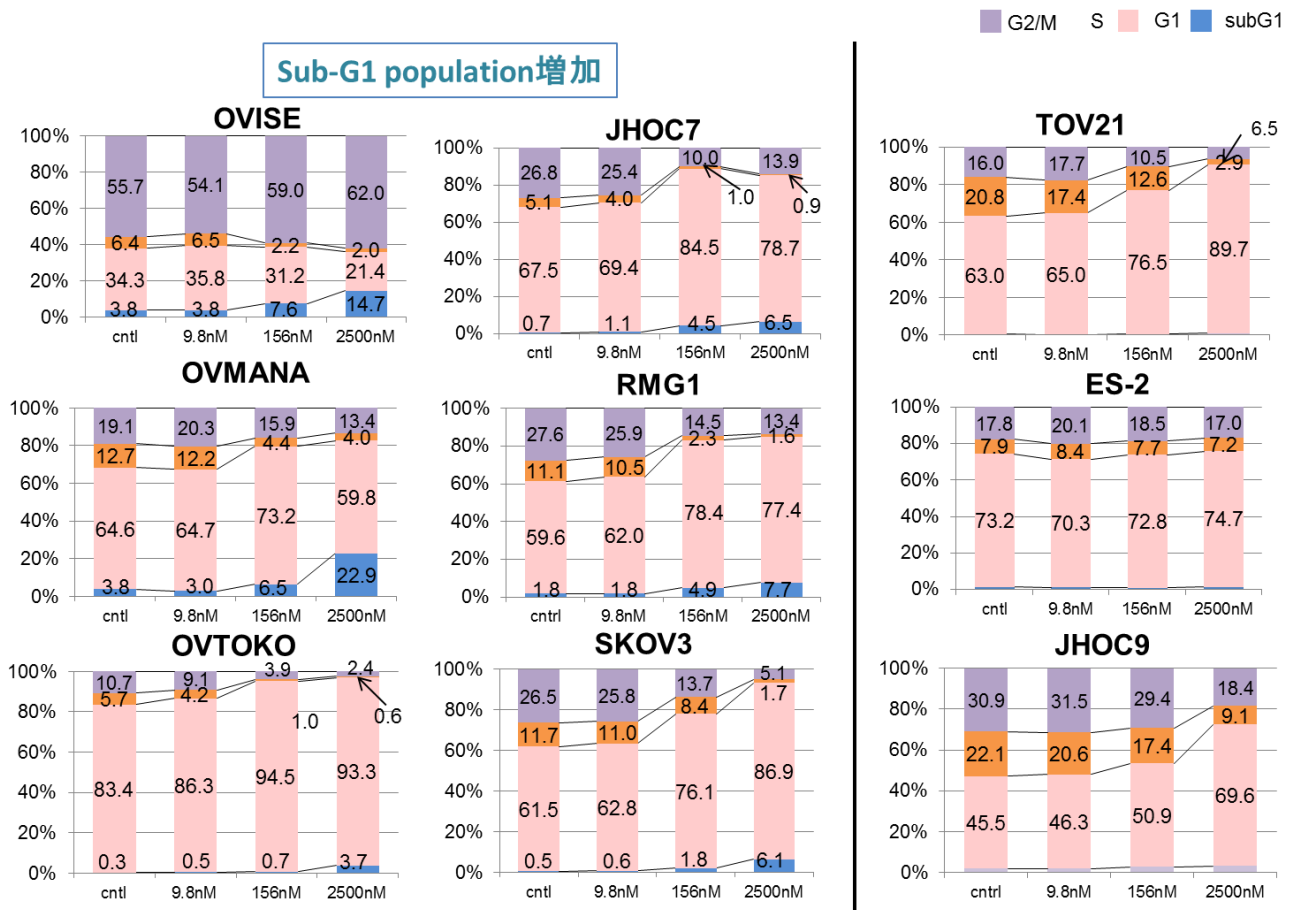


図 10 DS-7423 添加による細胞周期への影響

DS-7423 9.8nM, 156nM, 2500nM を添加した際の細胞周期への影響を FACS 法で評価した。ES-2 を除く 8 株で S 期の濃度依存的減少が認められた(グラフ内のオレンジ色)。左側 2 列の 6 株では濃度依存的な sub-G1 期細胞増加を認め (グラフ内の青色)、DS-7423 添加によりアポトーシスが誘導されている可能性が示唆された。

7. DS-7423 によるアポトーシス誘導能

OVISe 株に DS-7423 2500nM を添加した後、0 時間から 48 時間までの時間ごとに回収したタンパクを用いて western blotting を行った。図 11 A に示す通り、2 時間後から 24 時間後までの間 cleaved PARP が誘導されていることが分かった。次に、OVISe 株に 0nM-2500nM の DS-7423 を添加した後 8 時間でタンパクを回収し western blotting を行ったところ、39nM 以上で cleaved PARP の誘導が確認された(図 11B)。

続いて、OCCA 細胞株 9 株に DS-7423 156nM と 2500nM 添加処理したものに PI-Annexin V double staining を行い、FACS を用いてアポトーシス細胞の検出を行った。

全ての細胞株において 156nM 添加時と比較すると 2500nM 添加時の方がアポトーシス誘導率が高かった(図 11 C)。TP53 変異を有さない細胞株 6 株のうち 5 株では DS-7423

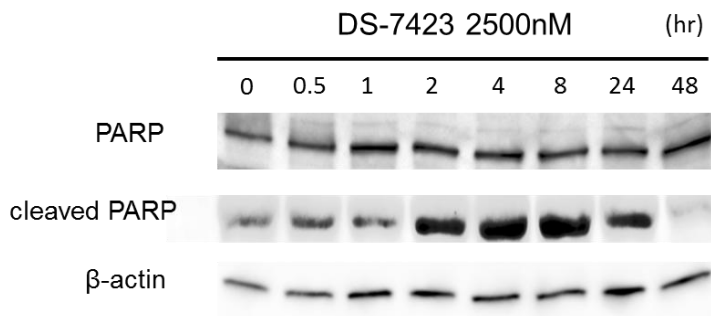
156nM 添加により 4% 以上のアポトーシス細胞が誘導された。これら 5 細胞株では、

DS-7423 2500nM 添加により 10~16% のアポトーシス細胞が誘導された(図 11 C)。

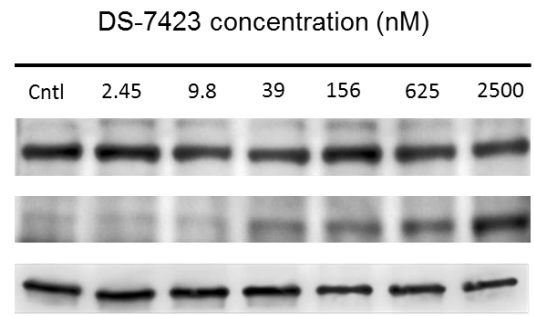
TP53 変異を有する 3 細胞株では、DS-7423 156nM と 2500nM どちらの濃度下において

も 5%以上のアポトーシス細胞が誘導されることはなかった。Student t 検定により、DS-7423 156nM、2500nM いずれの濃度においても、アポトーシス誘導率は *TP53* 変異を有さない株において優位に高いことが示された(156nM: $p=0.0352$ 、2500nM: $p=0.0368$) (図 11D)。

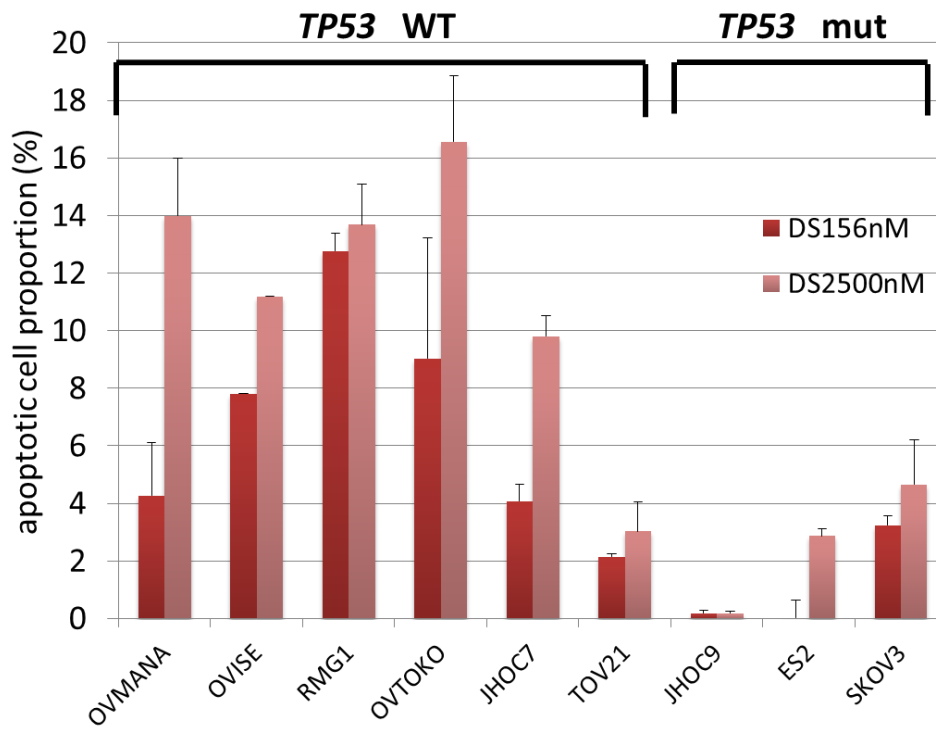
A OVISE



B



C



D

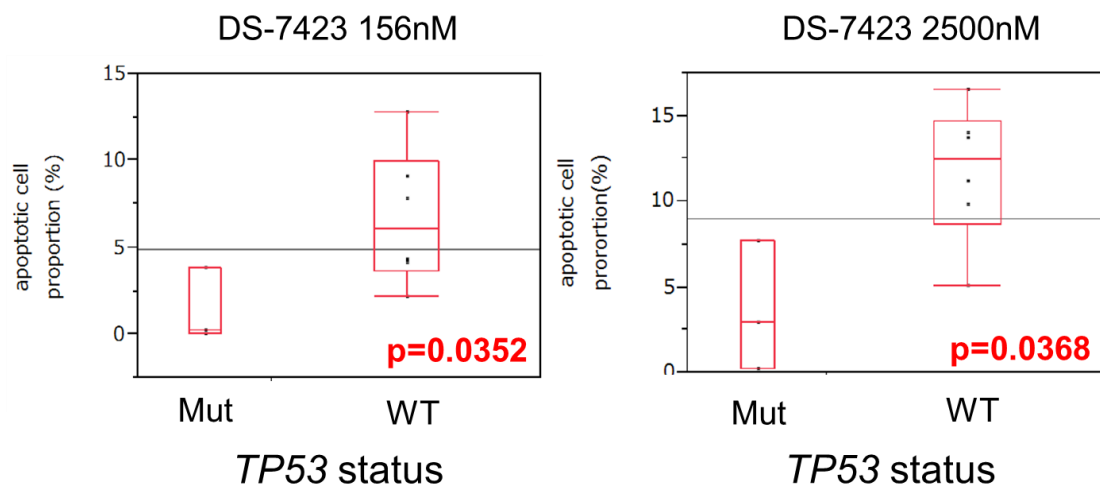


図 11 DS-7423 によるアポトーシス誘導

Wester blotting における cleaved PARP の誘導の確認、Annexin V-FITC 法によるアポトーシス細胞の同定により、DS-7423 によりアポトーシスが誘導されることを証明した。

A. OWISE 株に DS-7423 2500nM を添加すると、2 時間～24 時間後に cleaved PARP が誘導された。

B. OWISE 株に 0nM-2500nM の DS-7423 を添加すると、39nM 以上で cleaved PARP が誘導された。

C・D. OCCA 細胞株 9 株に DS-7423 156nM 及び 2500nM を添加しアポトーシス誘導率を測定したところ、全ての細胞株で 156nM 添加時に比較し 2500nM 添加時にはより多くのアポトーシス細胞が検出された。また、*TP53* 変異を有さない細胞株では、*TP53* 変異を有する細胞株と比較して有意にアポトーシス誘導率が高かった。

(156nM:p=0.0352, 2500nM:p=0.0368 by student t test)

Rapamycin を OCCA 細胞株に添加し、同様の測定を行ったところ、2500nM 添加時

においても誘導されたアポトーシス細胞は 5%以下であった。OWISE 株に 156nM 及び

2500nM の DS-7423 と Rapamycin を添加した際のアポトーシス誘導率を比較すると、

同濃度下では、DS-7423 添加時のほうが有意にアポトーシス誘導率が高かった(図 12)。

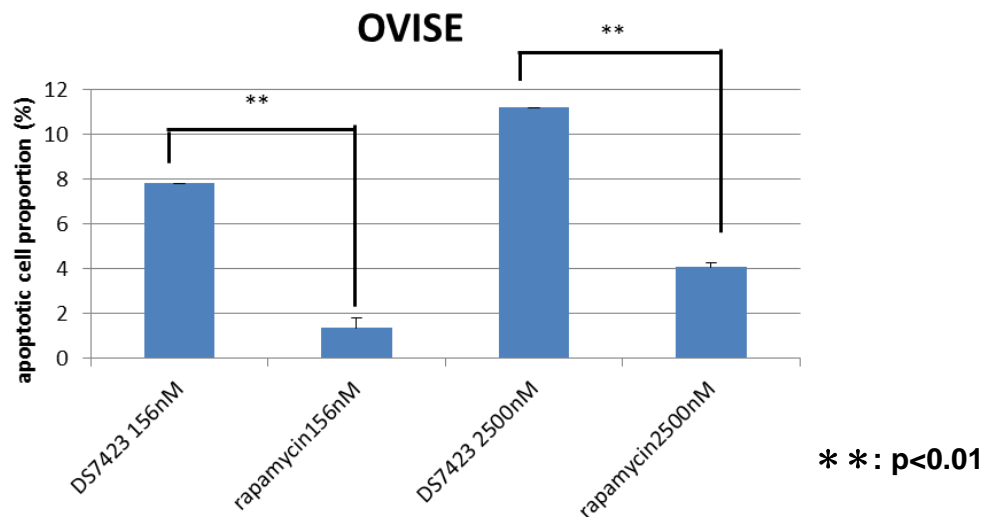


図 12 OVISE 株における DS-7423 と Rapamycin によるアポトーシス誘導率の比較

同濃度の DS-7423 と rapamycin におけるアポトーシス誘導率の比較を Annexin V-FITC 法により行った。156nM、2500nM いずれの濃度下においても Rapamycin に比べて DS-7423 のほうがアポトーシス誘導率が高いという結果が得られた。

8. DS-7423 による TP53 依存性アポトーシスの誘導

AKT の下流分子である MDM2 のリン酸化は MDM2 を活性化し、TP53 の活性を抑制する。よって、MDM2 のリン酸化が抑制されることにより、TP53 の活性化が引き起こされる。TP53 の Ser46 のリン酸化が惹起された場合には、TP53 依存性アポトーシスの誘導において重要な役割を果たすことが知られている(40)。western blotting 法

により、DS-7423 添加によって濃度依存的に MDM2 のリン酸化が抑制され、9.8nM 以上で phospho-TP53 (Ser46)のレベルが上昇していることが明らかになった(図 13 A)。

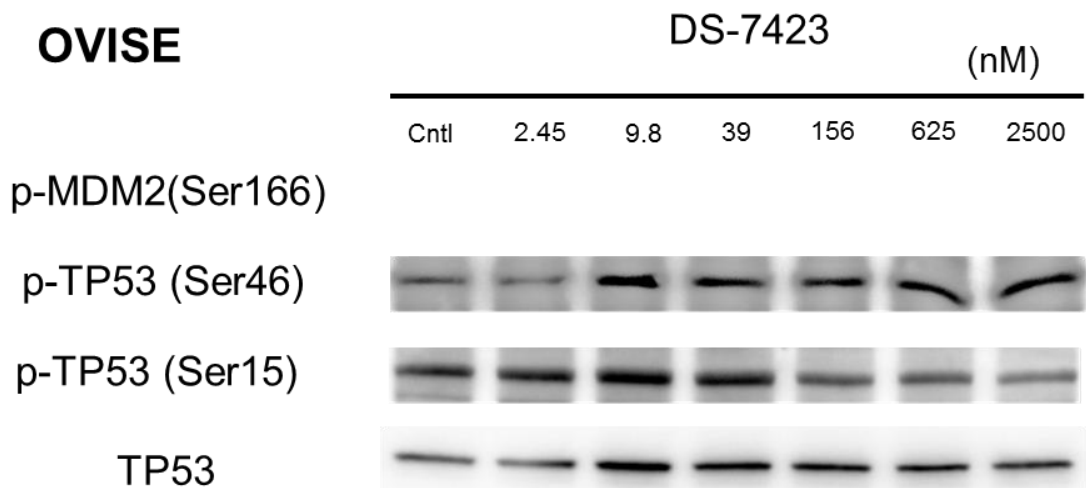
phospho-TP53 (Ser15)のレベルは細胞周期停止に関与するとされるが、156nM や 2500nM の高濃度の DS-7423 添加によっても上昇しなかった。

続いて半定量的 RT-PCR 法を行い、TP53 依存性アポトーシスにおける TP53 のターゲット遺伝子である *TP53AIP1*, *PUMA* の発現レベルの変化を解析した。ポジティブコントロールとしては、14Gy で照射した細胞を用いた。OVISE と OVMANA に 39nM、156nM、2500nM の DS-7423 を添加したところ、*TP53AIP1* と *PUMA* の発現レベルはいずれの濃度でもコントロール(DMSO でのみ処理)と比較して上昇していた(図 13 B)。

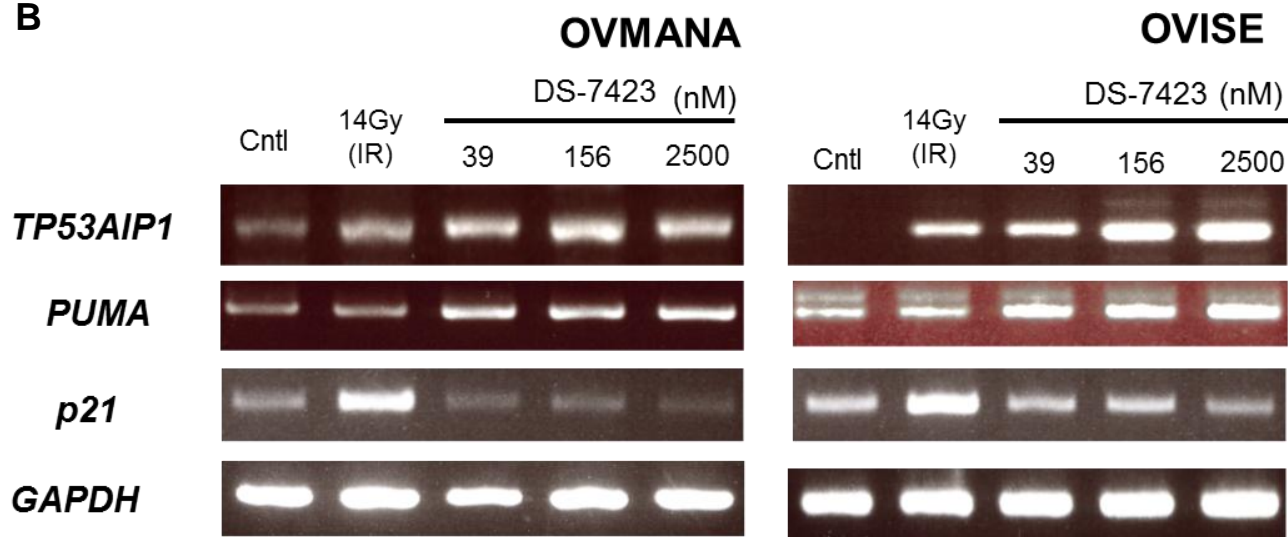
TP53AIP1 のバンドの濃度を半定量化し、コントロールの値と比較したところ、OVISE, OVMANA とともに DS-7423 添加時に有意に値が上昇し、DS-7423 添加により *TP53AIP1* が誘導されることが示された (図 13C)。TP53 による細胞周期停止にかかわるターゲット遺伝子の *p21* の発現も解析したところ、*p21* の発現は照射によっては誘導され

たものの、DS-7423 添加によってはいずれの濃度下でも誘導されなかった(図 13 B)。

A



B



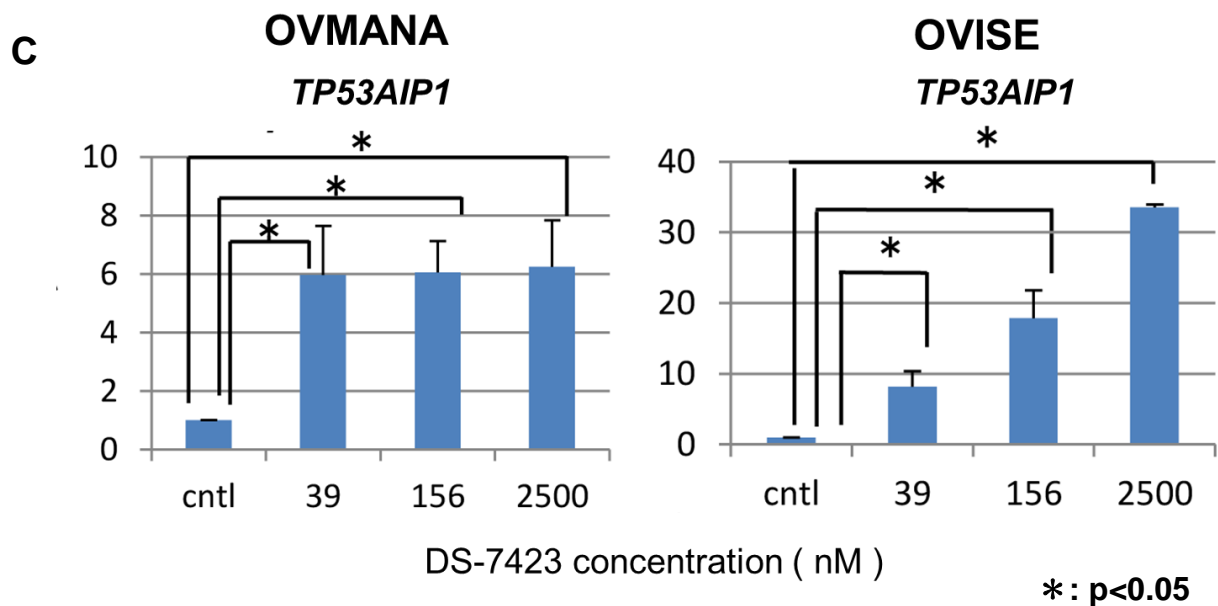


図 13 DS-7423 による TP53 依存性アポトーシスのターゲット遺伝子の発現

DS-7423 添加時に TP53 依存性アポトーシスにおける TP53 下流因子が活性化することを示すために、western blotting により TP53(Ser46)のリン酸化、RT-PCR 法により *TP53AIP1*, *PUMA* の誘導を確認した。

A. western blotting により DS-7423 添加時の TP53 のリン酸化レベルの変化を検討した。DS-7423 添加により 39nM 以上では phospho-TP53(Ser46)のリン酸化が認められた。phospho-TP53 (Ser15)の発現レベルには変化を認めなかった。

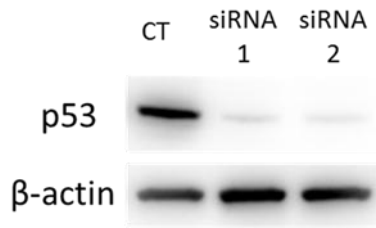
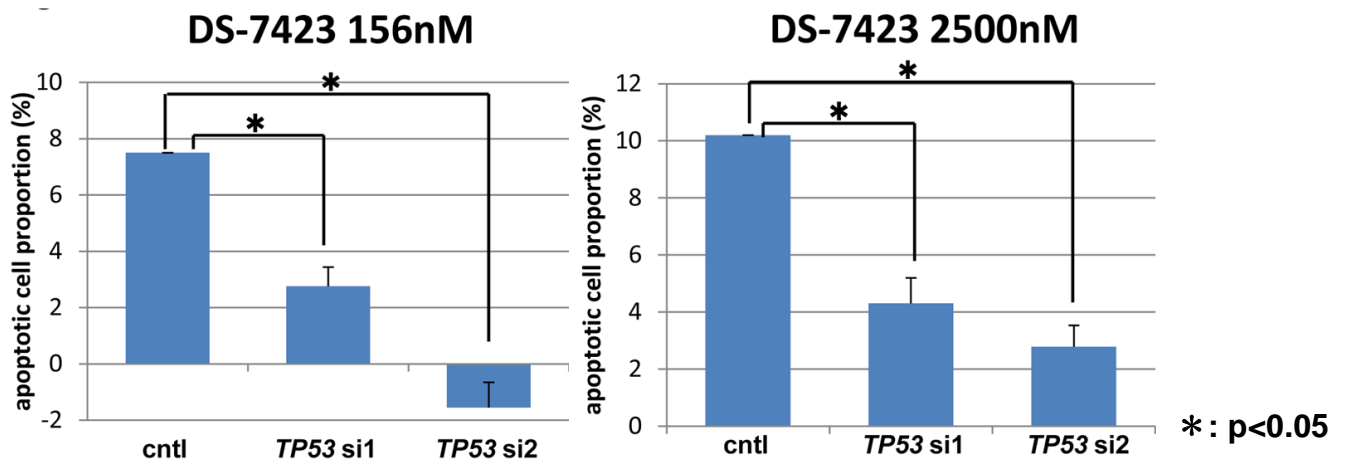
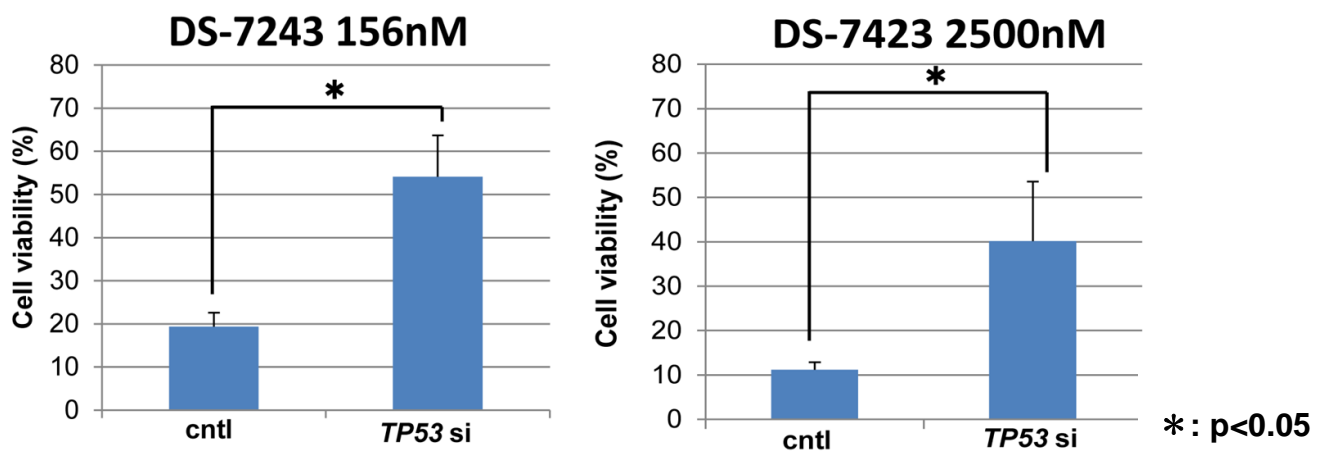
B. OVMANA と OVISe に DS-7423 を添加し、RT-PCR で TP53 依存性アポトーシスにおける TP53 のターゲット遺伝子である *TP53AIP1*、*PUMA* の発現レベルの変化を評価した。Positive control として 14Gy の照射細胞を用いた。DS-7423 添加により、*TP53AIP1* および *PUMA* の発現レベルが上昇した。p21 の発現は radiation では上昇したものの、DS-7423 添加によっては上昇しなかった。

C. B における *TP53AIP1* のバンドを Image J を用いて半定量化し、グラフ化した。OVMANA、OVISe とともに DS-7423 添加時に *TP53AIP1* の発現レベルは有意に増加した。

9. DS-7423 によるアポトーシス誘導における TP53 活性化

TP53 特異的な siRNA2 種類を用いて TP53 に変異を有さない OVISe 細胞の TP53 をノックダウンした条件下で DS-7423 156nM 及び 2500nM を添加し、48 時間後に Annexin V-PI 2 重染色によりアポトーシス誘導率を解析した western blotting にて、TP53 のノックダウン効率が 90%以上であることを確認した(図 14 A)。TP53 ノックダウン細胞ではいずれの濃度下でもアポトーシス誘導率が有意に低下した(図 14 B)。また同様に TP53 をノックダウンした細胞株に DS-7423 156nM、2500nM を添加し細胞増殖抑制効果を MTT assay で評価したところ、ノックダウンを行っていない細胞よりも有意に細胞増殖抑制効果が低下した (図 14C)。

次に、TP53 変異を有する OCCA 細胞株 ES-2 に pp53-TA-luc plasmid と TP53 をコードする plasmid を導入した上で DS-7423 を添加し、24 時間後に Luciferase assay を行った。TP53 の Luciferase 活性は、TP53 導入後では DS-7423 添加により有意に上昇した (図 14 D)。

A**B****OVISE****C****OVISE**

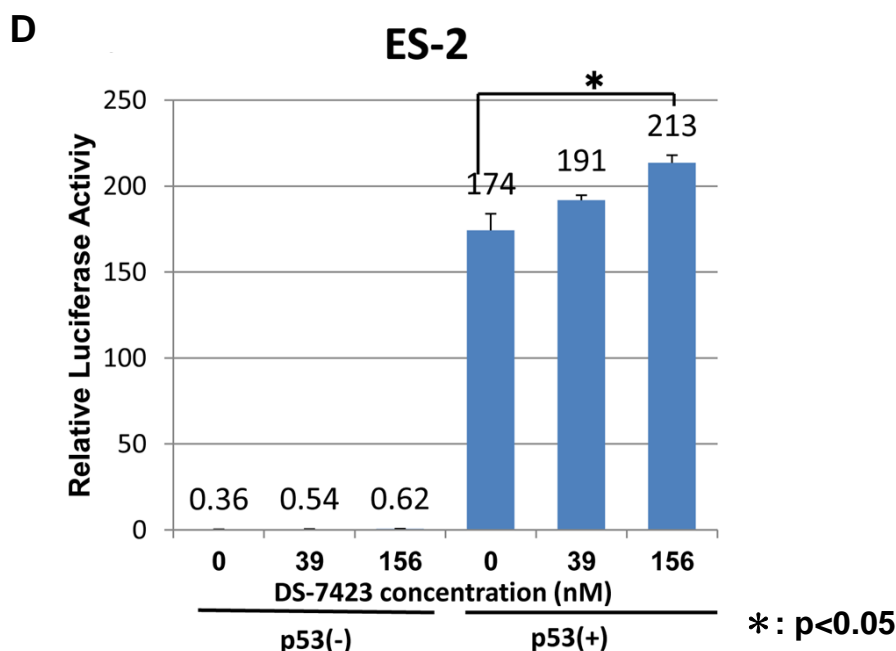


図 14 DS-7423 によるアポトーシス誘導における TP53 活性化の必要性

A. TP53 変異を有さない OVIS 株の TP53 を 2 種類の TP53siRNA によってノックダウンした。western blotting にて TP53 蛋白発現の低下が 90%以上であることが確認された。

B. A で TP53 をノックダウンした OVIS 株に DS-7423 156nM 及び 2500nM を添加しアポトーシス誘導率に変化が生じるか検討したところ、TP53 ノックダウン細胞では有意にアポトーシス誘導率が減少した。

C. A で TP53 をノックダウンした細胞に DS-7423 156nM 及び 2500nM を添加し、細胞増殖抑制能に差が生じるかを比較検討した。縦軸に細胞生存率を表す。TP53 ノックダウン細胞では有意に細胞増殖抑制能が低下した。

D. TP53 変異を有する ES-2 にプラスミドを用いて TP53 を導入した上で、DS-7423 を添加した際に TP53 の活性化が起こるかを確認するため、Luciferase assay を行った。TP53 の導入により TP53 転写活性は上昇し、さらに DS-7423 156nM 添加時には 0nM 添加時と比較し TP53 転写活性が有意に増加した。

第4章 考察

本研究では、OCCA 細胞株を用いて、以下の点に着目した。

①OCCA 細胞株における PI3K-AKT 経路の活性化因子の同定

②新規 PI3K/mTOR 同時阻害剤である DS-7423 の抗腫瘍効果 (rapamycin との比較検討)

③DS-7423 の in vivo での抗腫瘍効果

④DS-7423 によるアポトーシス誘導能

⑤DS-7423 の感受性を予測するバイオマーカーの同定

①OCCA 細胞株における PI3K-AKT 経路の活性化因子の同定

PIK3CA、*PTEN*、*K-Ras* 変異に加え、RTK についても各株で検討した。RTK において

もリン酸化が活性の指標となるが(40)、過剰発現が報告されている MET, HER2 におい

て、リン酸化レベルの上昇している株がそれぞれ2株、4株存在していることが明らか

となった。さらに、リン酸化 HER3 の上昇が6株にみられており、OCCA における活性

化 RTK の新たな因子である可能性が示された。また、MET の発現上昇を全株で認め、AKT の下流蛋白のリン酸化上昇も 7 株で認められた。この結果から、*PIK3CA* 変異の有無に関わらず、OCCA は RTK-PI3K-AKT 経路に依存して増殖を来している可能性が示唆された。

②新規 PI3K/mTOR 同時阻害剤である DS-7423 の抗腫瘍効果 (rapamycin との比較検討)

MTT アッセイでは、DS-7423 は OCCA 細胞株において濃度依存的な細胞増殖抑制効果を示すことが示された。9 株全てにおいて IC50 値は 75nM 以下であり、*PIK3CA* 変異の有無による効果の差は認められなかった。それに対し、卵巣漿液性腺癌 (OSA) 細胞株 7 株を用いた MTT アッセイでは 4 株においては $IC_{50} > 100nM$ と明らかに抗腫瘍効果が低かった。OCCA では PI3K-AKT 経路を活性化する *PIK3CA* の変異の率が 30-50% と高頻度であるのに対し、OSA では変異が低頻度であることが知られている。また、RTK の過剰発現についても OSA ではその頻度は低く、VEGF を標的としたベバシズマブの有効性

は示されているものの、HER2、EGFR の標的薬については臨床応用に至る可能性は低い。

Rapamycin 添加による腫瘍増殖抑制効果と比較すると 40nM 以上の高濃度域では

DS-7423 のほうが高い増殖抑制効果を示し、90% 近くの増殖を抑制し得た。Rapamycin

は高濃度域においても増殖抑制効果は 50% 程度に留まったことより、mTOR 単独阻害剤

に比べて、PI3K/mTOR 同時阻害剤のほうが mTOR 以外の AKT 下流も抑制することによ

り、強い腫瘍増殖抑制効果を発揮できる可能性が示された。western blotting での

Rapamycin による S6 のシグナル抑制が DS-7423 によるシグナル抑制よりも低濃度

(2.45nM) から確認されることにより、低濃度域では Rapamycin のほうが強い増殖抑制効

果を示すことは妥当と考えられる。Rapamycin のような rapalog (mTORC1 阻害剤) では

添加濃度を段階的に上昇させた際に抵抗性が現れることが報告されており、それには

様々な機序が関係していると考えられている。一つは、mTORC2 の活性化を通して AKT

(Ser473) のリン酸化が起こることであり、もう一つは insulin-like growth factor-1 receptor

(IGF-R1) などの negative feedback で RTK の活性化が引き起こされ、PI3K-AKT 経路の活

性化をかえって誘発し、mTOR 阻害剤の効果を相殺する可能性が報告されている

(43,44)。本研究内で施行した western blotting においても rapamycin 添加時には高濃度域で Foxo のリン酸化レベル上昇を認めており、これらの機序により rapamycin 添加による濃度依存性の抗腫瘍効果が得られなかったと考えられた。PI3K/mTOR 阻害剤による腫瘍増殖抑制効果が mTOR 単独阻害剤に比較して高いことは他の癌種でも報告されている(10, 12, 45)。OCCA では、mTOR 阻害剤の臨床試験が進行している。GOG (Gynecologic Oncology Group)-0268(NCT01196429) は、III-IV期 OCCA 症例に対する Carboplatin・Paclitaxel 併用療法に続く Temsirolimus 投与による維持療法に対する第2相臨床試験である(CCI-779)。本研究におけるデータは、DS-7423 などの PI3K/mTOR 同時阻害剤が mTOR 単独阻害剤と比較してより有効な治療法となりうる可能性を示唆している。今後、PI3K/mTOR 同時阻害剤を OCCA に絞って臨床試験を進めていき、mTOR 単独阻害剤との比較検討が必要といえる。

③in vivo における DS-7423 によるアポトーシス誘導

本研究では、OCCA 株を移植したマウスにおいて DS-7423 が腫瘍増大を有意に抑制することを明らかとした。現在ヒト固形がんでは実際に行われている DS-7423 の臨床試験結果が待たれる。実際のヒト癌への投与においては、Phase I で設定された投与量で、十分に標的タンパクのリン酸化が抑制されているか、マウスとは異なる有害事象がでないか、といった課題がある。しかしながら、今回の結果により OCCA が DS-7423 の臨床試験を進めるうえで、有力な候補の癌腫であることが示唆された。

④アポトーシスの関与についての検討

Annexin V -PI 2 重染色によるアポトーシス細胞検出と western blotting による cleaved PARP 誘導の確認により、OCCA において DS-7423 添加によりアポトーシスが引き起こされることが示された。また DS-7423 添加時と比較して rapamycin 添加によるアポトーシス誘導率はどの OCCA 細胞株においても有意に低いことが分かった。この結果より、

mTOR 以外の AKT 下流分子がアポトーシス誘導に関与しているとの仮説が立てられた。

AKT 下流分子である MDM2 のシグナルが抑制されることによって TP53 は活性化する。

AKT を介した MDM2 のリン酸化は、MDM2 と p19ARF の結合を阻害することによって

TP53 の分解を促進し、その活性を制御している(46, 47)。 western blotting で示した通

り、DS-7423 は MDM2 の Ser166 のリン酸化を濃度依存的に抑制した。さらに DS-7423

添加により TP53 Ser15 のリン酸化レベルに変化はなかったが、Ser46 のリン酸化レベル

は上昇した。TP53 依存性アポトーシスにおいては Ser46 のリン酸化がその下流シグナル

の活性化において重要な役割を果たしているということが知られている。半定量的

RT-PCR 法では、DS-7423 添加によって TP53 依存性アポトーシスにおける TP53 のター

ゲット遺伝子である TP53AIP1 及び PUMA の発現レベルが上昇することが分かった(42,

48-50)。この結果により、OCCA における DS-7423 によるアポトーシス誘導には、TP53

の活性化が関わっていると結論づけられる。しかし、TP53 変異を有する細胞株において

も、低率ではあるが DS-7423 によりアポトーシスが引き起こされており、FOXO のよう

な他の Akt 下流タンパクがアポトーシス誘導に関わっている可能性がある。western

blotting 法では、DS-7423 添加により、濃度依存的に FOXO1/3a のリン酸化抑制が起こる

ことが示された。FOXO は Akt 下流タンパクであり、細胞生存とアポトーシスにおいて

重要な役割を担うことが知られている(51)。FOXO は Akt からのシグナルが抑制され

ることで脱リン酸化し、核内へ移行することで細胞生存に関わる BCL2 ファミリー遺伝

子である Bim や Mcl-1 に作用する(52, 53)。また、FOXO のユビキチン化と分解には

MDM2 が関与している(54)。FOXO の DS-7423 によるリン酸化抑制は TP53 変異の有

無に関わらず、ほとんどアポトーシスが誘導されない JHOC9 株でも認められていること

と、遺伝子サイレンシングにおいて TP53 をノックダウンした細胞では DS-7423 による

アポトーシス誘導が有意に低下することから、DS-7423 によるアポトーシス誘導には

TP53 変異の有無が重要であると考えられるが、FOXO などの様々な Akt 下流因子が

DS-7423 にどのように関わってくるのかを明らかにしていくことは今後の課題といえる。

⑤DS-7423 の感受性を予測するバイオマーカーの同定

分子標的治療におけるバイオマーカーを明らかにする上で、PI3K/mTOR 経路の活性化に関わる分子の役割を明らかにすることは重要である。*PIK3CA* の変異の有無及び HER2 の過剰発現は乳癌において有用なバイオマーカーであることが報告されている(55, 56)。癌遺伝子 *Ras* の変異の有無は、多くの種類の癌において既存の治療に対する耐性を推測するバイオマーカーとして役立っている(57)。これらの既知のバイオマーカー *PIK3CA*、HER2、*Ras* は全て RTK/Ras/PI3K シグナル経路そのものを構成する分子である。本研究においては、*PIK3CA* の変異の有無の他、いかなる PI3K を活性化するような因子の有無も OCCA に対する DS-7423 の腫瘍細胞増殖抑制効果に影響を与えなかった。OCCA ではこの経路を活性化するような因子が多種に渡り存在していることが一因と考えられる。また、OSA 細胞株では DS-7423 に抵抗性を示す株が半数以上もあったことから、OCCA 自体が DS-7423 におけるよい治療ターゲットとなりうると考えられる。

現在までのところ、PI3K-AKT 経路を阻害する分子標的薬によりアポトーシス誘導が可能か、またそれに関わる重要な分子が何であるかは十分に研究されてはいない。これまで、増殖シグナル系をターゲットとする分子標的治療薬は殺細胞的効果よりも静細胞的効果がメインであるとされてきたが、本研究では、DS-7423 によりアポトーシスが誘導されることを示した。アポトーシス誘導能の観点からバイオマーカーについて検討すると、TP53 変異を有する細胞株と比較して、TP53 変異を有さない細胞株では DS-7423 添加により有意に高率にアポトーシスが誘導されたことにより、TP53 変異の有無は DS-7423 添加によるアポトーシス誘導効果におけるバイオマーカーとなりうると考えられた。これは他癌腫においても、TP53 が野生型で、PI3K-AKT 経路が活性化している場合に応用できる可能性がある。OCCA における TP53 の変異率は約 10%程度と報告されており(16)、卵巣癌における他の組織型と比較しても最も低い(58)。よって、OCCA は DS-7423 による殺細胞作用が期待できる癌種といえる。今後の課題としては、アポトーシスの誘導効率を高めることが可能か、という点が挙げられる。本研究ではアポト

シス細胞の比率は、高濃度でも 16%までであり、ヒトへの至適投与量では、アポトーシスが十分に誘導されない可能性がある。抗がん剤を含めて、他の薬剤との併用等により、DS-7423 によるアポトーシス誘導能の増強を図ることが臨床応用上必要となる可能性がある。

現在本邦においては、卵巣癌に対し臨床応用されている分子標的薬は血管新生阻害剤ベバシズマブのみである。OCCA は従来の抗癌剤治療へ抵抗性を示すことから新規治療選択肢の開発が期待されている。また、OCCA はアジア人、特に日本人に多い組織型であり、本邦において研究・臨床試験をリードしていく必要がある。本研究において、上記①～⑤までの検討の通り、OCCA では PI3K-AKT 経路が恒常的活性化を来している頻度が高いため、PI3K/mTOR 同時阻害剤により増殖抑制効果が期待できる。また、TP53 の変異率が低いためアポトーシスを誘導しさらなる抗腫瘍効果も得られる可能性のある

癌種である。以上より OCCA は PI3K/mTOR 同時阻害剤のよいターゲットとなりうる可

能性が示された。今後のさらなる臨床試験への発展と臨床への応用が期待される。

結論

今回、卵巣明細胞腺癌(OCCA)細胞株において、PI3K-AKT 経路はさまざまな因子により活性化されており、この経路に依存した増殖を来している可能性が高いことが示された。これをもとに、新規 PI3K/mTOR 同時阻害剤 DS-7423 の抗腫瘍効果を検討したところ、使用した 9 株全ての OCCA 細胞株において濃度依存的なシグナル抑制を示し、腫瘍増殖抑制効果が得られた。DS-7423 は rapamycin に比べ高濃度において、より強い抗腫瘍効果を示したことより、mTOR 単独阻害のみでなく、PI3K/mTOR を同時に阻害することが重要であると考えられる。また、高濃度の DS-7423 により一部の細胞株においてアポトーシスが誘導され、TP53 変異を有する細胞株と比較し TP53 変異を有さない細胞株では有意にアポトーシス誘導率が高かった。アポトーシスが誘導された細胞においては TP53 の下流分子の活性化が示され、TP53 変異の有無は DS-7423 におけるバイオマーカーとなりうる。OCCA の TP53 変異率は低いため、DS-7423 を含む PI3K/mTOR 同時阻害剤は、OCCA に対する有望な治療選択肢の 1 つとなりうる

可能性が示された。

参考文献

1. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme.

Oncogene; 27(41) :5497–510, 2008

2. Jia S, Liu Z, Zhang S, Liu P, Zhang L, Lee SH, et al. Essential roles of PI(3)K-p110beta in

cell growth, metabolism and tumorigenesis. Nature; 454(7205) :776–9, 2008

3. Wee S, Wiederschain D, Maira SM, Loo A, Miller C, deBeaumont R, Stegmeier F, et al.

PTEN-deficient cancers depend on PIK3CB. Proc Natl Acad Sci USA; 105(35) :13057–62,

2008

4. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer,

diabetes and ageing. Nat Rev Mol Cell Biol; 12(1) :21–35, 2011

5. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations.

Nat Rev Cancer; 9(8) :550–62, 2009

6. Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. Nat Rev Cancer;

6(9) :729–34, 2006

7. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*; 12(1) :9–22,

2007

8. Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes

translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*;

98(20) :11598–603, 2001

9. Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, 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(7) :1851–63, 2008

10. Serra V, Markman B, Scaltriti M, Eichhorn PJ, Valero V, Guzman 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(19) :8022–30, 2008

11. Cao P, Maira SM, Garcia Echeverria C, Hedley DW. Activity of a novel, dual PI3-kinase/mTor inhibitor NVP-BEZ235 against primary human pancreatic cancers grown as orthotopic xenografts. *Br J Cancer*; 100(8) :1267–76, 2009
12. Shoji K, Oda K, Kashiya T, Ikeda Y, Nakagawa S, Sone K, et al. Genotype-dependent efficacy of a dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, and an mTOR inhibitor, RAD001, in endometrial carcinomas. *PLoS One*; 7(5) :e37431, 2012
13. Anglesio MS, Carey MS, Kobel M, Mackay H, Huntsman DG. Clear cell carcinoma of the ovary: A report from the first Ovarian Clear Cell Symposium, June 24th, Gynecol Oncol 2010. *Gynecol Oncol*; 121(2) :407–15, 2011
14. Takano M, Tsuda H, Sugiyama T. Clear cell carcinoma of the ovary: is there a role of histology-specific treatment? *J Exp Clin Cancer Res*; 31(6) :53, 2012
15. The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*; 474(7353) :609–15, 2011

16. Ho ES, Lai CR, Hsieh YT, Chen JT, Lin AJ, Hung MH, et al. p53 mutation is infrequent in clear cell carcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol*; 80(2) :189–93, 2001
17. Kuo KT, Mao TL, Jones S, Veras E, Ayhan A, Wang TL, et al. Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol*; 174(5):1597–601, 2009
18. Munksgaard PS, Blaakaer J: The association between endometriosis and ovarian cancer: a review of histological, genetic and molecular alterations. *Gynecol Oncol*; 124(1) :164–9, 2012
19. Fujimura M, Katsumata N, Tsuda H, Uchi N, Miyazaki S, Hidaka T, et al. HER2 is frequently over-expressed in ovarian clear cell adenocarcinoma: possible novel treatment modality using recombinant monoclonal antibody against HER2, trastuzumab. *Jpn J Cancer Res*; 93(11) :1250–7, 2002
20. Yamamoto S, Tsuda H, Miyai K, Takano M, Tamai S, Matsubara O. Gene amplification and protein overexpression of MET are common events in ovarian clear-cell adenocarcinoma:

their roles in tumor progression and prognostication of the patient. *Mod Pathol*;

24(8) :1146–55, 2011

21. Yamamoto S, Tsuda H, Miyai K, Takano M, Tamai S, Matsubara O. Accumulative copy

number increase of MET drives tumor development and histological progression in a subset of

ovarian clear-cell adenocarcinomas. *Mod Pathol*; 25(1) :122–30, 2012

22. Heitz F, Harter P, Barinoff J, Beutel B, Kannisto P, Grabowski JP, du Bois A, et al.

Bevacizumab in the treatment of ovarian cancer. *Adv Ther*; 29(9):723-35, 2012

23. Shaw D, Clamp A, Jayson GC. Angiogenesis as a target for the treatment of ovarian cancer.

Curr Opin Oncol; 25(5) :558-65, 2013

24. Dhillon S. Bevacizumab combination therapy: a review of its use in patients with

epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer. *BioDrugs*; 27(4):375-92,

2013

25. ICON7 Investigators. A Phase 3 Trial of Bevacizumab in Ovarian Cancer. *N Engl J Med*;

365(26) :2484-96, 2011

26. Kaye SB, Lubinski J, Matulonis U, Ang JE, Gourley C, Carmichael J, Kaufman B, et al.

Phase II, open-label, randomized, multicenter study comparing the efficacy and safety of

olaparib, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, and pegylated liposomal doxorubicin in

patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer. J Clin Oncol;

30(40) :372-9, 2012

27. Gelmon KA, Tischkowitz M, Carmichael J, Oza A, 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(9):852-61, 2011

28. Mabuchi S, Hisamatsu T, Kimura T. Targeting mTOR signaling pathway in ovarian

cancer. Curr Med Chem; 18(19):2960-8, 2011

29. Mabuchi S, Altomare DA, Hamilton TC, Testa JR, et al. RAD001 (Everolimus) delays

tumor onset and progression in a transgenic mouse model of ovarian cancer. *Cancer Res*;

67(6):2408-13, 2007

30. Miyazawa M, Yasuda M, Mikami M, Osamura RY, et al. Therapeutic strategy targeting

the mTOR-HIF-1 α -VEGF pathway in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Pathol Int.*;

59(1):19-27, 2007

31. Hirasawa T, Miyazawa M, Muramatsu T, Mikami M, et al. Alterations of

Hypoxia-Induced Factor Signaling Pathway Due to Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)

Suppression in Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma: In Vivo and in Vitro Explorations for

Clinical Trial. *Int J Gynecol Cancer.*; 23(7) :1210-8, 2013

32. Takano M, Kikuchi Y, Kudoh K, Goto T, Furuya K, Kikuchi R, et al. Weekly

administration of temsirolimus for heavily pretreated patients with clear cell carcinoma of the

ovary: a report of six cases. *Int J Clin Oncol*; 16(5) :605–9, 2011

33. Janku F, Wheler JJ, Westin SN, Lu KH, Kurzrock R, et al. PI3K/AKT/mTOR inhibitors

in patients with breast and gynecologic malignancies harboring PIK3CA mutations. *J Clin*

Oncol; 30(8) :777-82, 2012

34. Shaw TJ, Senterman MK, Dawson K, Crane CA, Vanderhyden BC. Characterization of

intraperitoneal, orthotopic, and metastatic xenograft models of human ovarian cancer. *Mol*

Ther; 10(6) :1032–42, 2004

35. Hirota Y, Sato K, Shiose Y et al. Anti-Tumour Efficacy Profile of a Novel Dual

PI3K/mTOR Inhibitor, DS-7423. The 24th AACR-NCI-EORTC International Conference on

Molecular Targets and Cancer Therapeutics. 6-9 November 2012, Dublin, Ireland.

36. Bono Y, Kyo S, Takakura M, Maida Y, Mizumoto Y, Nakamura M, et al. Creation of

immortalised epithelial cells from ovarian endometrioma. *Br J Cancer*; 106(6) :1205–13,

2012

37. Minaguchi T, Yoshikawa H, Oda K, Ishino T, Yasugi T, Onda T, 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(9) :2636–42, 2001

38. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. Science; 304(5670):554, 2004

39. Oda K, Stokoe D, Taketani Y, McCormick F. High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. Cancer Res; 65(23) :10669–73, 2005

40. Oda K, Okada J, Timmerman L, Rodriguez Viciano P, Stokoe D, Shoji K, et al. PIK3CA cooperates with other phosphatidylinositol 3' -kinase pathway mutations to effect oncogenic transformation. Cancer Res; 68(19) :8127–36, 2008

41. Nakagawa S, Yoshikawa H, Jimbo H, Onda T, Yasugi T, Matsumoto K, et al. Elderly Japanese women with cervical carcinoma show higher proportions of both intermediate-risk human papillomavirus types and p53 mutations. Br J Cancer; 79(7-8):1139–44, 1999

42. Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, et al. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated

p53. Cell; 102(6) :849–62, 2000

43. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. Cancer Res; 66(3) :1500–8, 2006

44. Wan X, Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman LJ. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. Oncogene; 26(13) :1932–40, 2007

45. Cho DC, Cohen MB, Panka DJ, Collins M, Ghebremichael M, Atkins MB, et al. The efficacy of the novel dual PI3-kinase/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 compared with rapamycin in renal cell carcinoma. Clin Cancer Res; 16(14) :3628–38, 2010

46. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. Nature; 387(6630) :296–9, 1997

47. Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki T, Tanaka K, et al. Akt enhances

Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Biol Chem*; 277(24) :21843–50,

2002

48. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol*

Cell; 7(3) :683–94, 2001

49. Matsuda K, Yoshida K, Taya Y, Nakamura K, Nakamura Y, Arakawa H. p53AIP1 regulates

the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Res*; 62(10) :2883–9, 2002

50. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*;

137(3):413–1,2009

51. Fu Z, Tindall DJ. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene*; 27(16) :2312–9,

2008

52. Rahmani M, Anderson A, Habibi JR, Crabtree TR, Mayo M, Harada H, et al. The

BH3-only protein Bim plays a critical role in leukemia cell death triggered by concomitant

inhibition of the PI3K/Akt and MEK/ERK1/2 pathways. *Blood*; 114(20) :4507–16, 2009

53. Letai A. Growth factor withdrawal and apoptosis: the middle game. *Mol Cell*;

21(6):728–30, 2006

54. Fu W, Ma Q, Chen L, Li P, Zhang M, Ramamoorthy S, et al. MDM2 acts downstream of

p53 as an E3 ligase to promote FOXO ubiquitination and degradation. *J Biol Chem*;

284(21):13987–4000, 2009

55. She QB, Chandarlapaty S, Ye Q, Lobo J, Haskell KM, Leander KR, et al. Breast tumor

cells with PI3K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to Akt signaling.

PLoS One; 3(8):e3065, 2008

56. O'Brien C, Wallin JJ, Sampath D, GuhaThakurta D, Savage H, Punnoose EA, et al.

Predictive biomarkers of sensitivity to the phosphatidylinositol 3' kinase inhibitor GDC-0941

in breast cancer preclinical models. *Clin Cancer Res*; 16(14):3670–83, 2010

57. Ihle NT, Lemos R Jr, Wipf P, Yacoub A, Mitchell C, Siwak D, 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(1):143–50,

2009

58. Petitjean A, Achatz MI, Borresen Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes.

Oncogene; 26(15) :2157–65, 2007

謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導・ご協力いただきました、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、武谷雄二元教授、上妻志郎元教授、矢野哲元准教授、織田克利講師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川名敬先生、平池修先生、谷川道洋先生、庄司恵子先生、池田悠至先生、宮坂亜希先生、神尊貴裕先生、稲葉可奈子先生、福田友彦先生、牧井千波先生、栗川玲子さんに心より御礼申し上げます。