

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 檜山 智子

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、多癌種で活性化していることが知られている。チロシンキナーゼ受容体(RTK)の下流に位置するこのシグナル経路は、AKT 下流の分子である mTOR や FOXO、GSK3 $\beta$  の活性化を介して細胞増殖や蛋白合成、細胞生存に関与する。また、AKT 下流の MDM2 は TP53 と結合しその活性を抑制している。PI3K-AKT 経路の活性化は PI3K の触媒サブユニットをコードする遺伝子 *PIK3CA* の活性型変異、PI3K に抑制的に働く *PTEN* の不活性化型変異、この経路の上流に位置する RTK の過剰発現などにより起こる。PI3K-AKT 経路をターゲットとした分子標的治療薬が多数開発され、臨床試験が施行されている。本邦では、腎細胞癌に対して mTOR 阻害剤が臨床応用されている。卵巣癌は女性の癌関連死の 7 番目となる悪性腫瘍で、その中でも卵巣明細胞腺癌( OCCA )はプラチナ製剤耐性を示し、早期に再発を来たす症例が少なくない。OCCA はアジア人で発症率が高く、中でも日本人は全卵巣癌組織型の 25% を占める。卵巣癌は組織型により分子生物学的特徴が異なる。卵巣漿液性腺癌( OSA )ではほぼ 100% に *TP53* の変異を認めるのに対し、OCCA ではその変異率は 10% 程度と低い。逆に OSA では *PIK3CA* の変異は低率であるのに対し、OCCA では 40% と高頻度であることが知られている。さらに OCCA では HER2 や MET といった RTK の過剰発現もそれぞれ 30% 程度と報告されているため、OCCA は PI3K 経路阻害剤のよいターゲットとなる可能性がある。本研究では OCCA 細胞株を用い、OCCA において PI3K-AKT 経路の活性化が高頻度であることを示した上で、OCCA に対する PI3K/mTOR 同時阻害剤 DS-7423 の腫瘍増殖抑制効果及びアポトーシス誘導効果を検討

する。また、抗腫瘍効果及びアポトーシス誘導能を予測するバイオマーカーを探索することを目的とする。

初めに、OCCA 細胞株 9 株について *PIK3CA*、*Kras*、*PTEN*、*TP53* の遺伝子異常の有無を検索した。9 株中 4 株に *PIK3CA* 変異(変異率 44%)を認めた。TOV21G 株にのみ *PIK3CA* 変異に加え *Kras* と *PTEN* の変異を認めた。*TP53* 変異は 3 株に認められた。OCCA 細胞株から抽出したタンパクを用いて western blotting を行い PI3K-AKT 経路に関わる分子のリン酸化レベルを評価したところ、AKT のリン酸化レベル(Thr-308)上昇を 9 株中 7 株で認めた。*PIK3CA* の変異の有無に関わらず、AKT 及びその下流分子である FOXO や mTOR のリン酸化レベルは広範囲に上昇していた。上流の RTK では、HER2 または HER3 のリン酸化レベル上昇は 8 株に認められた。MET の発現は 9 株全てにおいて上昇しており、うち 2 株でリン酸化 cMET の発現レベルが著明に上昇していた。*PIK3CA* 変異を有さない株においても RTK を含む様々な因子により PI3K-AKT 経路が活性化しており、OCCA においては *PIK3CA* 変異の有無に関わらずこの経路に依存して増殖を来している率が高いと考えられた。

OCCA 細胞株 9 株に PI3K/mTOR 同時阻害剤 DS-7423 と mTOR 単独阻害剤 rapamycin を濃度を振って添加し、72 時間後の細胞生存率を計測し細胞増殖抑制曲線を作成した。全ての細胞株において、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、rapamycin では濃度依存的な増殖抑制効果が弱く、高濃度においても 50-60%の抑制であった。一方、DS-7423 は高濃度では全細胞株で 85%以上の増殖抑制効果を示した。DS-7423 及び rapamycin を OCCA 細胞株に添加して蛋白を回収し、Western blotting を施行したところ、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。また mTOR 以外の AKT の下流因子 ( FOXO1/3a, MDM2 ) のリン酸化レベルも濃度依存的に抑制した。Rapamycin は低濃度より S6 のリン酸化を抑制したが、高濃度においても 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。DS-7423 による細胞周期への効果を Flow cytometry 法で解析すると、DS-7423

により S 期の割合が減少した。Sub-G1 期細胞の濃度依存的増加は 9 株中 6 株で認められ、アポトーシスの誘導が認められた。卵巣明細胞腺癌( OSA )細胞株 7 株において DS-7423 を添加し増殖抑制効果を検討したところ、OCCA では OSA に比し、有意に感受性が高かった。

ヌードマウス皮下移植モデルを用い、OCCA に対する in vivo での抗腫瘍効果を、DS-7423 連日経口投与 (1.5~6mg/kg) にて検討したところ、濃度依存的な腫瘍増殖抑制効果を示した。

OVICE 株に DS-7423 を添加した後回収したタンパクを用いて western blotting を行ったところ、39nM 以上、添加後 2 時間から 24 時間で cleaved PARP が誘導された。OCCA 細胞株 9 株に DS-7423 156nM と 2500nM 添加処理したものに PI-Annexin V 2 重染色を行い、FACS を用いてアポトーシス細胞の検出を行った。DS-7423 156nM、2500nM いずれの濃度においても、*TP53* 変異を有さない株では *TP53* 変異株と比較してアポトーシス誘導率が有意に高いことが示された。OVICE 株に同濃度の DS-7423 と Rapamycin を添加した際のアポトーシス誘導率を比較したところ、DS-7423 のほうが有意にアポトーシス誘導率が高かった。以上により DS-7423 によるアポトーシスは mTOR 非依存性かつ *TP53* 依存性と考えられた。

続いて 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を明らかにした。*TP53* の活性化の際に起こる *TP53* Ser46 のリン酸化は *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。OVICE、OVMANA 株において半定量的 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 *p53AIP1*、*PUMA* の発現レベルを解析したところ、DS-7423 添加により、*p53AIP1* の発現が有意に上昇した。*TP53* に対する siRNA を用いて OVICE の *TP53* をノックダウンし、DS-7423 156nM 及び 2500nM を添加したところ、*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。また、細胞増殖抑制効

果も有意に低下した。*TP53* 変異を有する OCCA 細胞株 ES-2 に *TP53* をコードする plasmid を導入した上で DS-7423 を添加し Luciferase assay を行った。*TP53* の転写活性は、*TP53* 導入後では DS-7423 添加により有意に上昇した。

以上の結果より、OCCA 細胞株において、PI3K-AKT 経路は様々な因子により活性化し、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。新規 PI3K/mTOR 同時阻害剤 DS-7423 は OCCA 細胞株において濃度依存的な PI3K-AKT 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より高い抗腫瘍活性に重要と考えられる。また、DS-7423 により特に *TP53* 変異のない OCCA 細胞株でアポトーシスが誘導された。アポトーシスが誘導された細胞では *TP53* のアポトーシス関連下流分子の活性化が示されており、*TP53* 変異の有無は DS-7423 におけるアポトーシス誘導を予測するバイオマーカーとなると期待される。OCCA の *TP53* 変異率は 10%前後と低いため、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。