

審査の結果の要旨

氏名 檜山 智子

本研究は卵巣明細胞腺癌(OCCA)におけるPI3K/mTOR同時阻害剤の抗腫瘍効果を明らかにするために、OCCA株とPI3K/mTOR同時阻害剤であるDS-7423を用いて、細胞増殖抑制効果とアポトーシス誘導能について検討を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. 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のリン酸化レベルが上昇していた。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の発現は全株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。OCCA細胞株では*PIK3CA*変異の有無に関わらずRTKを含む様々な因子によりPI3K-AKT経路が活性化しており、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。

2. OCCA細胞株9株にPI3K/mTOR同時阻害剤DS-7423とmTOR単独阻害剤rapamycinの細胞増殖抑制効果をMTT assayで検討した。rapamycinでは10nM以上では濃度依存的な増殖抑制効果が見られず、高濃度においても50-60%の抑制であったが、高濃度のDS-7423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を添加したOCCA細胞株からタンパクを抽出し、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。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Flowcytometry法で解析すると、DS-7423添加により濃度依存的に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、DS-7423によりアポトーシスが誘導された可能性が示唆された。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、濃度依存的な増殖抑制効果を示した。卵巣漿液性腺癌(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、有意に優位に感受性が高かった。

3. OWISE 株に DS-7423 を添加し western blotting で cleaved PARP の誘導を確認した。39nM 以上添加時、投与後 2 時間から 24 時間で cleaved PARP が誘導された。FITC-Annexin V PI-2 重染色を行い、Flowcytometry 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、アポトーシス誘導率は *TP53* 変異を有さない株において *TP53* 変異株より優位に高いことが示された。また OWISE 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すると、DS-7423 添加時で有意にアポトーシス誘導率が高かった。

4. 以上より、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、PI3K 阻害による MDM2 リン酸化レベル抑制を介する *TP53* 活性化が関与すると考えられた。western blotting 法により、DS-7423 添加により 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。OWISE、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 *TP53* に変異を有さない OWISE 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 DS-7423 による増殖抑制効果も有意に低下した。次に、*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 Luciferase assay を行った。*TP53* の転写活性は、*TP53* 導入後では DS-7423 添加により優位に上昇した。

以上より、本論文は PI3K/mTOR 同時阻害剤が mTOR 単独阻害剤と比べてより有効な治療戦略となり得ること及び *TP53* 変異率が他の組織型と比べて低い OCCA では PI3K/mTOR 同時阻害剤によりアポトーシスが誘導され得ることを示した。本研究は日本人に多く、抗癌剤抵抗性例が多い OCCA の新規治療戦略の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。