

氏 名	古 形 祐 平
(ふりがな)	(こがた ゆうへい)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成 30 年 7 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題名	Foretinib (GSK1363089) induces p53-dependent apoptosis in endometrial cancer (子宮内膜癌に対する分子標的薬 foretinib の p53 によるアポトーシスを介した抗腫瘍効果)
論文審査委員	(主) 教授 高 井 真 司 教授 近 藤 洋 一 教授 廣 瀬 善 信

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目的》

子宮内膜癌の約 8 割は、子宮内膜増殖症からエストロゲン依存性に進展する比較的予後良好なタイプ I 腫瘍で、類内膜癌 Grade1-2 が分類される。一方、子宮内膜癌の約 2 割は、エストロゲン非依存性の予後不良なタイプ II 腫瘍で、類内膜癌 Grade3 や漿液性癌、明細胞癌などが分類される。進行症例に対しては以前より術後の補助として放射線療法が行われてきたが、それに加え術後補助化学療法の有用性も示されてきている。しかし未だ進行症例の予後は不良である現状から、近年、分子標的薬による新たな治療戦略が試みられている。子宮内膜癌細胞の生存や増殖には、細胞膜上に存在する受容体型チロシンキナーゼである Met(mesenchymal epithelial transition)と、Met のリガンドである HGF(hepatocyte growth factor)の関連が示されている。本研究では、近年胃癌や乳癌など様々な癌種において臨床試験が行われているチロシンキナーゼ阻害薬である foretinib に

注目して、子宮内膜癌に対する抗腫瘍効果を検証した。

《方法》

1. 子宮内膜癌細胞における foretinib の抗腫瘍効果について

悪性度の異なる子宮内膜癌細胞株 4 種(ECC、HEC-1A、HEC-108、TEN)を用いた。ECC は類内膜癌 Grade1、HEC-1A は類内膜癌 Grade2、HEC-108 は類内膜癌 Grade3、TEN は明細胞癌由来で、ECC および HEC-1 はタイプ I、HEC-108 および TEN はタイプ II 腫瘍の細胞株である。まず、子宮内膜癌細胞の細胞増殖に対する foretinib の効果を MTS assay で検証した。また、それぞれの細胞株において caspase-3 の活性を調べ、foretinib による apoptosis の誘導を検証した。

2. 子宮内膜癌細胞における Met/Akt 経路とその役割について

子宮内膜癌細胞に存在する細胞膜受容体型チロシンキナーゼである Met の活性化、また foretinib 投与時の Met 活性の変化を検索するために、Met のリン酸化抗体を用いて Western blotting 法で p-Met タンパクの発現量を調べた。また、Met シグナルの下流にあたる Akt 活性を検討するために、Akt のリン酸化抗体を用いて p-Akt タンパクの発現を検証した。

3. foretinib が誘導する子宮内膜癌細胞の apoptosis について

子宮内膜癌細胞における p53 を介する apoptosis の関与を検索するために、p53 タンパクと複合体を形成する MDM2 タンパク、p53 を介した apoptosis を促進する PUMA について、抗 p53 抗体、抗 p-MDM2 抗体、抗 PUMA 抗体を用いて Western blotting 法でタンパク質の発現量を検討した。また、リポフェクション法で p53 siRNA を導入した子宮内膜癌細胞に対する foretinib の修飾効果を、MTS assay を用いて検証した。

4. 子宮内膜癌細胞における HGF/Met シグナルの役割

子宮内膜癌細胞において Met が常にリン酸化されている要因として、HGF/Met シグナルのオートクライン機構に着目し、リポフェクション法で HGF siRNA を導入した細胞における、Met の活性化を検証した。

5. HGF/Met シグナルの阻害により p53 を介する apoptosis が誘導されるか

HGF siRNA を導入した子宮内膜癌細胞の細胞増殖能を MTS assay で検証し、apoptosis の発現を caspase-3 活性で検討した。また HGF siRNA を導入した細胞において、HGF/Met シグナルの下流にあたる Akt の発現を、抗 Akt 抗体を用いて検討した。またさらにその下流の MDM2、p53、PUMA の発現量についても、抗 p-MDM2 抗体、抗 p53 抗体、抗 PUMA 抗体を用いて、Western blotting 法にて検討を行った。

6. ノードマウスを用いた foretinib の抗腫瘍効果の検討

子宮内膜癌細胞株 3 種(ECC、HEC-108、TEN)をノードマウスの皮下に植え付け、2 週間後、腫瘍形成後に foretinib(30 mg/kg/day)の経口投与を 3 週間行い、抗腫瘍効果を検討した。また腫瘍における p53 の発現と、p53 を介する apoptosis に関連する、p-MDM2、PUMA の発現を、免疫組織化学的に検証した。

7. 臨床検体における p53 変異率から考察する foretinib の有効性の検討

p53 を介する apoptosis を誘導する foretinib の実際の臨床での効果を推測するために、当院で摘出手術を行った子宮内膜癌 344 症例から得た臨床検体を用いて、それぞれの腫瘍における p53 の発現異常を免疫組織学的に検討した。

《結果》

1. 4 種の子宮内膜癌細胞株に foretinib を投与すると、4 種すべてにおいて用量依存的に細胞増殖能は低下した。細胞増殖能が低下した原因検索のために caspase-3 の活性を

みると、foretinib 投与により apoptosis を来している細胞数は 4 種全てにおいて有意に増加した($p < 0.01$)。

2. 子宮内膜癌細胞では常に Met がリン酸化されており、foretinib 投与により Met のリン酸化が抑制された。またその下流の Akt も常にリン酸化されているが、foretinib 投与によりリン酸化した Akt が減少することを示した。つまり、子宮内膜癌細胞では Met/Akt 経路が恒常的にリン酸化されていることが示唆された。また、foretinib の投与により Met のリン酸化が抑制され、p53 の発現量が増強した。以上から、foretinib 投与により p53 を介した apoptosis が誘導されるとして矛盾しない結果が得られた。
3. 子宮内膜癌細胞では、MDM2 は常にリン酸化されており、foretinib 投与により HGF/Met シグナルが阻害されるとリン酸化は減少した。一方で、foretinib 投与前は p53 と PUMA の発現は弱く、foretinib 投与によりそれらの発現が増強した。また、p53 siRNA を導入した細胞では、foretinib の細胞増殖に対する抑制効果は減弱した。
4. HGF siRNA を導入した子宮内膜癌細胞では HGF の分泌が低下するとともに Met のリン酸化は減少し、HGF/Met のオートクライン機構が示唆された。
5. HGF siRNA を導入した子宮内膜癌細胞では細胞増殖が抑制され、また apoptosis も増加した。このことから、子宮内膜癌細胞の増殖を抑制するには HGF/Met シグナルの阻害が重要な要素と考えられた。また HGF siRNA を導入した細胞における Akt のリン酸化の減少、さらにその下流のシグナルにあたる MDM2 のリン酸化の減少と p53、PUMA の発現増強は、foretinib を投与した場合の変化と類似した結果であり、HGF/Met シグナルのオートクライン機構の阻害は、抑制された p53 を介する apoptosis 経路を部分的に復元させる可能性が示唆された。

6. 3週間の foretinib 経口投与により、ECC 群、HEC-108 群、TEN 群 の3種すべてにおいて腫瘍は有意に縮小した。とくに TEN を植え付けた群では、2週間の foretinib 経口投与で腫瘍が完全に消失した。また摘出した腫瘍(ECC、HEC-108)の免疫染色では、foretinib 投与群において p-MDM2 の発現低下、p53、PUMA の発現増強を認め、p53 を介した apoptosis が関与する可能性が示唆された。
7. p53 の発現異常率は、類内膜癌 Grade1 や Grade2 などの低悪性度群では 6.0%、類内膜癌 Grade3 や漿液性癌、明細胞癌といった高悪性度群では 24.0%であり、高悪性度群で発現異常率が有意に高かった($p<0.01$)。

《結論》

本研究では、予後不良である進行子宮体癌に対する新たな治療法として、分子標的薬である foretinib を用いてその効果を検証した。子宮内膜癌細胞の生存や増殖には HGF/Met を介したシグナル伝達経路が重要であることから、そのシグナル伝達を阻害することで、抑制されていた p53 を介する apoptosis 経路が活性化され、腫瘍の増殖を抑制できると考えられる。本研究で用いたチロシンキナーゼ阻害薬である foretinib は、悪性度の異なる子宮内膜癌細胞株 4 種すべてにおいて、HGF/Met シグナルを阻害することで抗腫瘍効果を示し、p53 を介する apoptosis 経路を活性化させた。注目すべきは、臨床的には p53 変異率が高く悪性度の高い明細胞癌の細胞株である TEN に対して in vivo で著明な抗腫瘍効果を確認したことである。これは、p53 変異を有する悪性度が高い症例に対しても臨床的な効果が期待できる可能性を示しており、今後難治性の子宮内膜癌に対する一つの治療法になり得る可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

子宮内膜癌の進行症例に対して、術後の補助療法として以前より行われてきた放射線療法に加え、術後補助化学療法の有用性も示されてきている。しかし進行症例において長期予後は不良であり、分子標的薬による新たな治療戦略が試みられている。チロシンキナーゼ阻害薬である foretinib は、近年胃癌や乳癌など様々な癌種において臨床試験が行われている分子標的薬である。子宮内膜癌細胞の生存や増殖には、細胞膜上に存在する受容体型チロシンキナーゼである Met(mesenchymal epithelial transition)と、Met のリガンドである HGF(hepatocyte growth factor)の関連が示されている。本研究は、子宮内膜癌に対する foretinib の抗腫瘍効果とその作用機序を *in vitro*、*in vivo* で検証をしたものである。

申請者は、まず悪性度の異なる子宮内膜癌細胞株 4 種(ECC、HEC-1A、HEC-108、TEN)の細胞増殖に対する foretinib の修飾効果を MTS assay を用いて調べた。その結果、4 種の細胞株すべてにおいて foretinib 投与による細胞数減少がみられた。その要因として apoptosis に注目して検証したところ、foretinib 投与によりすべての細胞株において apoptosis が誘導されていた。また、その apoptosis が p53 を介する経路の活性を伴うこと、さらに子宮内膜癌細胞の増殖、生存は自己の産生する HGF に依存していることを明らかにした。次に、ECC、HEC-108、TEN 細胞をヌードマウスの皮下に植え付け、腫瘍形成後に foretinib の経口投与を行い、その抗腫瘍効果を検証した。foretinib は *in vivo* の投与でも 3 種の腫瘍すべてに対して縮小効果を示し、特筆すべきは悪性度の高い子宮の明細胞癌に由来する TEN 細胞から形成された腫瘍を消失させたことであった。以上から、foretinib が予後不良な進行子宮内膜癌に対する新たな治療法となりうる可能性を示唆しており、臨床的に重要な知見と考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Oncotarget 9(32): 22769-22784, 2018