

学位論文内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 論文審査担当者 |
|--|---|
| 恒遠啓示 | 主査教授 朝日 通雄 副査教授 瀧内 比呂也 副査教授 谷川 允彦 副査教授 勝岡 洋治 |
| <p>主論文題名</p> <p>Topotecan as a molecular targeting agent which blocks the Akt and VEGF cascade in platinum-resistant ovarian cancers</p> <p>(白金製剤耐性卵巣癌における Akt/VEGF をターゲットとした分子標的薬としてのトポテカンの機能解析)</p> | |
| 学位論文内容の要旨 | |
| <p>《研究目的》</p> <p>卵巣癌での死亡率は増加傾向にあり、約半数の症例が進行癌で発見される。シスプラチンやカルボプラチンなどの白金製剤の登場により卵巣癌に対する治療成績は向上したが、再発症例では白金製剤耐性となり長期生存率は依然不良である。以前より申請者らは白金製剤耐性には生存シグナルである Akt 経路が重要な分子であること、Akt の活性を阻害することでシスプラチンのヒト卵巣癌細胞の感受性をあげることを明らかにしてきたが、現在に至っても臨床で使える分子標的薬は登場していない。一方、臨床試験において、トポイソメラーゼ I 阻害薬であるトポテカンは白金製剤耐性卵巣癌に有効であることが示され、再発卵巣癌に使用されているが、そのメカニズムは明らかでない。今回トポテカンがシスプラチン耐性にかかわる分子を標的としているか否かについて検討した。</p> <p>《材料及び方法》</p> <p>シスプラチン耐性のヒト卵巣癌細胞株 Caov-3 とシスプラチン感受性のヒト卵巣癌細胞株 A2780 を用いて以下の実験を行った。</p> | |

1. Caov-3 細胞株、A2780 細胞株においてシスプラチン単剤、シスプラチンとトポテカン併用添加での殺細胞効果を MTS assay を用い検討した。
2. Caov-3 細胞株においてシスプラチンによって誘導される Akt の活性化に対し、トポテカンが影響するか否かを調べるために、シスプラチン単剤、トポテカン単剤、シスプラチンとトポテカン併用添加における Akt のリン酸化を、リン酸化 Akt 抗体を用いた Western blotting で比較検討した。
3. Caov-3 細胞株において Akt の下流の生存シグナルへの影響について Poly ADP ribose polymerase (PARP) 抗体を用いて Western blotting で検討した。
4. Caov-3 細胞株においてシスプラチン単剤添加で活性化した Akt が下流の mTOR や、低酸素誘導因子 Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 α の活性化及び、血管内皮細胞増殖因子 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) の発現に与える影響について検討した。リン酸化 mTOR 抗体で mTOR のリン酸化を、また核内蛋白と細胞質内蛋白を分離後、HIF-1 α の核内移行をそれぞれ Western Blotting で検討した。また HIF-1 α が VEGF のプロモーター領域 hypoxia-responsive element (HRE) に結合しているか否かを CHIP assay を用い検討した。さらに VEGF の発現を real time-PCR を用いて検討した。
5. Caov-3 細胞株において 4.と同様の検討をシスプラチンとトポテカンの併用添加でもおこない比較検討した。
6. 6 週齢のヌードマウス (BALB/c Slc-nu/nu) の腹腔内に Caov-3 細胞株 5×10^6 個を接種し、腹膜播種モデルを作製、接種後 2 週間目より PBS 投与群、シスプラチン単剤 (5mg/kg) 投与群とトポテカン単剤 (12.5mg/kg) 投与群とシスプラチンとトポテカンの併用投与群の 4 群に分け、1 週間毎に薬剤を腹腔内投与し比較検討した。

《結 果》

1. Caov-3 細胞株はシスプラチン単剤添加による増殖抑制は認めず、シスプラチンに耐性があることを確認した。シスプラチンとトポテカンの併用添加後は濃度依存性に細胞増殖が抑制された。

2. シスプラチン単剤添加でみられた Akt のリン酸化は、シスプラチンとトポテカンの併用添加により有意に抑制された。
3. シスプラチン単剤添加は PARP の分解を誘導しなかったが、シスプラチンとトポテカン併用添加により有意に PARP の分解を誘導した。これらの結果からシスプラチンとトポテカンの併用添加によりアポトーシスを誘導することが判明した。
4. シスプラチン単剤添加では、mTOR のリン酸化が有意に増加し、HIF-1 α が核内移行することが明らかになった。さらに HIF-1 α が、VEGF プロモーター領域に結合していると推定された。また VEGF の発現は有意に増加することが明らかになった。
5. シスプラチンとトポテカンの併用添加は、シスプラチン単剤添加したものと比較して、mTOR のリン酸化は有意に抑制され、HIF-1 α の核内移行も抑制された。HIF-1 α が VEGF プロモーター領域に結合しないと推定された。また VEGF の発現も有意に減少することが明らかとなった。
6. ノードマウスの Caov-3 細胞株腹膜播種モデルにおいてシスプラチンとトポテカン併用投与群は、対象群と比較し腹腔内の播種病巣の大きさや腹囲を有意に減少させ、腹水中の VEGF の発現も有意に抑制させた。

《結 論》

本研究でシスプラチン耐性である Caov-3 細胞株において、トポテカンが Akt/VEGF をブロックする分子標的薬として働き、シスプラチンの耐性を解除することにより抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった。

審査結果の要旨および担当者

| 報告番号 | 甲第 | 号 | 氏名 | 恒遠啓示 |
|--|----|---|-----------|------|
| 論文審査担当者 | | | 主査教授朝日通雄 | |
| | | | 副査教授瀧内比呂也 | |
| | | | 副査教授谷川允彦 | |
| | | | 副査教授勝岡洋治 | |
| 主論文題名 | | | | |
| Topotecan as a molecular targeting agent which blocks the Akt and VEGF cascade in platinum-resistant ovarian cancers | | | | |
| (白金製剤耐性卵巣癌における Akt/VEGF をターゲットとした分子標的薬としてのトポテカンの機能解析) | | | | |
| 論文審査結果の要旨 | | | | |
| <p>卵巣癌の再発症例では白金製剤耐性となり長期生存率は依然不良である。トポイソメラーゼ I 阻害薬であるトポテカンは白金製剤耐性卵巣癌に有効であることが示され、再発卵巣癌に使用されているが、そのメカニズムは明らかでない。本研究は、トポテカンがシスプラチン耐性卵巣癌に対する耐性にかかわる生存シグナルである Akt 経路の分子を標的としているか否かを検討したものである。</p> <p>申請者は、白金製剤耐性卵巣癌において白金製剤により Akt が活性化され、アポトーシスを阻害することにより白金製剤に耐性となり、Akt 経路をブロックすると白金製剤に対する耐性が解除され、抗腫瘍効果を発揮するメカニズムに注目し、トポテカンによる Akt 経路への影響を検討した。</p> <p>シスプラチン耐性ヒト卵巣癌細胞株 Caov-3 を用い、シスプラチン単剤添加では Akt は活性化し、シスプラチンとトポテカンの併用添加では Akt は活性化されないことを確認した。そしてシスプラチン単剤添加により、mTOR のリン酸化が誘導され、HIF-1α が核内移行すること、HIF-1α が VEGF のプロモーター領域に結合す</p> | | | | |

ることが推定され、さらに VEGF 発現が増加していることを確認した。それに対しシスプラチンとトポテカンの併用添加は、mTOR 活性化を有意に減少させ、HIF-1 α の核内移行を抑制すること、VEGF プロモーター領域に結合しないこと、VEGF の発現も有意に減少することを明らかにした。また、ヌードマウスの Caov-3 細胞株腹膜播種モデルを用い、シスプラチンとトポテカン併用投与群が、対象群と比較し腹腔内の播種病巣の大きさや腹囲、そして腹水中の VEGF 発現を有意に減少させることを明らかにした。

申請者は本研究で、シスプラチン耐性卵巣癌株である Caov-3 細胞において、トポテカンが Akt/VEGF をブロックする分子標的薬として働き、シスプラチンの耐性を解除することにより抗腫瘍効果を発揮することを明らかとし、再発卵巣癌で使用されているトポテカンの有効性のメカニズムを解明し得た。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条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)

Cancer Biology & Therapy 10(11): 1137-1146, 2010