

氏 名	藤 原 聡 枝
(ふりがな)	(ふじわら さとえ)
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 25 年 1 月 16 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	GPR30 regulates the EGFR-Akt cascade and predicts lower survival in patients with ovarian cancer (GPR30 は、卵巣癌において EGFR-Akt 経路を介し 予後不良因子となる)
論文審査委員	(主) 教授 大 槻 勝 紀 教授 内 山 和 久 教授 芝 山 雄 老

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

卵巣癌は婦人科悪性腫瘍の中で最も予後の悪い悪性腫瘍である。卵巣癌の予後不良につながる要因は、化学療法への耐性による再発率の高さが挙げられる。既存の化学療法では、さらなる治療効果が望めるレジメンは挙げられず、近年様々な分子標的治療が注目されている。

卵巣癌は閉経後での発症率が高いとされている。エストロゲンは生体内で様々な役割を示すことは周知の事実であるが、閉経後女性へのエストロゲン投与により卵巣癌の発症率が増加するという報告をはじめ、卵巣癌とエストロゲンおよびエストロゲン受容体の関与についての報告がみられるが、そのメカニズムについては未だ明らかになっていない。また、核内受容体であるエストロゲン受容体のみでは説明できない非常に短時間に起こる生体反応より、細胞膜に位置するエストロゲンをリガンドとする受容体 G-protein coupled receptor 30 (GPR30) の存在が明らかとなった。

エストロゲン受容体の一種である GPR30 は 7 回膜貫通型受容体とされ、生体内でエストロゲンをリガンドとし様々な生体反応を示す受容体として近年報告された。悪性腫瘍の分野では、乳癌で Src を介する GPR30 と Epidermal Growth factor receptor (EGFR; 上皮成長因子受容体)間のシグナル経路や GPR30 から EGFR を介し Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK; 分裂促進因子活性タンパク質キナーゼ) につながる細胞内シグナル経路についての報告が散見されるが、卵巣癌ではその発現意義や生物学的な役割についての報告はない。そこで本研究では、臨床検体を用いて卵巣癌での GPR30 の発現の有無を調べ、GPR30 の発現についての臨床病理学的検討と、卵巣癌細胞株を用いて *in vitro* における GPR30 の機能解析を行い、卵巣癌における GPR30 の発現意義と機能解析を行った。

《対象と方法》

- ① 2001 年 1 月から 2009 年 12 月まで当科で手術を行いインフォームド・コンセントを得た卵巣癌 162 例(境界悪性腫瘍 10 例、漿液性腺癌 61 例、類内膜腺癌 30 例、明細胞腺癌 29 例、粘液性腺癌 19 例)を対象とした。臨床病理学的検討を行うためにパラフィン切片から組織マイクロアレイ標本を作製し、GPR30、EGFR の免疫染色を行い臨床病理学的因子と比較検討した。
- ② GPR30 の遺伝子をヒト乳腺 cDNA library から増幅し発現 vector を作成し、Lipofectamine 法で卵巣癌細胞株 Caov-3 に GPR30 を強制発現させた。GPR30 選択的アゴニスト (G1) (100nM)により GPR30 を刺激し、選択的アンタゴニスト (G15) (100nM) を用いて GPR30 の活性を抑制し、48 時間における細胞増殖への影響を MTS assay で検討した。
- ③ 作成した発現 vector を用いて GPR30 を強制発現させた Caov-3 細胞株に、G1 を 100nM の濃度で添加し、EGFR およびその下流にある Akt のリン酸化を Western blotting 法で検討した。また、Src の inhibitor である PPI (10 μ M)添加による G1 による Akt のリン酸化への影響をも検討した。

《結 果》

① 全症例での GPR30 の発現は 61%にみられた。上皮性卵巣癌の発現率は 65%、境界悪性腫瘍の発現率は 10%であり、上皮性卵巣癌において GPR30 の発現は、境界悪性腫瘍に比較し有意に高かった。

進行期別では I 期 66%、II 期 78%、III 期 61%、IV 期 68%と有意差はなかった。組織型別では漿液性腺癌 75%、類内膜腺癌 83%、粘液性腺癌 73%で、明細胞腺癌では 20%と他の組織型と比べて有意に低かった。また、GPR30 単独の発現と予後との関連では、Kaplan-Meier 法で無病生存率、全生存率ともに有意差はみられなかった。しかしながら、乳癌細胞株で関連が示唆される様に GPR30 と EGFR 両者が陽性であった群は、陰性群と比較して有意に無病生存率を悪化させた。

② MTS assay では、GPR30 を強制発現させた卵巣癌細胞株 Caov-3 に G1 を添加すると有意に cell viability が増加し、G15 添加ではその増殖効果は抑制された。

③ Western blotting 法で、Caov-3 への G1 添加により、EGFR および Akt がリン酸化された。さらに、Src の inhibitor (PPI)により Akt のリン酸化が抑制された。以上から、Caov-3 において GPR30 は、Src を介し EGFR-Akt の経路を刺激することを明らかにした。

《結 論》

卵巣癌における GPR30 と EGFR の共発現は、予後不良因子となることを示した。また、臨床的に化学療法の感受性が低く治療抵抗性を示す明細胞腺癌において GPR30 の発現は他の組織型と比較して発現頻度は有意に低く、組織特異性が示唆された。さらに、卵巣癌において GPR30 は、Src-EGFR を介して生存シグナルである Akt の活性化を起こし、細胞増殖を導くことが解明された。以上より、GPR30 を制御することで、卵巣癌の増殖を抑制する可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

化学療法に対し耐性を獲得し、治療抵抗性を示す卵巣癌の長期生存率は依然不良である。一方で、エストロゲンあるいはエストロゲン受容体と卵巣癌との関与についての報告が散見されるが、未だそのメカニズムについては明らかではない。本研究は、卵巣癌におけるエストロゲン受容体 GPR30 の発現意義と機能解析を行ったものである。

申請者は、卵巣癌 162 例を対象とし GPR30 の臨床病理学的発現意義を検討し、卵巣癌細胞株 Caov-3 を用いて乳癌細胞株で報告がある GPR30 が Src を介し EGFR を刺激し細胞増殖につながることに注目し機能解析を行った。

全症例での GPR30 の発現は 61%にみられた。進行期別に有意差はなく、GPR30 単独の発現と予後への関与に有意差は認めなかったが、GPR30 と EGFR が共発現であれば無病生存率に有意差を認めた。一方組織型別では、治療抵抗性を示す明細胞腺癌が他の組織型と比較し有意に発現頻度が低かった。さらに卵巣癌細胞株 Caov-3 を用い、GPR30 の選択的アゴニスト G1 の添加で cell viability が増加し、アンタゴニスト G15 添加ではその増殖効果が抑制されることを確認した。また G1 添加で EGFR およびその下流にある Akt は活性化し、Src の inhibitor を投与することで Akt の活性化が抑制されることを確認した。

申請者は本研究で、卵巣癌における GPR30 と EGFR の共発現は予後不良因子となることを示した。さらに、卵巣癌細胞株 Caov-3 を用いて Src-EGFR を介して生存シグナルである Akt への関与を示し、GPR30 の刺激は細胞増殖を導くことが解明された。このことは、GPR30 の制御は卵巣癌の増殖を抑制できる可能性を示唆している。

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)

Journal of Ovarian Research 2012, 5:35
doi:10.1186/1757-2215-5-35