

氏 名	川 口 浩 史
(ふ り が な)	(かわぐち ひろし)
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 26 年 7 月 2 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	Gemcitabine as a molecular targeting agent that blocks the Akt cascade in platinum-resistant ovarian cancer (白金製剤耐性卵巣癌における Akt をターゲットとした分子標的薬としての Gemcitabine の機能解析)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 朝 日 通 雄 教授 内 山 和 久 教授 東 治 人

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《研究目的》

卵巣癌は近年増加傾向にあり、約半数の症例が進行癌で発見されその多くが死に至る。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ため白金製剤耐性卵巣癌に対する治療戦略が重要である。

臨床試験において、核酸代謝拮抗薬であるゲムシタビン[®]は白金製剤耐性卵巣癌に有効であることが示され、再発卵巣癌治療に使用されている。また、シスプラチンとの併用においても抗腫瘍効果を示すことが報告されているが、そのメカニズムは明らかでない。

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がを明らかにしてきた。

そこで本研究では、白金製剤耐性ヒト卵巣癌細胞株を用いて、ゲムシタビ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 *in vitro* および *in vivo* において検討した。

《材料及び方法》

白金製剤耐性のヒト卵巣癌細胞株 Caov-3、A2780CP と白金製剤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。

1. Caov-3 細胞株、A2780CP 細胞株、A2780 細胞株においてシスプラチン単剤、ゲムシタビン単剤、シスプラチンとゲムシタビン併用添加での Cell viability を MTS assay 法を用い比較検討した。また、浸潤能抑制効果を Invasion assay 法を用い比較検討した。
2. Caov-3 細胞株、A2780CP 細胞株、A2780 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、ゲムシタビンが影響するか否かを調べるために、シスプラチン単剤、ゲムシタビン単剤、シスプラチンとゲムシタビ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 法で比較検討した。
3. Caov-3 細胞株、A2780CP 細胞株、A2780 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、アポトーシスの検討に Poly ADP ribose polymerase (PARP) 抗体を用い PARP の Cleavage を、癌浸潤能の機序としての MMP-9 の発現を Western Blotting 法および、酵素活性を Gelatin zymography 法で比較検討した。
4. Caov-3 細胞株、A2780CP 細胞株、A2780 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 RT-PCR を用いて検討した。
5. 6 週齢のヌードマウス (BALB/c Slc-nu/nu) の腹腔内に Caov-3 細胞株および A2780CP 細胞株を 5×10^6 個を接種し、腹膜播種モデルを作製、接種後 2 週間目よりコントロール群

(PBS 投与)、シスプラチン単剤 (5 mg/kg) 投与群とゲムシタビン単剤 (60 mg/kg) 投与群とシスプラチンとゲムシタビンの併用投与群の 4 群に分け、1 週間毎に薬剤を腹腔内投与し治療効果を比較検討した。また、腹腔内播種病巣から切片を作製し、アポトーシス細胞の検出に TUNEL 法で、血管新生能の検出、細胞増殖能の検出に、抗 CD31 抗体および抗 Ki67 抗体を用いた免疫組織化学染色で比較検討した。

《結 果》

1. Caov-3 細胞株、A2780CP 細胞株において、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であることを確認した。シスプラチンとゲムシタビンの併用添加後は濃度依存性に細胞増殖が抑制され、また、浸潤能も有意に抑制された。
2. シスプラチン単剤添加でみられた Akt のリン酸化は、シスプラチンとゲムシタビ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、シスプラチンとゲムシタビ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ゲムシタビンの併用添加によりアポトーシスが誘導されることが判明した。

また、MMP-9 の発現および酵素活性はゲムシタビンの併用添加により抑制されており、癌浸潤抑制効果の機序として MMP-9 の発現抑制が関与していることが示唆された。

4. シスプラチン単剤添加で認められた VEGF の発現は、シスプラチンとゲムシタビンの併用で有意に抑制され、血管新生能の抑制に関与していることが示唆された。
5. ノードマウスの Caov-3 細胞株および、A2780CP 細胞株腹膜播種モデルにおいてシスプラチンとゲムシタビン併用投与群は、対象群に比較して腹囲を有意に減少させた。播種病巣の病理学的検討では、併用投与群において TUNEL 陽性細胞が有意に増加しており、アポトーシスが誘導されていることが示唆された。また、血管新生能を腫瘍血管密度で評価したところ、併用群では血管新生が抑制されていることが分かった。さらに、細胞増殖マーカーである MIB-1 Index も低い結果であった。

《結 論》

本研究で白金製剤耐性である卵巣癌細胞株において、ゲムシタビンが Akt/VEGF をブロックして白金製剤耐性を解除することにより、抗腫瘍効果を発揮する可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

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。核酸代謝拮抗薬であるゲムシタビ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、その抗腫瘍効果のメカニズムは明らかでない。本研究は、ゲムシタビンが白金製剤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。

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を以前より報告していたが、本研究では、ゲムシタビンによる抗腫瘍効果が Akt を介する経路へ与える影響を検討した。

白金製剤耐性ヒト卵巣癌細胞株を用い、シスプラチン単剤添加では Akt は活性化し、VEGF の発現が増加していることを確認した。そして、シスプラチンとゲムシタビンの併用添加では Akt の活性化は抑制され、VEGF の発現も有意に減少することを明らかにした。また、シスプラチンとゲムシタビンの併用添加では癌浸潤能に関わる MMP-9 の発現と酵素活性を有意に減少させることを明らかにした。

そして、ヌードマウスの Caov-3 細胞株腹膜播種モデルを用い、シスプラチンとゲムシタビン併用投与群が、対象群と比較し腹囲を有意に減少させ、播種病巣から作製した切片において、アポトーシスを誘導し、血管新生も抑制し、MIB-1 index も低下させることを明らかにした。

申請者は本研究で、白金製剤耐性卵巣癌株において、ゲムシタビンが Akt/VEGF をブロックして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可能性を示唆しており、再発卵巣癌で使用されているゲムシタビンの有効性のメカニズムの 1 つを解明したと考えられる。

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)

Journal of Ovarian Research 7(1): 38, 2014 Apr 9.

doi:10.1186/1757-2215-7-38 <http://www.ovarianresearch.com/content/7/1/38>