

氏名	高井雅聡
(ふりがな)	(たかい まさあき)
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27年7月8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	Crosstalk between PI3K and Ras pathways via Protein Phosphatase 2A in human ovarian clear cell carcinoma (卵巣明細胞腺癌における PP2A を介した PI3K 経路と Ras 経路とのクロストーク)
論文審査委員	(主) 教授 廣 瀬 善 信 教授 高 井 真 司 教授 矢 野 貴 人

### 学位論文内容の要旨

#### 《研究目的》

卵巣癌は婦人科腫瘍の中で最も予後不良の悪性腫瘍として知られており、欧米だけでなく本邦においても年々増加傾向にある。卵巣癌は組織学的に漿液性腺癌、類内膜腺癌、粘液性腺癌、明細胞腺癌の大きく4種類に分類される。卵巣明細胞腺癌は世界的には発症頻度が5%程度と低いにもかかわらず、本邦においては20%の発症頻度を示している。組織型や進行期に関わらず手術を施行した上で、術後追加治療として白金製剤中心の化学療法を行うことが基本治療となる。しかし、卵巣明細胞腺癌は白金製剤に耐性を示す事が多く、他の組織型と比較してとりわけ予後不良である。

上皮系悪性腫瘍に対する分子標的薬の開発は進歩してきており、PI3K経路とRas経路が治療の標的になると考えられている。卵巣癌におけるPI3K経路の活性と予後不良との

関係があると報告もされており、卵巣明細胞腺癌において PI3K 経路は非常に重要であると考えられる。PI3K 経路が活性化すると、mTOR ならびに HIF-1 $\alpha$  が活性化することが知られている。HIF-1 $\alpha$  は様々な癌種における薬理的な標的の一つであるが、卵巣癌においても同様である。そこで、本研究では、卵巣癌細胞株を用いて *in vitro* ならびに *in vivo* における卵巣癌の HIF-1 $\alpha$  の発現意義と機能解析を行った。

#### 《材料および方法》

ヒト卵巣癌細胞株（漿液性腺癌）である A2780、A2780cp（シスプラチン耐性 A2780）、CaOV3、SkOV3 と、ヒト卵巣癌細胞株（明細胞腺癌）である RMG-1 を用いた。RMG-1 に mTOR 阻害剤である Rapamycin を 24 時間添加した細胞を準備した。また、持続的に Rapamycin を添加することで作製した Rapamycin 耐性株（RMG-1RR）ならびに RMG-1 の HIF-1 $\alpha$  恒常発現抑制株（RMG-1HKD）を作製して、以下の実験を行った。

1. 通常酸素環境下ならびに低酸素環境下において A2780、A2780cp、CaOV3、RMG-1、SkOV3 それぞれの HIF-1 $\alpha$  の発現を Western blotting 法を用いて比較した。
2. RMG-1 Rapamycin 24 時間添加群と RMG-1RR の HIF-1 $\alpha$  の発現を RT-PCR 法を用いて比較した。
3. RMG-1 と RMG-1HKD の HIF-1 $\alpha$  の発現を RT-PCR 法を用いて比較し、WST-8 assay と足場非依存性増殖を定量する colony formation assay を用いて増殖の比較検討を行った。
4. RMG-1、RMG-1HKD、RMG-1 Rapamycin 24 時間添加群、RMG-1RR において PI3K 経路と Ras 経路における各タンパク質（Akt、mTOR、S6K、B-Raf、Raf-1、MEK、ERK）の発現とリン酸化の状態について Western blotting 法を用いて比較検討した。
5. RMG-1、RMG-1HKD において、protein phosphatase 2A の触媒サブユニット（PP2A-C）の発現を Western blotting 法を用いて比較し、PP2A の活性を免疫沈降法並びに、合成リン酸化ペプチドを用いた比色法によって比較検討した。
6. RMG-1 に PP2A 阻害剤である Cantharidin を投与し WST-8 assay 法を用いて細胞増

殖率を比較し、ERK ならびに MEK のリン酸化の状態を Western blotting 法を用いて比較検討を行った。

7. RMG-1 と RMG-1HKD の各々について、コントロール群、Rapamycin 投与群、MEK 阻害剤である PD98059 投与群、2 剤併用群の 4 群に対し WST-8 assay 法を用い細胞増殖率について比較検討した。
8. 5 週齢のヌードマウス (BALB/c nu/nu) の両側脇腹に RMG-1 あるいは RMG-1HKD を皮下移植し、コントロール群、Rapamycin 投与群、PD98059 投与群、2 剤併用群の 4 群に分けて 1 週間毎に薬剤を腹腔内投与し、治療効果について 4 週間後に比較検討した。

#### 《結 果と考 察》

1. A2780、A2780cp、CaOV3、SkOV3 の HIF-1 $\alpha$  の発現は低酸素環境下で亢進していた。RMG-1 は他の細胞株と比較して、低酸素環境下において HIF-1 $\alpha$  の発現が著明に亢進しており、且つ通常の酸素環境下においても HIF-1 $\alpha$  の発現が亢進していた。
2. RMG-1 Rapamycin 24 時間添加群では RMG-1 に比し有意に HIF-1 $\alpha$  の発現が低下し、RMG-1RR では RMG-1 に比し、Rapamycin の投与の有無に関係なく HIF-1 $\alpha$  の発現が低下していた。
3. RMG-1HKD では RMG-1 に比し、有意に HIF-1 $\alpha$  の発現は抑制されていた。予想に反して、RMG-1HKD は RMG-1 に比し増殖スピードが早く、またコロニー形成数も多く、有意に増殖活性が高値であった。
4. RMG-1 Rapamycin 24 時間添加群と RMG-1RR では RMG-1 に比し、mTOR 及び S6K のリン酸化は有意に低下していた。また、RMG-1HKD、RMG-1 Rapamycin 24 時間添加群、RMG-1RR では RMG-1 に比し、MEK 及び ERK のリン酸化が有意に高かった。その他のタンパク質発現に有意な差は認めなかった。すなわち、PI3K 経路に存在する mTOR が HIF-1 を介して Ras 経路上の MEK を活性化していることが示唆された。
5. RMG-1 と RMG-1HKD において、PP2A-C のタンパク質発現量に有意な差は認めな

かったものの、PP2Aの活性はRMG-1に比しRMG-1HKDで有意に低下していた。

6. RMG-1に10 nM Cantharidinを投与することで増殖活性が増加した。また、ERKのリン酸化ならびにMEKのリン酸化はCantharidinの濃度に依存して亢進していた。これらの結果から、PP2AはRMG-1においてRas経路を制御しているMEKを脱リン酸化する可能性が示唆された。
7. RMG-1とRMG-1HKDは*in vitro*において、RapamycinとPD98059の併用群でコントロール群や単剤投与群に比し細胞増殖率が有意に低下した。
8. RMG-1とRMG-1HKDのヌードマウス皮下移植モデルでは、RapamycinとPD98059の併用群でコントロール群や単剤投与群に比して、腫瘍サイズ・重量の有意な減少を認めた。

#### 《結 論》

本研究では卵巣明細胞腺癌であるRMG-1において、HIF-1 $\alpha$ の抑制により細胞増殖が亢進し、HIF-1 $\alpha$ の抑制はPP2A活性の低下を介してRas経路の活性化を引き起こし、HIF-1 $\alpha$ の上流に存在するmTORの阻害によってもRas経路が活性化された。また、mTOR阻害薬とMEK阻害薬を併用することで抗腫瘍効果が増強されることも明らかとなった。

## 論文審査結果の要旨

卵巣癌は組織学的に 4 種類に分類されるが、なかでも本邦で発症頻度が高い卵巣明細胞腺癌は化学療法に対し耐性を示すことが多く、長期生存は不良である。卵巣癌においては PI3K 経路の活性と予後との関連性についての報告もあり、卵巣癌における分子標的治療を考える上でも PI3K 経路は重要である。また、PI3K 経路上の HIF-1 $\alpha$  については癌の生存や転移に関係するタンパク質の産生に関与する転写因子として数多く報告されている。本研究は、卵巣癌における HIF-1 $\alpha$  の発現意義と機能解析を行ったものである。

申請者は、まず 5 種類の卵巣癌細胞株における HIF-1 $\alpha$  の発現を調べた。その結果、卵巣明細胞腺癌の細胞株では低酸素環境下 (2% O<sub>2</sub>) だけではなく、通常の酸素濃度環境下であっても HIF-1 $\alpha$  が高発現していることを明らかにした。次いで、恒常的に HIF-1 $\alpha$  を抑制した卵巣明細胞腺癌株を作製し、卵巣明細胞腺癌株と比較することで HIF-1 $\alpha$  の有無による細胞増殖の変化と PI3K 経路と Ras 経路のタンパク質の発現と機能の変化について解析した。その結果、恒常的に HIF-1 $\alpha$  を抑制した卵巣明細胞腺癌株では、予想に反して細胞増殖活性が亢進していた。この恒常的に HIF-1 $\alpha$  を抑制した卵巣明細胞腺癌株では MEK および ERK が活性化しており、Ras 経路の亢進がこの原因であると考えられた。そのメカニズムとして、HIF-1 $\alpha$  抑制による脱リン酸化酵素である PP2A の活性抑制が、Ras 経路の MEK を活性化することが示唆された。さらに、PI3K 経路と Ras 両経路を抑制すると、*in vitro* のみならず *in vivo* において抗腫瘍効果が有意に高いことを明らかにした。

申請者は本研究で、卵巣明細胞腺癌における HIF-1 $\alpha$  の抑制は Ras 経路の活性化を引き起こし、十分な抗腫瘍効果が得られない可能性があることを明らかにした。そのメカニズムとして、HIF-1 $\alpha$  そして PP2A を介した PI3K 経路と Ras 経路のクロストークが関与する可能性を見出した。このことは、HIF-1 $\alpha$  を含む PI3K 経路をターゲットとした分子標的治療を行う際には、PI3K 経路と Ras 経路を同時に抑制することでさらなる抗腫瘍効果が期待でき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)

Cancer biology & therapy 16(2): 325-335, 2015