

シンポジウム1 卵巣がん化学療法の基礎と臨床

卵巣癌細胞のアポトーシス抑制に關与する遺伝子群を標的とした 新しい癌化学療法の基礎的研究

京都大学医学部婦人科産科

万代昌紀

A Novel Approach to Modurate the Expression of Apoptosis-related Genes as a Treatment Strategy of Chemo-resistant Ovarian Cancer

Masaki MANDAI

Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto

Key words : Ovarian cancer · Cisplatin resistance · Apoptosis · Gene therapy

緒言

卵巣癌の化学療法にシスプラチンが導入されてから、進行卵巣癌患者の短期予後には著明な改善が認められたが、長期予後に関しては、当初、期待したほどの効果は得られていない。この最大の要因は、卵巣癌細胞が示す制癌剤耐性、特にシスプラチン抵抗性であり、この克服のために、現在、臨床・基礎両面からさまざまな試みがなされている。癌細胞の制癌剤感受性や耐性に關与するメカニズムとしては、薬剤の排出や解毒にかかわる機構、細胞周期調節やDNA修復にかかわる機構など、種々のものが考えられる。なかでも、癌細胞が治療によって死に陥る過程は制癌剤の効果を左右する最も重要な要素のひとつと考えられるが、近年、この細胞死のうちの形態であるアポトーシスという現象が注目されている。アポトーシスとは細胞が自ら起こす能動的な死、すなわち、細胞の自殺とも称されるべきものであり¹⁾、その進行は、細胞内シグナルによって厳密にコントロールされている²⁾。アポトーシスは生体内においては、発生、恒常性の維持、老化、疾病等にかかわることが知られており、また最近では、制癌剤の治療効果も癌細胞にアポトーシスを誘導すること

で得られるのではないかと考えられているが、その詳細はいまだに明らかではない³⁾⁴⁾。そこで、今回我々は、アポトーシスに注目し、シスプラチン抵抗性卵巣癌を克服するための基礎的検討を行った。

目 的

本研究の目的は、まず第一に、卵巣癌細胞の制癌剤感受性および抵抗性のメカニズムをアポトーシスという観点から捉えなおしてみることである。すなわち、卵巣癌に対するシスプラチンの効果はアポトーシスと関連しているか、卵巣癌細胞はアポトーシスを回避することによってシスプラチン抵抗性を獲得しているのか、どのようなアポトーシス関連因子がシスプラチンに対する感受性・抵抗性にとって重要な役割を演じているのかを順に検討し、化学療法におけるアポトーシスの意義を明らかにすることが第一の目的である。今回、我々は卵巣癌細胞のアポトーシス回避機構を考えるうえで、これを、癌細胞自身の内的なイベントによるものと、細胞の外的な環境によってもたらされるものの二つに分けて考えることにした。内的要因としては癌細胞自身のアポトーシス経路が障害されることによって起こってくる制癌剤抵抗

性を想定し、その最も重要な要素として、アポトーシスが進行する際に必要とされるアポトーシス促進因子、特に Bax の影響を考えた。すなわち、アポトーシス促進因子が、何らかの原因で、障害されると、癌細胞はアポトーシスを起こしにくくなり、抵抗性になると考えられる。また、他方で、癌細胞の外的環境、すなわち、細胞の外からもたらされる因子によって、アポトーシスに対する感受性が減弱し、シスプラチン抵抗性となる可能性があり、このような外的要因として、ゴナドトロピン LH/hCG および成長因子 IGF-1 に関して検討した。

本研究の第二の目的は、卵巣癌細胞のアポトーシス回避機構の解析から得られた結果に基づいて、制癌剤抵抗性卵巣癌に対する遺伝子治療も含めた新たな治療法を開発するための方法を模索することである。卵巣癌細胞がさまざまな因子を活性化、あるいは阻害することにより、アポトーシスを回避し、制癌剤抵抗性を獲得しているとすれば、これらの因子を標的としてその作用を修飾してやることで、制癌剤感受性を亢進しうる可能性が考えられる。今回、組み替えアデノウイルスを用いて、Bax 等の遺伝子を卵巣癌細胞内で強発現させることによって制癌剤抵抗性卵巣癌に対しても治療効果を得られるかどうかを検討した。

方 法

免疫組織染色はホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い、ABC 法にて行った。遺伝子および蛋白発現の解析には Northern blot 法、RT-PCR 法および、Western blot 法を用いた。In vitro におけるアポトーシスの検出には位相差顕微鏡および propidium iodide による核や細胞の形態的変化の観察とともに、クロマチンの断片化を電気泳動や Cell-Death Detection ELISA 法 (Boehringer Mannheim) によって解析した。また、カスパーゼ3活性の測定は CPP32/Caspase-3 Colorimetric Protease Assay Kit (Takara) によった。さらに、アポトーシスの結果、生じる生細胞数の変化を WST-1 アッセイ (Takara) を用いて検討した。

成 績

1. 制癌剤の治療効果とアポトーシスとの関

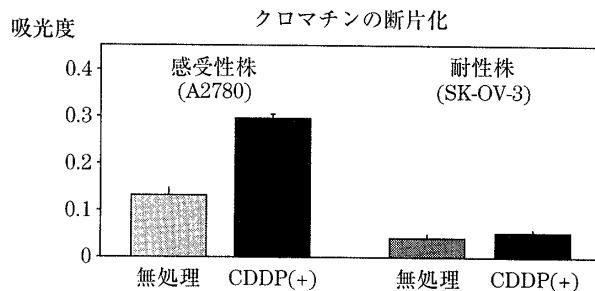


図1 シスプラチン感受性株と耐性株でのシスプラチン誘導性アポトーシスの違い

連一研究の前提

a) シスプラチンによるアポトーシスの誘導：卵巣癌細胞 A2780 にシスプラチンを添加したのち、形態を観察すると細胞の収縮、核の断片化など、アポトーシス特有の像を呈した。また、DNA の電気泳動ではクロマチンの断片化、いわゆるラダーが観察され、ELISA 法で定量的に検討してもクロマチンの断片化が増加していた (図1)。さらに、カスパーゼ3の活性も著明に上昇しており、シスプラチンによりアポトーシスが誘導されることが示された。

b) アポトーシス阻害によるシスプラチンの効果の消失：シスプラチンの殺細胞効果、すなわち治療効果が、アポトーシスによってもたらされることを確認するために、アポトーシスの阻害により、シスプラチンの効果が失われるかどうかを検討した。シスプラチン処理の際にアポトーシスの進行を阻害する、カスパーゼ阻害剤を同時に添加すると、シスプラチンの殺細胞効果は完全に抑制された。すなわち、アポトーシスが阻害されるとシスプラチンの効果は減弱した。

c) シスプラチン感受性とアポトーシスの誘導レベルとの関係：シスプラチン感受性の違いによって、シスプラチン誘導性アポトーシスの程度が異なっているかどうか検討した。シスプラチン 10 μ M を添加し、アポトーシスの起こり方を ELISA 法を用いて検討すると、感受性株 A2780 ではアポトーシスが著明に誘導されたが、耐性株 SK-OV-3 ではアポトーシスの誘導レベルは低く、シスプラチン感受性とアポトーシスの起こり方は相関していた (図1)。以上から、シスプラチンの治

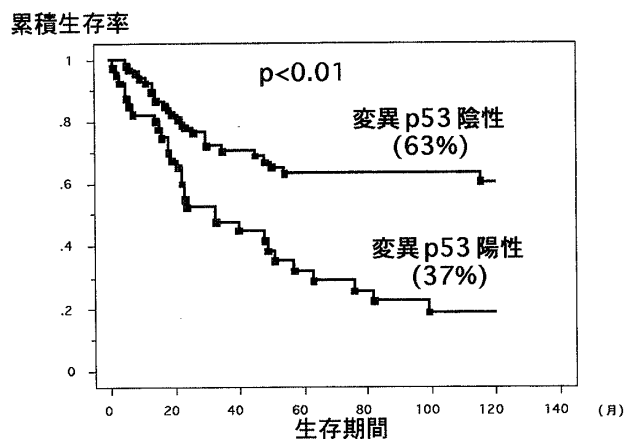


図 2A 変異 p53 蛋白発現と卵巣癌患者の予後

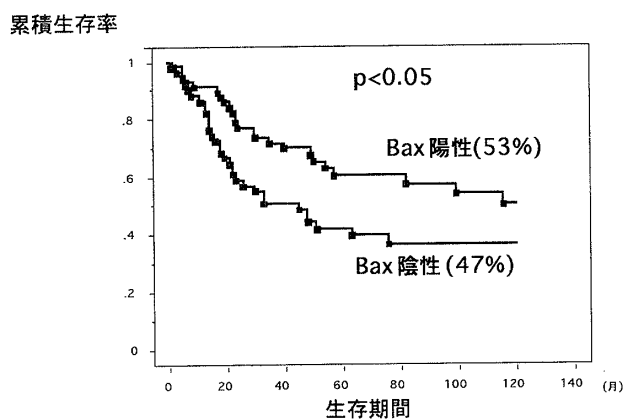


図 2B Bax 蛋白発現と卵巣癌患者の予後

療効果はアポトーシスによってもたらされており、逆に、アポトーシスが阻害されると卵巣癌はシスプラチン抵抗性になることが確認された。

2. 卵巣癌細胞のアポトーシス回避機構(1)―内的要因

卵巣癌細胞がアポトーシスを回避し、抵抗性を獲得する機序のひとつとして、卵巣癌細胞自身のアポトーシス経路が障害される場合を想定し、その最も重要な要素として、アポトーシス促進因子の役割に関して検討した。

a) アポトーシス関連因子の発現と卵巣癌患者の予後：卵巣癌症例108例を対象に p53, Bax, Bcl-2 の発現をパラフィン包埋切片を用いて免疫組織学的に検討した。p53 の発現はモノクローナル抗体 DO-7 (DAKO) を用いた。この発現陽性は p53 遺伝子の変異に基づく変異 p53 蛋白過剰発現を表していると考えられ、以後、変異 p53 蛋白発現とす

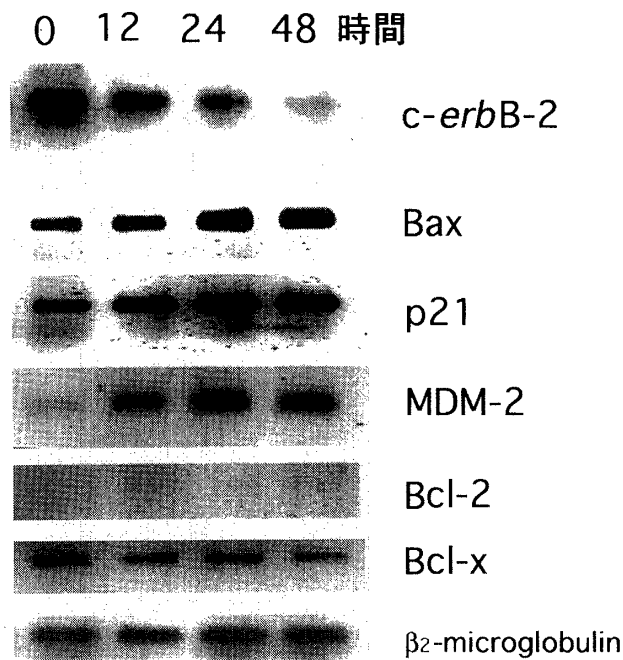


図 3 シスプラチンによるさまざまな遺伝子の mRNA 発現の変化 (RT-PCR, A2780)

る。Bcl-2, Bax に関してはモノクローナル抗体 (DAKO) およびポリクローナル抗体 (N-20, Santa-Cruz) を用いた。患者の予後との相関は log-rank test を用いて解析した。この結果、変異 p53 蛋白発現が陽性の患者の予後は有意に不良であった (図 2A)。アポトーシス抑制因子 Bcl-2 の発現と予後との相関は認められなかった。一方、アポトーシス促進因子 Bax の発現が陰性の症例は有意に予後不良であった (図 2B)。以上の結果から、アポトーシス関連因子、特に、変異 p53 蛋白および Bax 蛋白の発現は、臨床的にも卵巣癌の病態と深く関わっていることが示唆された。

b) 卵巣癌細胞株におけるシスプラチン誘導性シグナル：卵巣癌細胞株 A2780 にシスプラチンを添加した後、時間経過を追ってさまざまな因子の発現を RT-PCR 法にて検討した。この結果、癌遺伝子 *c-erbB-2* の発現はシスプラチン添加後、時間とともに減少した。アポトーシス抑制因子 Bcl-2 の発現は当初より弱く、発現誘導も認めなかった。アポトーシス抑制因子 Bcl-x の発現はシスプラチンによってほとんど変化しなかった。一方、細胞周期調節因子 p21, 癌遺伝子 MDM-2, およびアポトーシス促進因子 Bax の発現はシスプラチンに

表1 シスプラチン処理による Bax および p53 発現の変化と p53 変異

	内在性 Bax レベル	Bax 誘導*	p53 遺伝子	p53 蛋白蓄積**
A2780 (感受性株)	高い	強く誘導される	正常 / 正常	蓄積あり
A2780/cDDP (耐性株)	低い	弱く誘導される	正常 / 変異	蓄積あり
SK-OV-3 (耐性株)	ほとんど発現なし	ほとんど誘導されない	欠失 / 欠失	発現なし

* シスプラチン処理後の Bax mRNA および蛋白の誘導。

** シスプラチン処理後の p53 蛋白の蓄積。

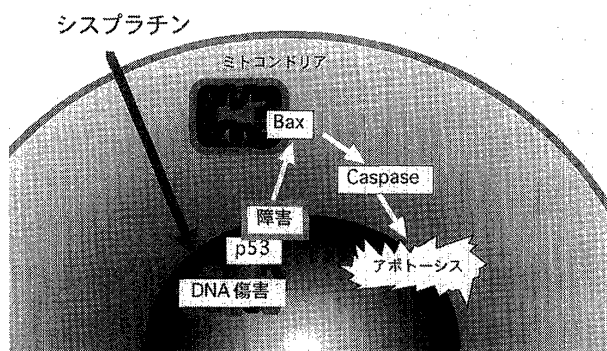


図4 アポトーシス経路の障害によるシスプラチン抵抗性

よって著明に誘導された(図3). この3者はいずれも癌抑制遺伝子 p53 により誘導されることが知られており^{5)~7)}, シスプラチン誘導性シグナルのなかで Bax および p53 の果たす役割は重要であると考えられた.

c) Bax 発現, p53 発現, および p53 遺伝子変異とシスプラチン感受性・抵抗性との関係: シスプラチン感受性株と耐性株にシスプラチンを添加し, Bax の mRNA 発現を検討したところ, 感受性 A2780 ではシスプラチンによって Bax の mRNA が著明に誘導されたが, 耐性株 A2780/cDDP における誘導レベルは低く, 耐性株 SK-OV-3 においては極く弱い Bax の mRNA 発現しか検出されなかった. 次に, SSCP/sequence により p53 の遺伝子変異, および Western blot 法により p53 蛋白, Bax 蛋白の発現を検討すると, シスプラチン感受性株 A2780 においては p53 遺伝子は正常であり, シスプラチン添加により p53 蛋白の蓄積が認められ, 同時に Bax 蛋白が増加した. ところが, 耐性株 A2780/cDDP では p53 遺伝子の一方の allele において, exon5 に突然変異を認め, Bax 蛋白の発

現は減弱していた. また, 耐性株 SK-OV-3 では p53 遺伝子自体が欠失しており, p53 蛋白は誘導されず, Bax 蛋白の増加も認めなかった(表1).

以上の結果から図4のようなシスプラチン抵抗性メカニズムを推察した. すなわち, シスプラチン感受性卵巣癌ではシスプラチンによってアポトーシス促進因子である Bax 蛋白が誘導され, アポトーシスが容易に誘導されるが, 耐性卵巣癌では, シスプラチンが作用しても Bax の発現レベルが低く, 効果的にアポトーシスが誘導されない. この原因として, Bax 誘導因子である p53 の変異が関係している可能性も考えられた. すなわち, Bax 蛋白の誘導異常が, 卵巣癌のシスプラチン抵抗性に関与している可能性が示唆された.

d) パクリタキセル(タキソール)により誘導されるシグナル—シスプラチンとの違い: 卵巣癌細胞にパクリタキセルを添加し, 時間を追って観察すると, シスプラチンと同様にアポトーシスの誘導が観察された. そこで, Bax の発現を RT-PCR 法で検討したところ, パクリタキセル添加ではシスプラチンのような Bax mRNA の増加はみられず, パクリタキセルはシスプラチンとは異なる経路でアポトーシスを誘導している可能性が考えられた. すなわち, アポトーシスの誘導経路は制癌剤により異なる場合もあることが示唆された.

3. 卵巣癌細胞へのアポトーシス誘導による治療の試み(1)

Bax 蛋白の誘導異常が, 卵巣癌のシスプラチン抵抗性に関与している可能性が示唆されたため, Bax 遺伝子を卵巣癌細胞に導入することによってアポトーシスを誘導し, 治療効果を得られるか否か検討した.

a) アポトーシス促進因子 Bax の導入と卵巣癌

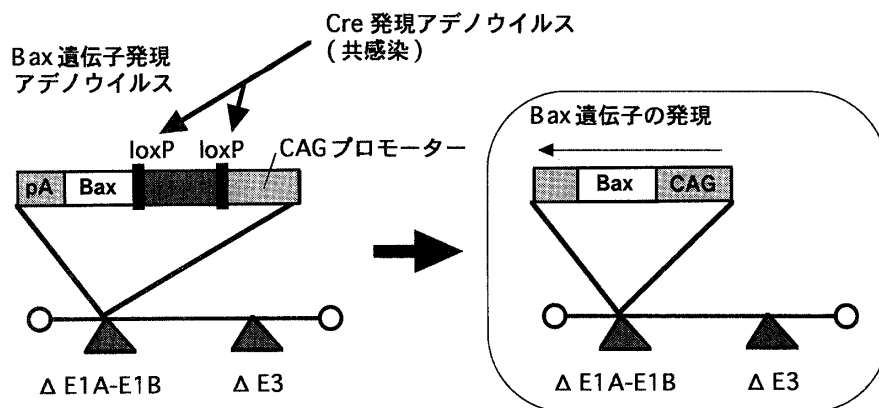


図5 アデノウイルスを用いた Bax 遺伝子導入法

細胞における Bax 発現：遺伝子導入の方法としては東京大学医科学研究所，斎藤泉助教授より供与いただいたアデノウイルス[®]を用い，Bax 高発現組み替えアデノウイルスを作製した(図5)．まず，コスミドカセット pAxCALNLw にヒト由来 Bax- α 遺伝子の cDNA を hemagglutinin epitope sequences とともに組み込み，アデノウイルス親株との相同組み替えにより，組み替えアデノウイルスを得た(以下，Bax 発現ウイルスとする)．CsCl₂ 法により精製，力価測定の後，実験に用いた．この Bax 発現ウイルスは Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルスと同時に感染することにより，Bax を発現する構造であり，以下 Bax 発現アデノウイルスと Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス AxCANCre を同時感染したもの(力価=10:1)を Bax 発現ウイルス群，Bax 発現アデノウイルスと外来遺伝子を発現しないアデノウイルス Ax1w1 を同時感染したものをコントロールウイルス群と称する．なお，遺伝子導入は腫瘍細胞にウイルスを直接添加，感染させることにより行った．まず，LacZ 発現アデノウイルス AxCALacZ を用いてアデノウイルスの各卵巣癌株への導入効率を検討したところ，いずれも MOI 100 でほぼ100%の細胞にウイルスが導入された．そこで，次に，Bax 発現アデノウイルス導入後の Bax 蛋白の発現量を検討すると，導入後，約12時間から Bax 蛋白の発現が認められ，少なくとも120時間以上持続した．また，この発現は，感受性株でも耐性株でも同じ程度に高い発現レベルであり，内在性の Bax 発現との関

連は認めなかった．

b) アポトーシス促進因子 Bax の導入によるアポトーシスの誘導：感受性株 A2780 およびその耐性亜株 A2780/cDDP においては，Bax 発現ウイルス感染後48時間でいずれの細胞株も細胞の縮小，核の断片化など，著明なアポトーシスの像を示した．ELISA 法による定量でもアポトーシスは無処理群やコントロールウイルス群に比して有意に増加していた．また，カスパーゼ活性も Bax 発現ウイルス群において有意な上昇が認められた．さらに，Bax 発現ウイルスにより，最終的に殺細胞効果を得られるか，また，シスプラチンとの併用効果があるかどうか，生細胞数の測定によって評価したところ，シスプラチン感受性株では，Bax 発現ウイルス単独処理によってシスプラチン単独処理に近い殺細胞効果を認めた(図6)．一方，A2780/cDDP は，同じ量のシスプラチン単独処理ではほとんど殺細胞効果を認めなかったが，Bax 発現ウイルス単独処理では，感受性株に近い殺細胞効果を認め，また，シスプラチンと Bax 発現ウイルスとの同時処理で若干の併用効果を認めた．以上のことから，シスプラチン耐性株 A2780/cDDP では Bax 以降のアポトーシス誘導経路は比較的保たれているため，Bax 遺伝子導入による遺伝子治療が有効であると考えられた．

一方，もうひとつのシスプラチン耐性株 SK-OV-3 においては，Bax 遺伝子導入のみでは有効なアポトーシスが誘導されず，シスプラチンとの併用効果も認めなかった(図5)．すなわち，この細胞にお

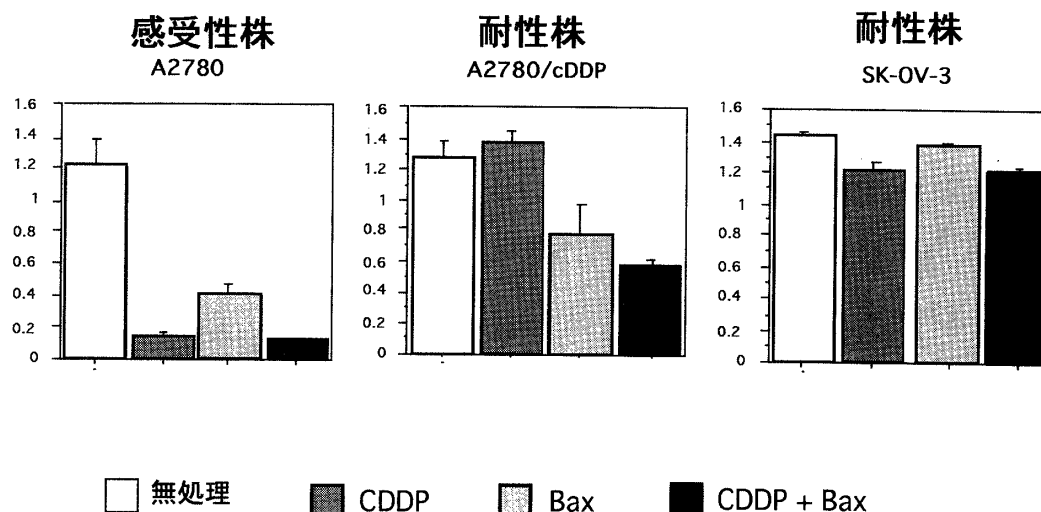


図6 Bax 発現アデノウイルスとシスプラチンの併用効果

いては、アポトーシス誘導経路のなかで Bax の下流においても何らかの障害が存在し、Bax を導入しても効果的にアポトーシスが起こらない可能性が考えられた。

c) アポトーシス促進因子 Bax の導入による in-vivo での効果：ヌードマウス皮下に、卵巣癌細胞 A2780 を移植し、腫瘍が直径約 5mm に触知するようになる 7 日目にシスプラチン、Bax 発現ウイルス単独、又は両者を組み合わせて投与したところ、約 1 カ月後、無処理群に比べてシスプラチン単独群、Bax 発現ウイルス単独群ともに約 50% の腫瘍発育抑制効果を認めた。また、シスプラチンと Bax 発現ウイルスを組み合わせて投与した群ではさらに著明な腫瘍発育抑制効果を認め、腫瘍の縮小を認めた個体もあった。現在、まだ、最終的な生存期間に対する影響や、他の細胞株での効果は未確認であるが、Bax 発現アデノウイルスによる遺伝子治療は in-vivo でも有効な可能性が認められた。なお、この投与方法では現在まで明らかな副作用や個体死は認めていない。

4. 卵巣癌細胞のアポトーシス回避機構(2)―外的要因

同一の卵巣癌であっても、外的な環境によって制癌剤に対する感受性が異なってくる可能性に関して検討した。癌細胞は、細胞外からさまざまな刺激を受けているが、成長因子、サイトカイン、ホルモン等の一部は、癌細胞にとっての生存シグ

ナルとなりうるということが知られている。このような生存シグナルが存在すると、癌細胞はよりアポトーシスに陥りにくくなり、制癌剤感受性が低下すると考えられ、逆に、これを同定して取り除いてやれば、制癌剤感受性も亢進する可能性が考えられる。このような因子として、我々は、まず、黄体化ホルモン LH に着目した。LH はさまざまな機能を有しているが、最近、LH が顆粒膜細胞のアポトーシスを抑制することによって、黄体の存続に関与する可能性が示唆されている⁹⁾。我々は、この LH のアポトーシス抑制機構に着目し、卵巣癌に対しても影響している可能性を考えた。黄体化ホルモン LH と絨毛性ゴナドトロピン hCG とは、共通の受容体である、LH/hCG 受容体に結合して細胞内情報伝達を行っており¹⁰⁾、in-vitro の実験では、LH のかわりにリコンビナント hCG を用いて、この受容体を介するシグナルを解析した。

a) 卵巣癌における LH/hCG 受容体の発現：卵巣癌の LH に対する反応性を検討するために、卵巣癌組織における LH/hCG 受容体の発現を検討した。免疫組織染色を用いて蛋白発現を検討すると、卵巣癌の約 70% の症例で腫瘍細胞に局在した発現を認めた(図7)。次に RT-PCR 法を用いて LH/hCG 受容体の mRNA の発現を検討すると、上皮性卵巣癌の半数以上の症例で発現が認められた(図7)¹¹⁾。さらに、卵巣癌細胞株は、LH/hCG 受容体発現陽性のものと、陰性のものとが認められ、

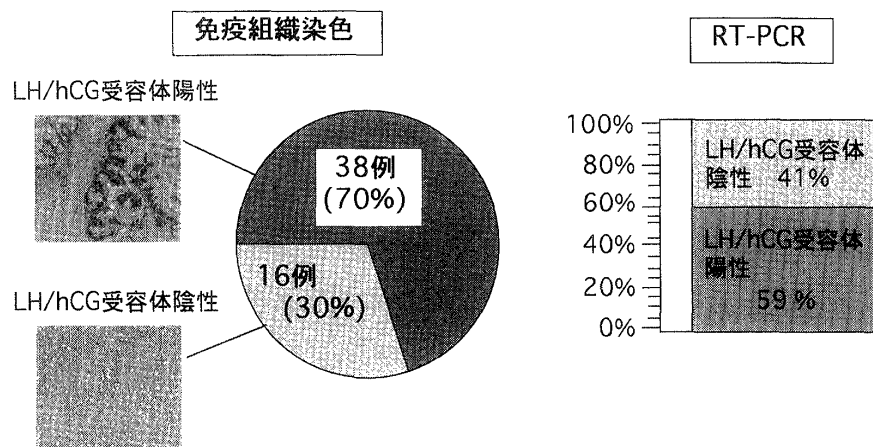


図7 卵巣癌組織における LH/hCG 受容体蛋白の発現

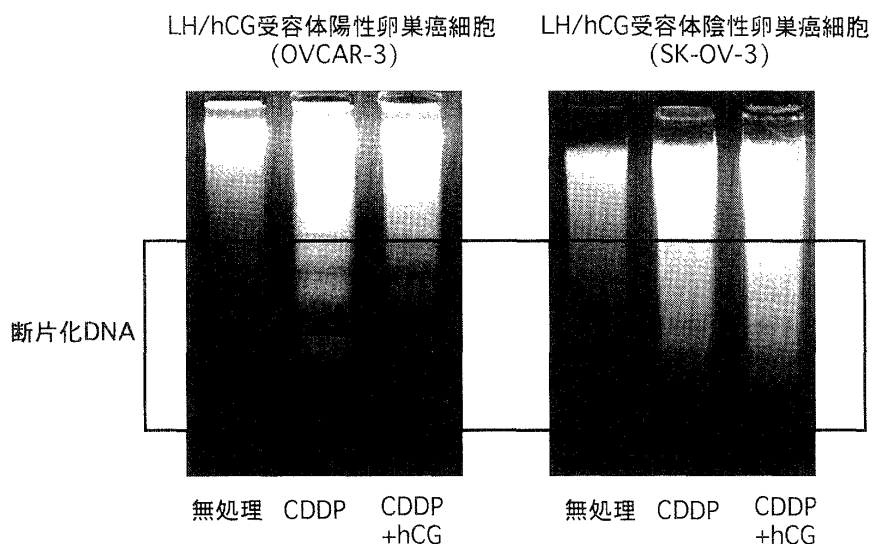


図8 hCG が卵巣癌細胞のアポトーシスに及ぼす影響

このうち、受容体陽性の OVCAR-3, 陰性の SK-OV-3を用いて以後の解析を行った。

b) 卵巣癌に対する hCG の影響—特にシスプラチン誘導性アポトーシスの抑制：はじめに、LH/hCG 受容体陽性株 OVCAR-3において、hCG の増殖活性に対する影響を Brd-U アッセイを用いて検討したが、有意な増殖促進効果はみられなかった。次に、アポトーシスに対する影響を検討した。LH/hCG 受容体陽性の OVCAR-3に、シスプラチンを添加するとアポトーシスが誘導されたが、シスプラチンとともに hCG を加えると、アポトーシスは明らかに抑制された(図8)。一方、LH/hCG 受容体陰性の SK-OV-3では同様に hCG を添加しても

アポトーシスの抑制効果はみられず(図8)、このことから hCG はその受容体を介して、シスプラチン誘導性アポトーシスを抑制していると考えられた¹²⁾。

c) LH/hCG 受容体陽性卵巣癌 OVCAR-3において hCG が誘導する細胞内シグナル：そこで、この hCG のアポトーシス抑制作用をもたらすメカニズムをさらに解析するために、hCG が、アポトーシス関連因子の発現を変化させるかどうか検討した。OVCAR-3に hCG を添加した後、Northern blot 法にて Bcl-2, Bax, および成長因子 IGF-1 (insulin-like growth factor-1) の mRNA 発現を検討したところ、Bcl-2, Bax には有意な変化は認めなかった

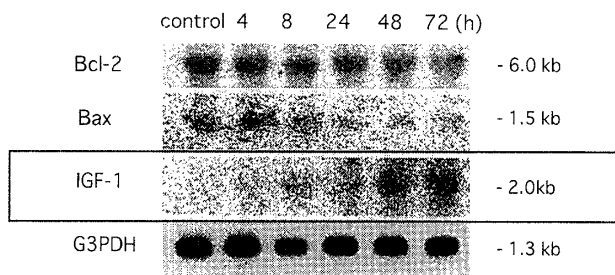


図9 hCG添加によるアポトーシス関連因子の発現変化

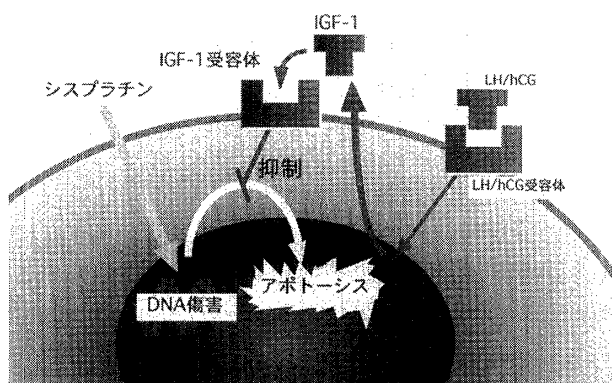


図10 LH/hCG および IGF-1によるアポトーシス抑制機序

が、IGF-1の発現は有意に上昇した¹²⁾。すなわち、hCGはIGF-1の発現誘導を介してアポトーシスを抑制している可能性が考えられた(図9)。RT-PCR法によってOVCAR-3はIGF-1受容体をも発現していたことから、IGF-1はその受容体に結合し、細胞内のチロシキナーゼドメインによって特定の蛋白を磷酸化することによって、アポトーシス抑制シグナルを伝達している可能性が考えられた。

d) 卵巣癌に対するIGF-1の影響—シスプラチン誘導性アポトーシスの抑制：そこで、IGF-1自体が卵巣癌細胞のアポトーシスを抑制するかどうか、検討した。シスプラチンとともに10uMのIGF-1を添加したところ、シスプラチン処理で認められたアポトーシスは著明に減少した。逆にシスプラチン処理で減少した生細胞数はIGF-1添加により回復した。すなわち、IGF-1自体がオートクライン・パラクラインに卵巣癌のアポトーシスを抑制する生存シグナルであると考えられた(図10)。

5. 卵巣癌細胞へのアポトーシス誘導による治療の試み(2)—外的生存因子の抑制

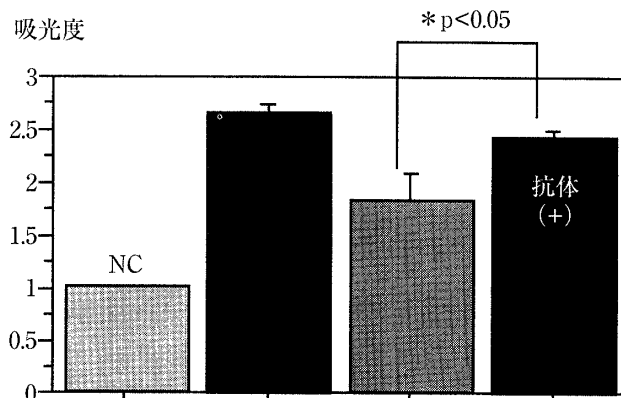


図11 抗IGF-1受容体中和抗体のアポトーシス増強効果

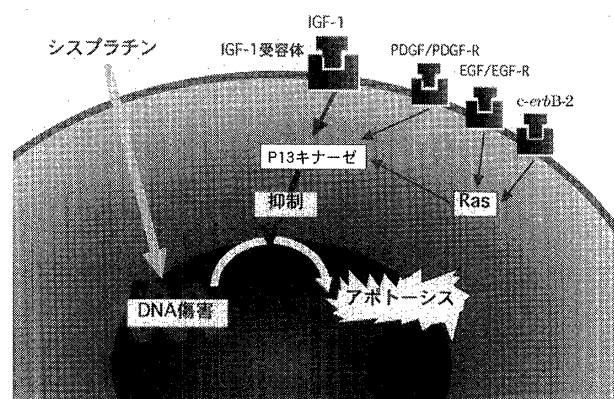


図12 PI3キナーゼによるアポトーシス抑制

IGF-1が卵巣癌のアポトーシスを阻害する生存シグナルであるとするならば、これをブロックすることによりアポトーシスを再誘導し、シスプラチンの効果を回復できる可能性があり、検討を行った。

a) IGF-1作用のブロックによるシスプラチン誘導性アポトーシスの回復：まず、IGF-1受容体に対する中和抗体を用いて、受容体レベルでIGF-1の作用をブロックした。シスプラチンとともにhCGを加えるとシスプラチン誘導性アポトーシスは抑制されるが、これにさらに、IGF-1受容体に対する中和抗体を添加すると、アポトーシスが再誘導された(図11)。

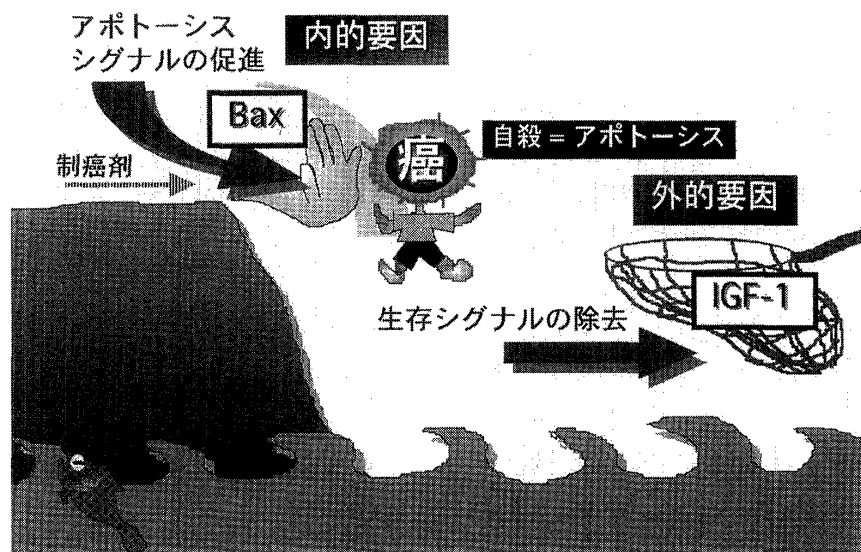


図13 アポトーシス誘導を目指した分子標的治療

次に IGF-1 のアンチセンス RNA 発現アデノウイルスを用いて IGF-1 の発現量を減少させることにより、その作用をブロックすると、抗 IGF-1 受容体中和抗体と同様に、hCG によってもたらされたアポトーシス抑制効果が解除され、アポトーシスが再誘導された。すなわち、IGF-1 の作用を抑制することにより、シスプラチンに対する感受性を増強できる可能性が示された。

b) IGF-1 作用への磷酸化シグナル (PI3 キナーゼ) の関与：IGF-1 はその受容体を介してさまざまな磷酸化シグナルに関与していることが知られているが、なかでも、phosphatidylinositol 3 キナーゼ (PI3 キナーゼ) を活性化することにより、アポトーシスを抑制することが最近、報告された¹³⁾。すなわち、PI3 キナーゼを阻害すれば IGF-1 の効果が抑えられ、アポトーシスを再誘導できる可能性がある。そこで、PI3 キナーゼの阻害剤である、Wortmannin の効果を生細胞数の変化で検討した。シスプラチンとともに IGF-1 を加えると、アポトーシスが抑制され生細胞数は増加するが、さらに Wortmannin を添加すると、IGF-1 のアポトーシス抑制効果が解除され、その結果、生細胞数は再び減少した。すなわち、PI3 キナーゼを不活化し、細胞内の磷酸化状態を変化させることによってもアポトーシスシグナルを増強し、シスプラチン感受性を高めうる可能性が示唆された (図12)。PI3 キナー

ゼは癌遺伝子 ras を含む、さまざまな因子により活性化することが知られていることから¹⁴⁾、PI3 キナーゼ自体を分子標的と捉え、その活性を変化させることにより IGF-1 のみならず、さまざまな細胞外からの生存シグナルを遮断し、シスプラチン感受性を亢進しうる可能性が考えられる。

まとめ

制癌剤抵抗性に関わるさまざまな因子のうちで、今回は、シスプラチンによるアポトーシス誘導メカニズムに焦点を当て、卵巢癌細胞が、アポトーシスを回避して抵抗性を獲得する過程を、内的要因と外的要因の2面から解析した。すなわち、内的要因として、アポトーシスの主要経路の解析から、アポトーシス促進因子 Bax の誘導障害がシスプラチン抵抗性に結びついている可能性を示し、このような場合に、Bax 発現アデノウイルスを用いて、より積極的にアポトーシスを促進してやることで、耐性細胞においても治療効果を得られる可能性を示した。一方では、外的要因として IGF-1 が癌細胞の生存シグナルとしてアポトーシスを抑制し、制癌剤感受性を低下させている可能性があり、これを除去してやれば、治療効果に結びつく可能性を示した (図13)。すなわち、内的、外的両面から、アポトーシス誘導をはかる分子標的治療は、薬剤耐性を克服する有効な方法と思われる。今回、その一端としてアデノウイルスによ

る遺伝子治療の手法を用いたが, in-vitro においても in-vivo においても有効である可能性が示された。今後, アポトーシスの増強を目指した遺伝子治療を導入するためには, さらなる効果の検証や, 安全性の確認といった数多くの課題を解決しなければならないが, 今後も実現に向けて研究をすすめて行きたい。

謝 辞

本講演の機会をお与えいただきました佐藤和雄日本産科婦人科学会会長ならびに会員各位, 座長の労をお取りいただきました野澤志朗教授および杉森 甫教授に深謝致します。また, 研究を遂行するに当たり, 多大なご協力をいただいた共同研究者の皆様および援助いただいた温知会会員の皆様に心より感謝いたします。

共同研究者

京都大学婦人科学産科学教室教授: 藤井信吾, 信州大学産科婦人科学教室教授: 小西郁生, 京都大学婦人科学産科学教室: 黒田英樹, 鶴田優子, 草刈孝史, 田村 出, 南部香成子, 由良泰一郎, Atia A. Hamid, 東北大学加齢医学研究所教授: 福本 学

文 献

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Brit J Cancer* 1972; 26: 239—257
2. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356: 397—400
3. Kerr JF, Witerford CM, Harmon BV. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013—2026
4. Strobel T, Swanson L, Korsmeyer S, Cannistra SA. BAX enhances paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 14094—14099
5. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80: 293—299
6. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817—825
7. Barak Y, Gottlieb E, Juven-Gershon T, Oren M. Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev* 1994; 8: 1739—1749
8. Kanegae Y, Lee G, Sato Y, Tanaka M, Nakai M, Sasaki T, Sugano S, Saito I. Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 3816—3821
9. Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafiriri A, Hsueh AJ. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 1994; 135: 1845—1853
10. Segaloff DL, Ascoli M. The lutropin/choriogonadotropin receptor. 4 years later. *Endocr Rev* 1993; 14: 324—347
11. Mandai M, Konishi I, Kuroda H, Fukumoto M, Komatsu T, Yamamoto S, Nanbu K, Rao CV, Mori T. Messenger ribonucleic acid expression of LH/hCG receptor gene in human ovarian carcinomas. *Eur J Cancer* 1997; 33: 1501—1507
12. Kuroda H, Mandai M, Konishi I, Yura Y, Tsuruta Y, Hamid AA, Nanbu K, Matsushita K, Mori T. Human chorionic gonadotropin (hCG) inhibits cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells: possible role of up-regulation of insulin-like growth factor-1 by hCG. *Int J Cancer* 1998; 76: 571—578
13. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. Regulation of neural survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 1997; 275: 661—665
14. Kashishian A, Kazlauskas A, Cooper JA. Phosphorylation sites in the PDGF receptor with different specificities for binding GAP and PI3 kinase in vivo. *EMBO J* 1992; 11: 1373—1382

Abstract

The objective of this study is to clarify the association between the intracellular apoptotic signaling and the cytotoxic/therapeutic effect of cisplatin in ovarian cancer. Then, according to the findings obtained, we tried to develop a new strategy to manage cisplatin-resistant ovarian cancer.

Firstly, the influence of apoptosis on the effect of cisplatin is examined. Treatment with cisplatin in cisplatin-sensitive ovarian cancer cell line A2780 markedly induced apoptosis, which was detected both by morphological examination as well as quantification of apoptosis using cell death ELISA method or measurement of caspase 3 activity. In contrast, cisplatin in the same dose did not induce significant apoptosis in cisplatin-resistant SK-OV-3 cell line. In addition, an inhibitor of caspase 3, Ac-DEVD-CHO, reduced the cytotoxicity of cisplatin, suggesting that the effect of cisplatin is closely linked to the induction of apoptosis in ovarian cancer cells.

Secondly, the role of pro-apoptotic Bax protein in the development of cisplatin-resistance of ovarian cancer was investigated. Immunohistochemical analysis revealed that decreased expression of Bax protein correlated with poor prognosis of patient with ovarian cancer. In vitro, Bax expression was attenuated in cisplatin-resistant ovarian cancers, A2780/cDDP and SK-OV-3, compared with cisplatin sensitive A2780. These findings suggest that the disturbance in pro-apoptotic signaling through Bax play an important role in the development of cisplatin-resistance. Accordingly, we tried to induce Bax protein in ovarian cancer cells using recombinant adenovirus which highly express the Bax protein. The pro-apoptotic effect of Bax induction was similarly intensive either in A2780 or A2780/cDDP, while it was minimum in SK-OV-3. Preliminarily, adenovirus-mediated transfer of the Bax gene into human ovarian xenografts showed suppressive effect on tumor growth. Therefore, adenovirus-mediated introduction of Bax may be a useful tool to manage a part of cisplatin-resistant ovarian cancer.

Thirdly, the influence of gonadotropins, luteinizing hormone (LH) and human chorionic gonadotropin (hCG), on the apoptosis of ovarian cancer was examined. More than a half of ovarian cancer specimens expressed LH/hCG receptor. hCG treatment markedly reduced cisplatin-induced apoptosis in LH/hCG receptor-positive ovarian cancer cell line, OVCAR-3, and induced insulin-like growth factor 1 (IGF-1) expression. IGF-1 also inhibited cisplatin-induced apoptosis and a neutralizing antibody to IGF-1 receptor restored apoptosis in OVCAR-3, suggesting that IGF-1 mediates anti-apoptotic signaling from hCG. Wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), blocked the anti-apoptotic effect of IGF-1 to restore the cisplatin-induced apoptosis. This indicates that specific phosphorylation signal is related to cisplatin-sensitivity/resistance of ovarian cancer.

In conclusion, both the intrinsic disturbance of intracellular apoptosis signal including Bax and the presence of anti-apoptotic extrinsic factors such as IGF-1 may cause the resistance to chemotherapy in ovarian cancer. Consequently, to regulate apoptosis-related gene and to facilitate apoptosis by the methods including adenovirus-mediated gene therapy may be a hopeful strategy to overcome drug-resistance.