

シンポジウム1 卵巣がん化学療法の基礎と臨床

卵巣がん化学療法における薬剤耐性と細胞内シグナル伝達機構

東京慈恵会医科大学講師 磯 西 成 治

目 的

現在、卵巣癌に対する主たる化学療法剤は白金製剤とタキソール (TX) が注目されている。白金製剤によるDNA阻害作用、TXによるアポトーシス誘導過程には、細胞内シグナル伝達に働くさまざまな蛋白、遺伝子産物、代謝酵素が関与しており、これらの活性は抗癌剤の感受性や耐性の制御機序に作用している。本研究ではシグナル伝達の制御により腫瘍細胞の薬剤感受性を増感、正常細胞の感受性を減感させることにより、臓器予備能力の低下した症例にも薬剤の反復長期使用を可能ならしめることをめざし、(I) 臨床統計から“臨床的薬剤耐性”の症例の救済が、如何に臨床成績に寄与するかを検討し、実験系では(II) 白金製剤とTXに対する感受性をシグナル伝達系を介しコントロールすることをin vitroで試み、(III) その調節作用をin vivoにて臨床応用へと展開させることを目的とした。

方 法

(I) 臨床例の統計学的検討：1989年より現在に至るまでの進行卵巣癌症例を対象に化学療法の感受性から統計解析を行った。臨床的薬剤耐性の診断にはMarkman et al., Gordon et al. の基準に従い(1) 初回治療よりCA125値の低下を認めるIntrinsic resistant (IR), (2) 初回治療で値の低下を認めたが、その後の治療で再上昇を来したAcquired resistant (AR) のsubtypeに分けて解析し耐性症例の内訳を検討した。

(II) In vitroの検討：卵巣癌細胞株である2008, A2780細胞とそのシスプラチン (DDP) 耐性株2008/C13*5.25, CP70の4株を中心に用いた。細胞内シグナル伝達系のなかで、リン酸化cascadeの中心となるProtein kinase C (PKC), その関連系路であるイノシトール代謝系の律則酵

素となるPhosphatidylinositol4 kinase (PI4K), そしてnon-conventionalなPI3Kの3酵素を中心に、酵素活性の制御に伴う薬剤感受性の変動、その機序を検討するとともに、耐性細胞を対象にその克服能を検討した。PKC活性化又は抑制にはTetradecanoyl-phorbol acetate (TPA), Quercetinを、PI4K抑制にはOrobol, PI3K活性化にはPDGFを主に用いた。

①白金製剤の感受性：(1) 薬剤感受性の検討は1hr薬剤接触を基本とし(i) DDP, カルボプラチン, 254-S, (ii) DDPとcarrier ligandの異なるNK121, DWA2114R, (iii) Ammine/amine platinum (iv) 化合物であるJM221の各薬剤を用いた。(2) 白金製剤感受性制御機構の解明には次の5点について検討を行った。(i) 原子吸光度計による細胞内薬剤蓄積(ii) HPLC法又はFlow Cytometryによる細胞内グルタチオン含有量(iii) Northern blot法又はCdCl₂感受性試験による細胞内メタロチオニン含有量(iv) HPLC法による核内DNAの白金添加量およびDNA修復能(v) ローダミン123感受性検査によるミトコンドリア膜電位の各点である。

②TX感受性：(1) TXに対する薬剤感受性の検討には2hr, 24hr接触の2法で検討した。(2) TXの感受性制御機序は次の3点につき検討した。(i) Fluorochrome (Hoechst 33324) 蛍光染色によるアポトーシス誘導能(ii) 抗Tubulin抗体染色による微小管の形態変化(iii) RT-PCRによるTubulin isotype; β 1-, β 2-, β 3-, β 4a-, β 4b-Tubulinの発現変化の各点である。

(III) 動物実験：(A) TPA作用の検討：Ex vivo下TPA処理細胞をヌードマウスに移植後、3.5mg/kg DDPを皮下投与し、in vivoにおけるTPAの作用を観察した。(B) 生体応用可能な

PKC 活性化剤 TNF α と DDP 併用療法の検討：
2008 細胞をヌードマウス移植後，TNF α を腹腔
内全身投与，DDP を皮下局所投与とし①DDP 抗
腫瘍効果の変化②マウスへの薬剤有害反応の影響
を検討した。

成 績

(Ⅰ) 臨床例の検討：臨床上の耐性症例は進行
卵巣癌症例の約 30% を占め，IR 31%，AR 43%
であった。この subtype は組織型に関与しており
明細胞癌，粘液性腺癌の耐性例はいずれも IR に
分類された。AR の平均余命は IR の 1.75 倍であり
AR 獲得までの平均日数 280 日分の延命が得られ
た。

(Ⅱ) In vitro 実験：

①白金製剤；(1) 50% 細胞発育阻止濃度
(IC50) の変動から TPA，Quercetin で 1.5～2.8
倍の，Orobol で 2.5 倍の DDP 感受性増強効果を認
めた。(2) TPA，Orobol では DDP 獲得耐性株や
IR 細胞に対しても増感効果を示し DDP 耐性
phenotype でも本シグナル伝達系が保たれ本法の
耐性克服能が示唆された。(3) TPA 1hr 処理の
増感作用は carrier ligand 特異的でカルボプラチ
ン，254-S に認められたが，NK121，DWA2114R
には欠如していた。(4) TPA 処理では，40～
50% の細胞内薬剤蓄積量の増加，50% のゲルタ
チオン含有量の低下，10～20% の DNA 白金添加
量の増加傾向を認める一方，Orobol 処理ではミ
トコンドリア膜電位に 82.5% の低下を認め，少な
くとも複数の白金感受性制御因子への作用が示唆
された。(5) TPA，Orobol の二重処理では，増
感効果は相加効果を示し超低用量化学療法の可能
性が示唆された。(6) TNF α は増感作用のほか
持続投与により，DDP 耐性獲得を 70～80% 予防
した。

②TX；(1) PDGF では 2hr 接触で 1.8 倍の TX
耐性が誘導され，Orobol では細胞増殖期に 3.6 倍
の増感効果を得た。(2) PDGF 処理細胞では，ア
ポトーシス誘導がコントロールの 47.7% に抑制さ
れ TX 耐性誘導機序の一因と考えられた。(3)
Orobol 処理細胞では β 2-， β 4a-Tubulin isotype
の発現抑制を認め，Isotype の発現変化が増感作
用の一因と考えられた。(4) DDP 耐性細胞は無
血清培地処理により 8.0 倍の TX 増感効果を示す
一方シグナル伝達，細胞周期に関する癌抑制遺伝
子 Smad4 (DPC4)，PTEN，P15 に耐性細胞特異
的なミッセンズ変異を認め DDP 耐性打開策の一
端が示唆された。

(Ⅲ) 動物実験：(1) Ex vivo TPA 処理によ
り DDP の抗腫瘍効果は無処置コントロール群の
それに比べ約 2.1 倍であり in vitro の結果に一致し
た。(2) PKC 活性化腹膜転移巣細胞は，移植前
細胞に比べ 3.2 倍の感受性を示した。(3) TNF α
全身投与と DDP の移植腫瘍近傍への局所投与に
より薬物有害反応を助長せず，抗腫瘍効果のみを
6.1 倍増感させ 37% の延命効果を得た。

結 論

(1) リン酸化シグナル伝達の制御により複数
の DDP 制御因子に同時に作用し増感させること
ができた。(2) IR，AR 両者に増感効果を発揮し，
進行卵巣癌症例の 30% の救済が示唆された。(3)
増感剤併用療法による耐性獲得の予防法が示唆さ
れた。(4) TX に併用し Orobol を腫瘍近傍に，
PDGF を骨髄など局所に投与することにより抗腫
瘍効果の増強と薬物有害反応の抑制による新治療
法の可能性を示した。(5) PKC 活性化細胞は転
移部でも薬剤高感受性が保たれた。(6) DDP 耐
性細胞特異的な増感作用が見出された。