

P3-52 上皮性卵巣癌における Pak1 活性化とその特異的阻害剤 Pak18 の臨床応用の可能性

愛媛大¹, 兵庫県立がんセンター研究部², 兵庫県立がんセンター³
橋本 尚¹, 須藤 保², 山口 聡³, 伊藤昌春¹, 西村隆一郎³

【目的】上皮性卵巣癌において11q13の異常増幅が報告されており, その領域候補遺伝子の1つとしてp21-activated kinase 1(Pak1)がある. Pak1は自己リン酸化により活性化を起し, 細胞増殖, 運動に関与することが知られている. 我々は Pak1 の自己リン酸化 (p-Pak1) を指標として Pak1 活性を検討するとともに, 特異的阻害剤ペプチド (Pak18) の抗腫瘍効果について検討した. 【方法】1) 卵巣癌細胞株を用いて Western blot による p-Pak1 発現解析を行った. 2) の結果から得られた p-Pak1 強発現細胞株, 弱発現株を用いて Pak18 単剤ならびに paclitaxel (PTX), cisplatin (CDDP), epirubicin, SN-38 との併用効果を MTT assay にて検討した. 3) 患者の同意が得られた臨床検体 73 例について免疫組織学的化学染色法により p-Pak1 発現を評価し, 臨床病理学的因子との関連を検討した. 【成績】1) 細胞株において p-Pak1 強発現は 7 例中 3 例であった. 2) Pak18 単独投与ではいずれの細胞株においても増殖抑制効果は見られず, また PTX, CDDP, SN-38 併用効果を認めなかったが, epirubicin 併用効果は p-Pak1 発現株においてのみ認めた. 3) 検体 73 例中 8 例 (11%) に Pak1 活性を認め, 有意に予後不良であった. 【結論】上皮性卵巣癌において Pak1 活性化症例は高い再発率を伴い予後不良であった. このような Pak1 活性化症例の salvage 治療として Pak1 特異的阻害剤と epirubicin の併用療法の可能性が示唆された.

P3-53 卵巣癌に対する合成レチノイド CD437 による抗腫瘍効果と作用経路

鳥根県立中央病院¹, 鳥取大遺伝子医療学², 鳥取大³
松岡さおり¹, 土谷博之², 渡辺祐実², 坂部友彦², 板持広明³, 原田 省³, 寺川直樹³, 汐田剛史³

【目的】強力な抗腫瘍作用を持つ CD437 は, レチノイン酸受容体 RAR γ 特異的アゴニストとして開発された合成レチノイドである. しかしながら, そのアポトーシス誘導メカニズムは, RAR 非依存的経路が示唆されており, その詳細はこれまで明らかにされていない. 本研究では, アポトーシス誘導作用を持つことが報告されている thioredoxin-binding protein 2 (TBP2) に注目し, CD437 による抗腫瘍効果のシグナル経路についての検討を行った. 【方法】卵巣癌由来細胞株 SKOV3 の生存率は WST アッセイにより定量した. 遺伝子発現量は real-time RT-PCR 法により, タンパク発現量は Western blotting 法により評価した. 細胞内カルシウムに関する検討は, カルシウムキレーター BAPTA および蛍光カルシウムプローブ Fluo8 を用いて行った. 蛋白質相互作用は免疫沈降法により確認した. 【成績】SKOV3 に対する CD437 処理によって, アポトーシス誘導を伴う細胞生存率の低下と, 細胞内カルシウム濃度の上昇に依存した TBP-2 の発現誘導が認められた. この TBP2 発現誘導を siRNA を用いて抑制したところ, SKOV3 の CD437 に対する感受性が低下した. さらに TBP2 の発現誘導によって apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) および c-Jun N-terminal kinase (JNK) が活性化した. この ASK1 の活性化は, TBP2 が ASK1 の機能を抑制する thioredoxin (TRX) と結合することによって引き起こされることが示された. 【結論】CD437 のアポトーシス誘導機構として, 細胞内カルシウム濃度亢進, TBP2, TRX, ASK1, JNK を介した一連のアポトーシス誘導経路が関与することが明らかとなった.

P3-54 合成レチノイド CD437 による卵巣癌細胞株における小胞体ストレス経路を介したアポトーシス誘導

鳥取大遺伝子医療学¹, 鳥根県立中央病院², 鳥取大³
渡辺祐実¹, 土谷博之¹, 松岡さおり², 坂部友彦¹, 板持広明³, 原田 省³, 寺川直樹³, 汐田剛史¹

【目的】合成レチノイド CD437 は, 多様な癌細胞株に対して強力な抗腫瘍作用を示すが, その作用機構はレチノイン酸受容体 RAR 非依存的であることが示唆されている. 今回我々は, 小胞体ストレスに焦点を当てて, CD437 による卵巣癌由来細胞株 SKOV3 に対する抗腫瘍作用機構の検討を行った. 【方法】卵巣癌由来細胞株 SK-OV-3 細胞を使用し, CD437 を 0.5-2 μ M の濃度で, 24-48 時間処理した. mRNA 発現量は real-time RT-PCR 法にて, 蛋白質発現は Western blotting 法にて, それぞれ検討した. アポトーシスは Hoechst33258 染色および活性型 Caspase-3 の Western blotting により評価した. また XBP-1 mRNA のスプライシングは, RT-PCR 後 8% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて解析を行った. 【成績】CD437 は SKOV3 に対してアポトーシスを惹起し, さらに小胞体ストレスによって誘導される遺伝子 (CHOP, GADD34, BiP/GRP78) の mRNA 発現量を有意に増加させた. このとき CD437 は, 小胞体ストレストランスデューサーである PERK, IRE-1 α の活性化と, さらにその下流分子の活性化 (eIF2 α のリン酸化, ATF4 蛋白質発現, XBP-1 mRNA のスプライシング) を誘導した. しかしながら, もう一つの小胞体ストレストランスデューサーである ATF6 の活性化は観察されなかった. さらに CHOP に対する siRNA を細胞へ導入したところ, CD437 に対する感受性の低下が認められた. 【結論】今回の我々の結果から, 卵巣癌細胞株に対する CD437 の抗腫瘍作用メカニズムにおける小胞体ストレスの関与が明らかとなった.