

論 文 内 容 の 要 旨

High-Expression of p21 as a Potential Therapeutic Target in Ovarian Clear-Cell Carcinoma

卵巣明細胞癌における p21 の発現と治療標的としての可能性

日本医科大学大学院医学研究科 女性生殖発達病態学分野

大学院生 皆 川 友 希

Anticancer Research 2020 年 10 月号 掲載

## 【背景および目的】

細胞に癌化学療法などで DNA 損傷が生じると DNA 損傷応答 (DDR) が働く。DDR は癌化学療法への感受性に関与しており、DDR 分子は分子標的薬の治療標的にもなり得る。DNA が損傷すると、センサーとして機能する DDR 分子の poly(ADPribose)polymerase (PARP)や 80 kDa Ku protein (Ku80)などが働き、トランスドューサーである ataxia-telangiectasia mutated (ATM)や ATM- and Rad3-related (ATR)を活性化させる。その結果下流の checkpoint kinase 1 (CHK1)や checkpoint kinase 2 (CHK2)が活性化され、エフェクターである Tumor protein p53 (TP53)や 21-kDa protein (p21)が活性化され、DNA 修復・アポトーシス・細胞周期停止などが調節されることで細胞の延命をはかるのが DDR の役割である。

上皮性卵巣癌には主に 4 つの組織型 (類内膜癌・漿液性癌・明細胞癌・粘液性癌) があり、遺伝子変異、化学療法感受性、進展度などに違いが認められる。中でも卵巣明細胞癌は他の組織型と比較し化学療法に対する耐性が高く、早期であっても予後不良となる。しかし現状では、どの組織型に対しても術後化学療法として、プラチナ製剤が用いられており、明細胞癌に特に有効な治療薬は未だない。

本研究で我々は、卵巣明細胞癌における DDR 関連蛋白の発現に着目し、治療標的としての可能性を模索した。

## 【方法】

2013 年から 2019 年までに日本医大付属病院で手術を受けた卵巣明細胞癌 (CCC) 22 症例の手術標本を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を作成した。免疫組織化学 (IHC) 的手法により、FFPE 組織における DDR 関連蛋白 (CHK1、CHK2、TP53、p21) の発現を調べた。CHK1、CHK2、TP53 は陽性細胞の占める割合が 20% 以上を陽性とした。p21 は『染色濃度』と『陽性細胞の占める割合』の両者を scoring 化し、 $\geq 200$  を p21 高発現、 $< 200$  を p21 低発現と分類した。

培養細胞を用いた実験では、2 種類のヒト CCC 細胞株 (JHOC-5、JHOC-9) を使用し、CHK1、CHK2 の発現・リン酸化と TP53、p21 の発現を評価した。またシスプラチンおよび p21 阻害薬である UC2288 が、細胞増殖および細胞死に及ぼす影響を検討した。薬剤投与による細胞増殖および細胞死は、cell counting kit-8 を用いて増殖曲線を作成し評価した。各分子の発現とリン酸化は、western blot 法、およびセルブロットの IHC 染色により確認した。

## 【結果】

CCC 組織標本では CHK1、CHK2、TP53 の発現を殆どの症例で認めた。p21 は、高発現タイプ 12 例 (55%) と、低発現タイプ 10 例 (45%) の 2 群に分類された。

培養細胞でも CHK1、CHK2、TP53 の発現は両細胞株で認められ、シスプラチン投与に

より CHK1 と CHK2 のリン酸化、TP53 の発現上昇もみられた。JHOC-5 では恒常的に p21 が核に低発現であったのに対し(低発現株)、JHOC-9 では高発現していた(高発現株)。また、p21 低発現株では、シスプラチン投与により p21 の発現は核・細胞質で増加したが、p21 高発現株では核の p21 高発現が持続するなど、両細胞株間で p21 の細胞内発現パターンに差異が認められた。細胞の増殖曲線では、どちらの細胞株にもシスプラチンでは軽度の抑制効果が、UC2288 では強い抑制効果がみられた。特に p21 高発現株で UC2288 投与による細胞数の明らかな減少が観察された。UC2288 投与により両細胞株で p21 の発現は低下したが、p21 高発現株では、caspase-3 の切断すなわちアポトーシスが有意に増加した。

#### 【考察】

p21 は DDR 関連分子の 1 つであり、細胞周期の停止、DNA 修復・複製、転写、アポトーシス制御など多様な役割を担い、腎細胞癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌などで悪性度との関連が指摘されている。CCC に関する本研究では、DDR 上流の分子(CHK1、CHK2、TP53) の発現は、症例、細胞株間で差異は認めなかったが、下流の p21 に関しては、高・低発現の 2 パターンに分けられた。さらに、p21 高発現株に p21 阻害薬を投与すると、低発現細胞株に比して、アポトーシスが高頻度に見られた。p21 は caspase-3 に結合することでアポトーシスを抑制するため、p21 阻害薬はその結合を阻害することでアポトーシスを促進したものと考えられる。p21 阻害薬を用いた細胞増殖の実験では、p21 高発現株で細胞数の減少が認められたことは、p21 のアポトーシス抑制作用を裏付ける。

過去にも CCC 治療標的として DDR 関連分子が検討されてきたが、未だに有効性は示されていない。本研究において、p21 阻害薬は p21 高発現 CCC 患者の治療に有効となる可能性が示唆された。今後は将来の臨床応用を見据えたさらなる研究が望まれる。