

## 主論文の要旨

**PRIMA-1<sup>MET</sup> induces apoptosis through accumulation of intracellular reactive oxygen species irrespective of p53 status and chemo-sensitivity in epithelial ovarian cancer cells**

（PRIMA-1MET は、上皮性卵巣癌の p53 変異の有無や抗癌剤への抵抗性に  
関わらず、細胞内活性酸素種の蓄積によりアポトーシスを誘導する）

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻  
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

（指導：吉川 史隆 教授）

芳川 修久

## 【緒言】

上皮性卵巣癌の多くの症例には、手術と化学療法によって治療が行われるが、進行癌で診断されることが多いこと、再発症例では特に抗癌剤に抵抗性を示すことにより、極めて予後不良の疾患であることから、新規の治療法の確立が必要である。p53 reactivation and induction of massive apoptosis (PRIMA-1MET) は、正常な p53 の機能を喪失した変異型 p53 に対して、正常な p53 の機能を回復する化合物として、様々な癌種で細胞死を誘導すること等の癌に対する有効性が報告されている。しかしながら、p53 変異が高頻度で認められる上皮性卵巣癌に対して、PRIMA-1MET が細胞死を誘導できるか等の有効性について、ほとんど検討されていない。本研究の目的は、上皮性卵巣癌に対する PRIMA-1MET の細胞死誘導能を検討するとともに、そのメカニズムを解明することである。

## 【対象及び方法】

今回、上皮性卵巣癌細胞株を 13 種類 (A2780、OVCAR-3、ES-2、SKOV-3、CaOV-3、TOV21G、OV-90、NOS2、NOS2TR、NOS2CR、NOS3、NOS3TR、NOS3CR) 使用し、Cell viability assay、AnnexinV-PI assay、CM-H2DCFDA assay、Western Blot、Real time PCR を用いて、それぞれの細胞株の p53 変異の有無及びタンパク発現の程度を評価し、PRIMA-1MET による細胞死誘導能に加えて、その感受性について p53 変異の有無との相関を評価した。

## 【結果】

PRIMA-1MET の上皮性卵巣癌細胞株に対する細胞増殖抑制能を評価するため、PRIMA-1MET を様々な濃度 (0-100 $\mu$ M) で投与後 48 時間における細胞数を Cell viability assay を行い、濃度依存的に細胞増殖を抑制すること、50%阻害濃度 (IC50) は 2.6-20.1 $\mu$ M であることが示された。また、NOS2 及び NOS3 については、それぞれのシスプラチン及びパクリタキセル耐性株についても IC50 を評価し、感受性が同等であることが確認された。また、予め評価した p53 変異の有無と PRIMA-1MET の感受性の間には、有意差は認められなかった。(図 1)

次に、AnnexinV-PI assay を行い、PRIMA-1MET が上皮性卵巣癌細胞株に対して、容量依存的に apoptosis を誘導することが示され、蛍光顕微鏡により核の凝集や断片化といった apoptosis に特徴的な形態変化が容量依存的に誘導されることが確認された。(図 2) また、Western Blot により、PRIMA-1MET が NOS2 及び NOS3 とそれぞれのシスプラチン及びパクリタキセル耐性株において、PARP cleavage が誘導されることも併せて示された。PRIMA-1MET による細胞増殖抑制や細胞死誘導のメカニズムとして他の癌種において細胞内活性 ROS (reactive oxygen species) の関与が指摘されていることを踏まえ、本研究においても、PRIMA-1MET による apoptosis と細胞内 ROS 蓄積の関係について検討を行った。CM-H2DCFDA を用いて、上皮性卵巣癌細胞株においても、PRIMA-1MET による細胞内 ROS 蓄積が確認

された。また、ROS scavenger である NAC (N-acetyl cysteine) を PRIMA-1MET と同時投与することにより、apoptosis が抑制された。最後に細胞内 ROS 蓄積のメカニズムを明らかとするため、Real time PCR を用いて、抗酸化酵素である Prx3 と GPx-1 の発現を評価した。TOV21G と A2780 の 2 種類の細胞において、PRIMA-1MET が Prx3 及び GPx-1 の発現を容量依存的に抑制していることが示された。(図 3)

#### 【考察】

以上の結果により、上皮性卵巣癌細胞株における PRIMA-1MET の細胞増殖抑制能や細胞死誘導能は、p53 変異の有無や抗癌剤感受性とは無関係であることが示された。これまで、PRIMA-1MET による細胞死誘導メカニズムとして変異 p53 の機能回復が報告されている一方で、細胞内 ROS 蓄積等のその他のメカニズムが示されてきた。今回の研究では、PRIMA-1MET による細胞死は細胞内 ROS 蓄積による apoptosis であり、これは抗酸化酵素の Prx3 や GPx-1 の発現抑制を介していることが示唆された。これまでの報告と今回の研究で得られた知見を併せると、PRIMA-1MET による細胞死は、変異 p53 の機能回復によるものだけではなく、抗酸化酵素の発現抑制を介した細胞内 ROS 蓄積の関与も示唆され、これが p53 変異の有無や抗癌剤感受性に依存しない要因として考えられた。

#### 【結論】

PRIMA-1MET は、抗癌剤耐性卵巣癌細胞株に対しても同等の有効性を認めたことから、難治症例に対する新規治療薬剤に成り得る可能性が示された。