

Title	Inhibition of Phosphorylation of BAD and Raf-1 by Akt Sensitizes Human Ovarian Cancer Cells to Paclitaxel
Author(s)	馬淵, 誠士
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45250">https://hdl.handle.net/11094/45250</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	馬 淵 誠 士
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 8 5 3 6 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Inhibition of Phosphorylation of BAD and Raf-1 by Akt Sensitizes Human Ovarian Cancer Cells to Paclitaxel (Akt による BAD および Raf-1 のリン酸化の阻害は、ヒト卵巣癌細胞に対しパクリタキセル感受性をもたらす)
論文審査委員	(主査) 教授 村田 雄二  (副査) 教授 谷口 直之 教授 奥山 明彦

#### 論 文 内 容 の 要 旨

##### [目的]

卵巣癌の治療において、手術療法と化学療法の二つが主に行なわれているが、現在なお十分な治療成績が得られていない。その理由として、早期発見が困難であること、また治療開始時に抗癌剤に感受性を示していた癌が、後に耐性を獲得し、治療に抵抗性を示すことなどがあげられる。現在、パクリタキセルが初回治療の薬剤として主に使用されているが、その耐性化の分子機構は解明されていない部分が多い。抗癌剤の感受性はアポトーシス誘導シグナルと生存シグナルという2つの相反するシグナルのバランスにより規定されるという報告が多い。PI3 キナーゼの下流に位置する Akt は代表的な生存シグナルの一つとして知られている。また Akt は、BAD、Raf-1 または ASK1 といったアポトーシス誘導シグナル関連因子をリン酸化し、それらの分子の活性を抑制する事も報告されてきた。これまでに、前立腺癌をはじめいくつかの癌において Akt が生存シグナルとして働いているという知見が得られているが、卵巣癌細胞のパクリタキセル耐性化における Akt の役割は不明である。そこで、本研究では、Akt に着目し、それが卵巣癌細胞のパクリタキセルの耐性化に関与しているか否かを検討した。またその分子機構として Akt-BAD カスケードおよび Akt-Raf-1 カスケードの関与を検討した。

##### [方法]

パクリタキセル耐性ヒト卵巣癌細胞株 SW626 細胞を用い、(1)パクリタキセルが Akt を活性化するかを *in vitro* kinase assay にて検討した。(2)次に、パクリタキセルにより活性化された Akt が、パクリタキセルによるアポトーシス誘導シグナルとして知られる BAD および Raf-1 にどのような影響を及ぼすかを検討した。まず、パクリタキセルが BAD および Raf-1 をリン酸化するかを、それぞれ BAD のセリン 136 残基のリン酸化を特異的に認識する抗体、および Raf-1 のセリン 259 残基のリン酸化を特異的に認識する抗体を用いた Western blotting にて検討した。また、そのリン酸化が PI3K-Akt カスケードによるものであるかを検討するため、PI3K 阻害剤の前処置または Akt のリン酸化部分を欠失させた遺伝子 dominant negative Akt の導入により Akt の活性を抑制し同様の実験を行なった。(3)最後に、活性化された Akt がパクリタキセル耐性化に関与しているかを以下の二つの方法により検討した。PI3K 阻害

剤の前処理、または Akt のリン酸化部分を欠失させた遺伝子 dominant negative Akt の遺伝子導入により Akt の活性を抑制するとパクリタキセル感受性が変化するかを cell viability assay にて検討した。また、Akt の作用点である BAD のリン酸化部位を欠失させた遺伝子 BAD2SA を SW626 細胞に導入し、Akt の作用を阻害する事により、パクリタキセル感受性が変化するか否かを cell viability assay にて検討した。

#### [成績]

パクリタキセル耐性ヒト卵巣癌細胞株 SW626 細胞において、パクリタキセルは Akt を活性化した。また、活性化された Akt はアポトーシス誘導シグナルである BAD のセリン 136 残基および Raf-1 のセリン 259 残基をリン酸化した。PI3K 阻害剤、または dominant negative Akt の遺伝子導入によって Akt の活性を抑制することにより、パクリタキセル耐性が解除され感受性を示した。また、BAD2SA の遺伝子導入によって Akt の作用を阻害する事によりパクリタキセル耐性が解除され感受性を示した。

#### [総括]

卵巣癌細胞のパクリタキセル耐性化に Akt が関与する事、またその分子機構として、Akt-BAD カスケードおよび Akt-Raf-1 カスケードが存在する事が明らかとなった。また、Akt カスケードを阻害することにより、SW626 細胞のパクリタキセル耐性が解除される事が示された。卵巣癌治療成績向上のために、今後 Akt をターゲットとした分子標的治療の開発が期待される。

### 論文審査の結果の要旨

卵巣癌の治療成績が現在なお不良である要因のひとつに、化学療法に際して用いられる薬剤に対する耐性化の問題があげられる。本研究は現在第一選択として用いられるパクリタキセルの耐性化出現のメカニズムを明らかとすべく、生存シグナルならびにアポトーシス誘導シグナルの双方に関与しているとされる Akt の細胞内シグナル伝達機構の解析を、各シグナル伝達分子のリン酸化阻害剤ならびに dominant negative 遺伝子導入の手法を用いて系統的に遂行したものである。その結果、Akt がパクリタキセルによる卵巣癌の薬剤耐性に関与している事、さらにこの Akt 活性の抑制がパクリタキセル耐性の解除をもたらすという新知見が得られた。この報告は単に卵巣癌の抗癌剤耐性化のメカニズム解明に寄与するのみならず、将来の卵巣癌の分子標的治療への応用が期待される独創的かつ意義深いものであり、学位の授与に値するものと考えられる。