



Title	Fasudil inhibits lysophosphatidic acid-induced invasiveness of human ovarian cancer cells
Author(s)	緒方, 誠司
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/54092">https://hdl.handle.net/11094/54092</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">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	お 緒 方 誠 司
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学 位 記 番 号	第 23449 号
学 位 授 与 年 月 日	平成22年1月28日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	Fasudil inhibits lysophosphatidic acid-induced invasiveness of human ovarian cancer cells ( fasudil はリゾフォスファチジン酸によって亢進した卵巣癌細胞の浸潤能を抑制する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 木村 正 (副査) 教 授 米田 悅啓 教 授 森 正樹

### 論文内容の要旨

#### [目的]

進行卵巣癌は予後不良な疾患であるが、これは卵巣癌細胞特有の、亢進した浸潤能に一因があると考えられている。リゾフォスファチジン酸(lysophosphatidic acid, LPA)は、卵巣癌患者腹水中に多く含まれる生理活性脂質の一つで、先行研究からは、低分子量Gタンパク質のRho、さらにその下流のRho-associated kinase(ROCK)の活性化を介して細胞運動を引き起こし、卵巣癌の亢進した浸潤能に関与することがわかつている。一方、ファスジル(fasudil)はくも膜下出血術後の脳血管攣縮の予防を適応としてすでに臨床応用されている薬剤であるが、ROCKの特異的阻害剤であることが知られている。そこで我々は、fasudilによるLPA/Rho/ROCK系の阻害が卵巣癌細胞の亢進した浸潤能を抑制することを期待し、その効果について検討した。

#### [方法ならびに成績]

ROCKにはROCK1およびROCK2の2種類のアイソフォームが存在することが知られている。そこでまず卵巣癌細胞株について、ウェスタンプロット法を用いて、ROCK1およびROCK2の発現の有無を検討した。CaOV3、A2780、SKOV3ip1の3種類の卵巣癌細胞株全てにおいてROCK1およびROCK2の発現を確認できた。次に我々はfasudilが卵巣癌細胞の形態およびcell viabilityに与える影響について検討した。もともと円形状をしているCaOV3細胞をfasudilにより前処理したところ、紡錘状になり突起の形成を認めた。これは他のROCK阻害剤を用いた先行研究の結果と矛盾しないものであった。また、cell viability assayを用いた検討により、fasudilはこの実験で用いた30  $\mu$ Mまでの範囲においては、卵巣癌細胞のcell viabilityには影響を与えていないことが明らかとなった。さらに我々は、ボイデンチャンバーを用いたinvasion assayを用いて、LPA

処理した卵巣癌細胞の浸潤能に与えるfasudilの効果を検討した。LPAによって亢進した卵巣癌細胞の浸潤能は、fasudil投与によって有意に抑制された。また、wound healing assayにおいて卵巣癌細胞の移動能に与えるfasudilの効果を検討したところ、LPAによって亢進した卵巣癌細胞の移動能は、fasudil投与により有意に抑制された。

細胞運動にはアクチンファイバーの再構成および接着斑の形成といった細胞骨格系の構造変化が必須である。そこで、アクチンおよび接着斑の構成タンパクの一つであるパキシリンによる蛍光染色を行い、細胞骨格系の変化にfasudilが与える影響について検討したところ、LPAによって亢進したアクチンファイバーの重合および接着斑の形成は、fasudil投与により消失した。また、細胞運動が生じる際にはミオシン軽鎖(myosin light chain, MLC)やパキシリンなどの接着斑タンパクのリン酸化が重要であることがわかつて いる。そこでMLCおよびパキシリンのリン酸化についての影響についてウェスタンプロット法にて検討したところ、LPAによって亢進したMLCおよびパキシリンのリン酸化はfasudil投与により抑制されることがわかつた。

癌細胞の浸潤にはMMPと呼ばれる一群のメタロプロテアーゼ、特にMMP-2およびMMP-9の関与が重要であることが知られている。そこで我々は、卵巣癌細胞におけるfasudilのMMP-2およびMMP-9活性に与える影響について、zelatin zymographyを用いて検討した。興味深いことにLPA投与もfasudil投与も、卵巣癌細胞におけるMMP-2およびMMP-9の活性には影響を与えず、fasudilの効果はMMPの活性化には関与していないことが示唆された。

最後に、我々はヌードマウスを使った卵巣癌腹膜播種モデルを用いて、fasudil投与が卵巣癌の進展にどう影響するかを検討した。この動物モデルにおいて、fasudil投与は腫瘍の増大および腹水の產生を抑制した。

#### 〔 総 括 〕

結果として、fasudilは、LPA/Rho/ROCK系の阻害を介して、細胞運動に必要なアクチンファイバーの再構成、接着斑の形成を阻害し、さらに卵巣癌細胞の浸潤能、移動能を抑制した。また、ヌードマウスを用いた卵巣癌腹膜播種モデルにおいて、fasudilは腫瘍の増大および腹水の產生を抑制した。この研究により、他領域ですでに臨床応用されているfasudilの、卵巣癌治療への応用の可能性が示唆された。

#### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

リゾフォスファチジン酸(lysophosphatidic acid, LPA)は、卵巣癌患者腹水中に多く含まれる生理活性脂質で、低分子量Gタンパク質のRho、さらにその標的蛋白質のRho-associated kinase(ROCK)の活性化を介して、卵巣癌の亢進した浸潤能に関与する。一方、ファスジル(fasudil)は他領域ですでに臨床応用されているROCKの特異的阻害剤である。本研究は、以上の先行研究の知見をふまえたうえで、fasudilの卵巣癌に対する抗腫瘍効果について検討したものである。この研究で、fasudilがLPA処理で亢進した卵巣癌細胞の浸潤能、移動能を抑制すること、またヌードマウスを使った卵巣癌腹膜播種モデルにおいて、fasudil投与は腫瘍の増大および腹水の產生を抑制することが明らかとなった。この研究は、fasudilの卵巣癌治療への応用の可能性を示唆するもので、学位論文に値する。