

An association between clusterin over-expression and taxol-resistance in ovarian cancer

(卵巣癌におけるクラスタリン過剰発現とタキソール耐性との関連)

学位論文内容の要旨

(Background)

Clusterin (CLU) /Apolipoprotein J (ApoJ) is a heterodimeric glycoprotein ubiquitously expressed in all human tissues. CLU has been implicated in several physiologic processes as well as sensitivity to chemotherapy in many cancers. We, therefore, studied the effect of taxol (TX) on the expression and localization of CLU in TX-sensitive and resistant ovarian cancer cell lines. Although some studies reported CLU upregulation as an apoptotic response, the precise relationship between CLU gene expression and programmed cell death has not been elucidated. In this study we investigated the relationship between CLU expression and chemoresponse /chemoresistance in the ovarian model.

(Material and methods)

We treated the ovarian cancer cells (KF) and their taxol-resistant counterpart (KF-TX) with TX in a dose and time course and checked the expression by western blotting. Confocal microscopy study and sub-cellular fractionation were performed to detect the intracellular trafficking and distribution of CLU inside the cells in response to TX treatment. Also, siRNA targeted the secreted isoform of CLU was transfected into resistant cells and apoptotic outcome was estimated using FACS analysis and viability assay. Stable clones expressing CLU was established from OVK18 cells. Finally, immunohistochemical study was performed on sets of primary and recurrent clinical ovarian cancer tissues to map out the relationship between CLU and chemoresponse.

(Results)

CLU expression was higher in KF-TX than in KF. In KF, full length CLU (60 KDa) was up-regulated in response to TX treatment in a time and dose dependent manner, while no rapid increase of this CLU expression in KF-TX. Cleaved secretory CLU (sCLU; 40KDa) was upregulated as an early event in both cells and rapidly decreased with high doses of TX in KF cells. That decrease started with higher dose in KF-TX cells. The same expression pattern was observed in the culture media from same experiment when sCLU was checked in. Confocal microscopy and sub-cellular fractionation studies revealed cytosolic accumulation of CLU in the resistant cells more than that in sensitive after TX treatment. CLU mRNA was selectively amenable to specific degradation by small interference siRNA which designated to target CLU.

Transfection of KF-TX cells with CLU-siRNA caused taxol to induce much greater amount of apoptosis in these cells, than those cells transfected by control siRNA as confirmed by DNA ladder, FACS analysis and viability assay. Moreover, exogenous full

length CLU renders OVK18 cells chemoresistant proving that full length CLU is essential for the ovarian cancer cells to resist TX. Clonogenic assay under TX confirmed the importance of CLU for cells to develop chemoresistance. Immunohistochemical results of ovarian cancer tissues indicated accumulation of CLU in the persistent recurrent tumors compared with their primary ones while the responsive recurrent tumors showed less CLU expression. That expression was lower when compared with their primary ones.

(Conclusion)

This work demonstrates that alterations in CLU biogenesis are induced during chemoresistance development, apparently as a result of changes in expression and proteolytic processing. These alterations lead to accumulation of the protein. More precisely, specific overexpression of full length CLU induces chemoresistant phenotype when accumulated inside the ovarian cancer cells. Thus, CLU appears to be an important protein that mediates the regulation of chemotherapy-induced apoptosis. Taken together, our results suggest that full length CLU upregulation positively correlates with the development of chemoresistance. Full length CLU overexpression along with chemotherapy could be a potential new predictive marker for chemoresistance in ovarian cancer. Molecular therapy targeting CLU may restore the sensitivity to some chemotherapeutic agents as a new approach for ovarian cancer therapy.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 櫻 木 範 明

副 査 教 授 福 田 諭

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学 位 論 文 題 名

An association between clusterin over-expression and taxol-resistance in ovarian cancer

(卵巣癌におけるクラスタリン過剰発現とタキソール耐性との関連)

クラスタリン (CLU)は幾つかの生理的機能を有するとともに多くの癌において化学療法に対する耐性に関与していることが示されている。CLUの発現と局在が卵巣癌治療のkey drugであるタキソールに対する感受性や耐性に及ぼす影響を明らかにすることを目的に本研究を行った。CLUにはアポトーシス抑制作用のあるsecretory CLUとアポトーシス促進作用のあるintracellular CLUのisoformがある。タキソール耐性卵巣癌細胞KF-TXにおけるCLU発現はその親細胞であるKFよりも高かった。secretory CLUはタキソール処理によりKF, KF-TXともに初期に発現が増加したが、KFでは高濃度のタキソール処理により急速に減少した。共焦点顕微鏡と細胞分画を用いての検討で、KF-TXではKFと異なりCLUが細胞内に局在することが認められた。KF-TXにCLU siRNAを導入しタキソールで処理すると、control siRNAを導入した細胞に比べて顕著なアポトーシスを誘導できた。一方、secretory CLUのprecursorであるfull length CLUを卵巣癌細胞OVK18に導入するとOVK18はタキソール耐性となり、full length CLUがタキソール耐性獲得に必要であることが示された。卵巣癌臨床検体を用いての免疫組織化学的検討により、治療に反応せず残存する腫瘍あるいは寛解後早期に再燃した腫瘍と治療に反応し寛解後長期間を経てから再発した腫瘍ではCLUの局在に違いが認められた。すなわち、前者では原発病巣、再発病巣にCLU局在が強く認められ、後者ではCLU発現が低いことが観察された。これらの結果は卵巣癌のタキソール耐性獲得過程において、CLU遺伝子発現やタンパク転写後修飾の変化が起こることを示している。とくにfull length CLUの蓄積は卵巣癌のタキソール耐性を誘導し、アポトーシスを阻害する。full length CLUの過剰発現は卵巣癌のタキソール耐性を予測する指標となりうると考えられ、CLUをターゲットとした分子標的治療は卵巣癌のタキソール耐性を解除する新しい治療法とな

る可能性があると考えられる。

公開発表終了後、副査の福田教授から、1) cisplatin など他の薬剤に対する耐性と CLU 過剰発現との関連、2) chemosensitivity の予測因子として将来的な臨床応用を考えた時、血清での測定は可能か、また可能であれば治療前と治療後、chemosensitive 例と chemoresistant 例での preliminary な結果は持っているかについて質問があった。副査の秋田教授からは、1) CLU の biomarker としての意義、2) 他の癌腫における CLU の発現について質問があった。主査の櫻木教授から、1) 内因性抗がん剤耐性で知られる卵巣明細胞腺癌における CLU の発現、2) CLU をターゲットとした分子標的治療の臨床応用の可能性について質問があった。これらの質問に対して、申請者は自身のこれまでの研究成績や文献的情報をもとに概ね妥当な回答をなした。

本論文は卵巣癌のタキソール耐性における CLU の関与とそのメカニズムを明らかにしたものであり、今後 CLU を標的とした卵巣癌治療法開発の可能性を示したことで高く評価される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。