

氏名	宇井 崇 ^{うい たかし}
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 441 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 19 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	食道扁平上皮癌における抗癌剤抵抗性の克服
論文審査委員	(委員長) 教授 前田 貢 作 (委員) 准教授 西野 宏 准教授 金井 信 行

論文内容の要旨

1 研究目的

食道癌は消化管における最も悪性度の高い癌の一つである。手術・化学療法・放射線療法・化学放射線療法などの集学的治療が行われているが、治療成績は未だ満足できるものではなく、更なる成績の改善が期待される。術前化学療法で docetaxel, cisplatin, 5fluorouracil の 3 剤併用により治療成績の改善が得られたことを報告したが未だ治療無効例が 37%に存在している。抗癌剤抵抗性の克服は癌治療におけるブレイクスルーになると期待される。本研究では食道扁平上皮癌細胞株を用いて薬剤耐性癌細胞株の遺伝子発現を網羅的に解析し、従来では用いられていない分子標的治療のターゲットの発見と、既存薬剤との併用による食道扁平上皮癌の新たな治療戦略への応用を目指した。

2 研究方法

食道扁平上皮癌細胞株 22 株を用いた。これら食道扁平上皮癌細胞株に関しては癌の heterogeneity を考慮し、セルバンクより購入可能な全ての細胞株を取得した。阻害剤は cisplatin (CDDP), docetaxel, 5-fluorouracil (5-FU), heat shock protein 90 (HSP90)阻害剤である 17-N-allylamino-17-demethoxy geldanamycin (17-AAG), proteasome 阻害剤である Bortezomib と MG-132, Akt 阻害剤の MK-2206 を用いた。薬剤感受性試験は 96well プレートを用いて行い、water-soluble tetrazolium salt を用いてマイクロプレート吸光度で測定した。遺伝子発現解析は oligonucleotide microarray (GeneChip Human Genome U133A) を使用し、Genome Imbalance Map algorithm にて mRNA 解析し Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を用いて遺伝子群の解析を行った。薬剤併用の効果は Combination Index を算出して検討した。薬物併用による細胞毒性の経時変化を観察した。また癌の増殖・アポトーシスの様式をタイムラプス撮影した。タンパク質発現をウエスタンブロット解析した。RNA 干渉には XIAP に対する siRNA を用いて negative control とタンパク質発現や細胞数の変化を比較した。

3 研究成果

食道扁平上皮癌細胞株の docetaxel, CDDP, 5-FU の感受性試験を行い、IC50 を決定した。docetaxel の IC50 は 0.547nM から 4.39nM、CDDP の IC50 は 0.983 μ M から 14.9 μ M、5-FU の

IC50 は 2.10 μ M から 42.4 μ M だった。この IC50 に基づきクラスター解析を行い、3 薬剤の低感受性群(耐性株群)を TE4, KYSE30, EC-GI-10, TE6, TE14 の 5 株とし、高感受性群を TT, TTN, KYSE140, TE11, KYSE270, KYSE220, KYSE150, KYSE180 の 8 株とした。低感受性群と高感受性群の特異的遺伝子発現を検出するため GSEA を用いた。低感受性群で高発現の遺伝子セットとして、KEGG_RIBOSOME, KEGG_PROTEASOME, KEGG_LINOLEIC_ACID_METABOLISM, KEGG_PARKINSON_DISEASE を得た。この結果からタンパクの恒常性が重要と考えられた。プロテアソーム阻害剤と 3 薬剤の相互作用を検討したが相乗効果は得られなかった。次に HSP90 阻害剤である 17-AAG と 3 薬剤の相互作用を検討したところ、KYSE30 および KYSE150 において CDDP と 17-AAG の相乗作用を認めた。docetaxel と 5-FU は相乗作用を認めなかった。タイムラプス撮影では KYSE30 において CDDP と 17-AAG の併用は単剤投与に比較しアポトーシス誘導を認めた。KYSE30 および KYSE150 においてタンパク質発現を検討すると CDDP と 17-AAG の併用により単剤投与に比べ PARP の活性化は経時的増加を呈した。これは phosphorylated Akt および XIAP の発現抑制に伴うアポトーシス誘導を示していた。XIAP を siRNA で発現抑制すると細胞減少が誘導された。

4 考察

本研究は CDDP 耐性食道扁平上皮癌において、CDDP と 17-AAG の相乗効果を初めて示した。単剤では殆ど細胞毒性を生じない低濃度の 17-AAG が存在することで、CDDP の細胞毒性が増し、強い抗腫瘍効果を得ることが出来た。この細胞毒性は PARP と caspase 3/7 の活性化を介して起こるアポトーシスによって生じていた。この機序としては、CDDP と 17-AAG の併用により先ず phosphorylated Akt が減少し、その後に XIAP が低下、それと同時に PARP が活性化され始め、時間経過とともに PARP の活性化はより高度になり、アポトーシスが強力に誘導されると考えられた。一方、Akt 阻害剤を用いて phosphorylated Akt を阻害すると XIAP の発現も抑制され、また、XIAP を siRNA で発現抑制すると細胞死を導くことができることから、XIAP の活性化が KYSE30 および KYSE150 の生存・増殖に重要な役割を持つことが示された。これらの結果から、CDDP と 17-AAG の併用により、phosphorylated Akt が抑制され、XIAP が減少して Caspase-9, -3, -7 の活性が亢進し、PARP が活性化してアポトーシスを誘導し、強い抗腫瘍効果が得られたと考えられる。

5 結論

本研究は低濃度 CDDP と低濃度 HSP90 阻害剤(17-AAG)の組み合わせで、CDDP 耐性食道扁平上皮癌細胞株における相乗効果を示した。この機序は Akt/XIAP の downregulation によりアポトーシスを誘導していた。

論文審査の結果の要旨

食道癌は消化管における最も悪性度の高い癌の一つである。集学的治療の進歩により治療成績の向上が得られてはいるものの、未だ満足できるものではなく、更なる改善が期待され

る。

本研究は、従来用いられていない分子標的治療のターゲットの発見と、既存薬剤との併用による抗癌剤抵抗性の克服の可能性を示唆する、極めて臨床的意義の高い研究と判断した。低濃度の cisplatin (CDDP) と低濃度の HSP90 阻害剤 (17-AAG) の組み合わせにより、CDDP 耐性食道扁平上皮癌細胞株のアポトーシス誘導に成功し、強い抗腫瘍効果が得られる事を明らかにした。

今後 in vivo から in vitro へ研究を展開していく事で臨床応用が期待される、優れた研究であると評価された。論文に関しては、使用されている用語にやや不適切なものが有るとの指摘を受けたが、申請者はこれらに適切な対応を示し、論文に改訂を加えた。最終的に、審査委員全員により博士学位論文に値するものと判断された。

最終試験の結果の要旨

申請者は、研究の背景、目的、方法、結果、考察について論理的にかつ明確に発表を行い、質問に対しても概ね適切に回答した。

本研究は悪性度の高い食道癌に対して、治療成績の向上のために術前化学療法の新たな展開を目指した研究である。中心となる抗癌剤抵抗性の克服は癌治療におけるブレイクスルーとなる内容として評価でき、臨床的意義は極めて高い。

申請者は指摘された問題点についても適切に応答できた。研究態度は真摯であり、周辺分野に関する知識も豊富で、申請者は博士の学位を授与するにふさわしいと、全員一致で判断した。