

岩手医科大学審査学位論文の要旨 (博士)

2 種類のヒト大腸がん細胞株に対するイリノテカンと 5-アザ-2'-デオキシシチジン併用における感受性増強の分子メカニズム

(博多修子)

I. 研究目的

大腸がんは日本のみならず世界的に患者数が多く、罹患数および死亡数も増加傾向にある。イリノテカン (CPT-11) は大腸がん治療において重要な既存の抗悪性腫瘍薬のひとつである。CPT-11 は体内で活性代謝物である SN-38 に変換されて抗腫瘍効果を発揮する。しかし、重篤な副作用や、がん細胞の薬剤耐性獲得といった問題点がある。近年、新しい抗悪性腫瘍薬として DNA メチル基転移酵素阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤といったエピジェネティクス修飾薬が登場した。これらは未だ血液系のがんにしか適応がないが、既存抗がん剤との併用による固形がんへの応用が期待されている。本研究では、ヒト大腸がん細胞株に DNA メチル基転移酵素阻害剤である 5-アザ-2'-デオキシシチジン (DAC) と CPT-11 または SN-38 を併用させたときに得られる抗腫瘍効果増強の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

II. 研究対象ならびに方法

ヒト大腸がん細胞株 HCT116 および HT29 を用いて、CPT-11 と DAC または SN-38 と DAC 併用による薬剤感受性の変動をコロニー形成法により評価した。このとき、CPT-11 と SN-38 の抗腫瘍効果の変動を評価するため、DAC はほぼ殺細胞効果を示さない濃度に設定した。また、ウエスタンブロット法で薬剤処理時の Bcl-2 ファミリータンパクと、Bcl-2 の転写調節因子 WT1 (ウィルムス腫瘍タンパク) の発現変動解析を行った。HCT116 細胞については、Combination Index による薬剤併用効果の評価、および WT1 RNAi による WT1 ノックダウンと、WT1 ノックダウン時の Bcl-2 タンパクの発現変動解析をウエスタンブロット法にて行った。なお、WT1 RNAi では、WT1 siRNA トランスフェクション 12 時間後および 24 時間後のサンプルについて解析した。

III. 研究結果

HCT116 細胞では CPT-11 と DAC 併用で相加的な、SN-38 と DAC 併用で相乗的な抗腫瘍効果増強を認めた。HT29 細胞では薬剤併用による抗腫瘍効果増強は認めなかった。HCT116 細胞では、薬剤併用群において、抗アポトーシス分子である Bcl-2 タンパクの発現レベルが対照群の 10% 未満にまで低下していた。一方で、HT29 細胞は、内在性 Bcl-2 タンパクの発現が極めて低く、検出限界以下であった。他の Bcl-2 ファミリータンパク (Bcl-xL, BAK1, BAX) については、両細胞間に顕著な差異は認められなかった。両細胞間で共通していたのは、薬剤併用によって WT1 タンパクの発現レベルが顕著に抑制されるという事象であった。さらに、HCT116 細胞への WT1 siRNA 導入から 12 時間後では WT1 タンパクの発現抑制および Bcl-2 タンパクの発現抑制が確認された。また、24 時間後には WT1 タンパクの発現レベルがやや回復しており、それに伴い Bcl-2

タンパクの発現レベルも回復傾向にあった。

IV. 考 按

WT1 RNAi の結果より、ヒト大腸がん細胞株において、WT1 タンパクは Bcl-2 を正に転写調節していると考えられた。また、薬剤併用に対する応答性が異なる 2 細胞間での大きな差異は、内在性 Bcl-2 タンパクの発現レベルであった。一方、2 剤併用によって、Bcl-2 の転写を促進させる WT1 タンパクは両細胞間で顕著に発現が抑制されたことから、この CPT-11 または SN-38 と DAC の併用による抗腫瘍効果増強には、WT1 の発現抑制と、それに付随する Bcl-2 の発現低下、すなわち、WT1-Bcl-2 経路の不活性化が重要な分子メカニズムのひとつであると結論した。

V. 結 語

本研究では、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 において、それ自体では殺細胞効果を示さない濃度の DAC が CPT-11 や SN-38 の抗腫瘍効果を増強させることを見出した。この分子メカニズム解析の一環として、WT1 タンパクが Bcl-2 の正の転写調節因子であることを明らかにした。また、DAC と CPT-11 または SN-38 の併用による抗腫瘍効果増強には、WT1-Bcl-2 経路の存在と、そのダウンレギュレーションが必要である可能性を示した。

この低濃度 DAC による CPT-11 や SN-38 の抗腫瘍効果増強における、DAC の作用を明らかにすることは本研究で得られた知見をさらに発展させると考えられる。すなわち、大腸がんに対する DAC とイリノテカンの併用療法における新たな標的分子発見に繋がる可能性があり、今後の有用な研究課題であると考えられる。

論文審査の結果の要旨（博士課程）

審査担当者

主査	教授	那谷耕司（臨床医化学講座）
副査	教授	中西真弓（機能生化学講座）
副査	教授	西谷直之（情報薬科学講座）

論文審査の結果の要旨

本研究では、DNAメチル基転移酵素阻害剤である5-アザ-2'-デオキシシチジン(DAC)とイリノテカン(CPT-11)およびその代謝産物であるSN-38の併用によるヒト大腸がん細胞株の増殖抑制効果とその分子メカニズムを明らかにすることを目的としている。本学位論文は主論文(Hakata et al. Oncology Letters, 15(3), 2018)の内容を中心に組み立てられており、DACとCPT-11またはSN-38の併用が大腸がん細胞株HCT116に対する抗腫瘍効果の増強をもたらすことを明らかにし、この抗腫瘍効果増強は、抗アポトーシスタンパク質Bcl-2の遺伝子の転写を促進するWT1タンパク質の発現抑制とその結果としてのBcl-2タンパク質の発現低下によるものであると考察している。

本学位論文の研究内容は、薬剤の併用による効果的ながん薬物療法を追求する上で基盤となるものであり、審査担当者による協議の結果、大学院博士課程教育として望まれるテーマ設定と研究成果であることが評価できるとの結論になった。審査担当者からは下記の意見が上げられており、この意見に従い学位論文を修正することが望まれる。

- ・DNAメチル基転移酵素阻害を起こさない濃度のDACが細胞増殖抑制効果を発揮し、CPT-11の作用を増強することは、新規の発見と考えられる。
- ・「分子メカニズム」の解明を目的としているが、真のメカニズム解明には至っていないと考えられる。
- ・WT1やBCL-2の関与について検討した点は評価に値するが、併用効果との直接的な関連性は示されていない。
- ・2剤の併用効果をCombination Indexを用いて解析した結果の解釈については、改訂が必要と考えられる。

試験・試問の結果の要旨

適切な図を作成するなど発表時に用いた資料の準備状況は良好で、研究内容を明瞭に説明していた。また、発表後の質疑応答での態度は良好で、質問にはその意図を的確に捉えて事実を誠実に答えており、試験・試問の結果としては合格と認められる。