低酸素によって誘導される Pim-1 は 固形癌の薬剤抵抗性と生体内増殖に関与する

(Pim-1 induced by hypoxia is involved
in drug resistance of solid tumor cells)

学位論文内容の要旨

発育の速い癌ほど血流が不足しているとされている。これは腫瘍細胞の増殖が血管内皮細胞のそれより速いからと考えられており、また、新しく形成された血管網の機能が不十分であるからとされている。癌組織の酸素分圧が低ければ抗がん剤耐性の高いこと、放射線感受性の低いことがすでに報告されている。これらの報告は、癌組織の低酸素状態が何らかの抗アポトーシス因子を誘導する可能性を示唆している。本研究では、低酸素状態が抗癌剤耐性にするという従来の報告を確認するために、固形癌細胞の正常酸素分圧下と低酸素分圧下の抗がん剤感受性を検討した。実験に使用した膀胱癌細胞株は、低酸素にさらされると CDDP を含めて多くの抗癌剤に耐性となる事を確認した。しかしながら、同じ膀胱癌細胞株が抗 Fas 抗体誘導アポトーシスに対しては、低酸素下で感受性がより高くなることから、低酸素は、何らかの特異的な抗アポトーシス因子を誘導する可能性が高いと考えられた。

最近の報告によれば、低酸素はいくつかの抗アポトーシス因子を誘導し、それが抗がん剤耐性に関与していると報告されている。しかしながら、細胞死や生存に直接関与する Hypoxia 誘導遺伝子についての報告は少なく、不明な点が多い。そこで本研究では、DNA マイクロアレー法によって、低酸素誘導抗アポトーシス因子を検索したところ、Pim-1 が候補の一つとして同定された。Pim-1 は MuLV 発症 T リンパ腫で Proviral Insertion が起こり、活性化する遺伝子として単離された。Pim-1 はセリン・スレオニンカイネースの一種であり、造血細胞ではアポトーシスを抑制するサバイバル因子と報告されてきた。最近、Pim-1 が発生過程において造血細胞以外にも働いている可能性が示唆されたため、固形癌における Pim-1 の役割について検討することにした。まずいくつかの固形癌細胞株を用いて、低酸素分圧と正常酸素分圧下での Pim-1 発現を検索した。次に、Dominant negative Pim-1 導入株を作製し、Pim-1 の低酸素下での薬剤耐性における役割を検討した。さらに in vivo における Pim-1 の役割を検討するため、SCID マウスを用いて Dominant negative Pim-1 導入株の造腫瘍性を調べた。

その結果、1) 低酸素下では膀胱癌細胞株のアドリアマイシン、Gemcitabine、CDDP に対する IC50 が 2-6 倍に増加した。2) 低酸素下では CDDP 誘導アポトーシスが約半分減少し、低酸素下では

アポトーシス抵抗性となることが確認された。3) DNA microarray にて低酸素下で発現亢進する遺伝子のなかで、アポトーシス抵抗性に関与する遺伝子候補として Pim-1 を同定した。4) 低酸素下での各種固形癌細胞株における Pim-1 発現の亢進を Northern blot および Western blot 法にて確認した。5) Pim-1 の機能を抑制する dominant negative Pim-1 導入株を作製して抗癌剤感受性を検討したところ、vector 導入株では低酸素下で CDDP に対して抵抗性となるのにたいして、dominant negative Pim-1 導入株は低酸素下でも正常酸素分圧下でも同様の CDDP 感受性を示した。

以上の結果より、1) Serine/Threonine Kinase である Pim-1 の発現が低酸素下で膀胱癌細胞株を含めて固形癌細胞株に誘導された。2) 膀胱癌細胞株は Normoxia 下より Hypoxia 下のほうが抗がん剤耐性であった。3) Dn Pim-1 導入によって、Hypoxia 下の膀胱癌細胞株の抗がん剤耐性が解除された。4) Dn Pim-1 導入によって膀胱癌細胞の造腫瘍性も消失した。という新しい事実を明らかにした。

Pim-1 は MuLV 発症 T リンパ腫で Proviral insertion が起こり、活性化する遺伝子である。Serine/threonine Kinase である Pim-1 は造血細胞の増殖因子欠乏に伴うアポトーシスを抑制するサバイバル因子として報告されている。さらに、最近の報告によれば、Pim-1 タンパクはミトコンドリアの機能調節に関与すると言われている。こうした報告は、Pim-1 が白血病細胞だけではなく、固形癌細胞にも一般的な抗アポトーシス因子として機能していると推測することを支持すると思われる。しかしながら、従来報告では、膀胱癌、卵巣癌、子宮頸癌と白血病で発現を認めるとする報告以外に、今日まで固形癌における Pim-1 の役割に関しては報告がなかった。本研究は Hypoxia 状態下で膀胱癌細胞が数種類の抗がん剤に耐性を示すことを明らかにした。また、Hypoxia では抗がん剤誘導アポトーシスに抵抗性を示した細胞が、Pim-1 の機能を抑制する dn Pim-1 導入によって抗癌剤感受性が高くなった。この結果により、Hypoxia 下における膀胱癌細胞の Pim-1 発現が低酸素誘導抗がん剤耐性に重要な役割を担っている可能性が示唆される。Pim-1 が造血細胞の抗癌剤誘導細胞死を抑制したという報告は今回のデータと一致した。しかしながら、Anti-Fas Antibody への感受性は Pim-1 の機能を抑制しても影響がないことから Pim-1 誘導抗がん剤耐性は Fas/FasL の Death Signal Transduction Pathway と関係がないと考えられる。哺乳類細胞の2つのメジャーな apoptosis signal 伝達経路としては、Fas/FasL Death Receptor Pathway とミトコンドリア Pathway が知られている。Fas/FasL を介する Death Signal はミトコンドリア経路をバイパスでき直接キヤスペースを活性化できるとされている。しかし最近、新しい bcl-2ファミリータンパクの Bid がミトコンドリア Pathway と Fas/FasL Death Receptor Signal を連結していると報告された。Pim-1 の機能を抑制しても Anti-Fas Antibody の感受性が影響されない今回の結果は、Pim-1 が Bid を介してミトコンドリア Pathway と Fas/FasL Death Receptor Signal 経路が連結する前で働いている可能性が高いと考えられる。

Pim-1 の薬剤耐性の、Dn Pim-1 Transfectants の腫瘍組織のほうがアポトーシス細胞が多いという今回の結果は、Pim-1 が少なくとも膀胱癌細胞の in vivo のサバイバルに重要な働きをしている可能性を示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 田 博
副 査 教 授 向 後 隆 男
副 査 教 授 鈴 木 邦 明
副 査 助 教 授 小 林 正 伸 (遺制研・癌病態)

学 位 論 文 題 名

低酸素によって誘導される Pim-1 は 固形癌の薬剤抵抗性と生体内増殖に関与する

(Pim-1 induced by hypoxia is involved
in drug resistance of solid tumor cells)

審査は向後、鈴木、小林、福田審査員全員が一堂に会し、口頭で行われた。まず、申請者から提出論文の内容の説明を受けた。概要は以下の通りである。

論文の概要

腫瘍組織は癌細胞の増殖に比較して血管内皮細胞の増殖が追いつかないなどのため、血流不足となりその結果、低酸素や低栄養状態に曝されている。実際、正常組織と癌組織の酸素分圧を計測した結果、正常組織は 50mmHg、すなわち7%の酸素濃度に対して腫瘍組織は 10mmHg、1.4%の酸素濃度と低かった。酸素濃度の低い癌ほど抗がん剤耐性や放射線感受性の低いことが知られている。そのメカニズムとして、低酸素下ではアポトーシス抵抗性に関与する因子の発現が亢進するのではないかと仮説を立て検討した。

はじめに、低酸素分圧 (Hypoxia) 下と正常酸素分圧 (Normoxia) 下での癌細胞の抗癌剤感受性を検討した結果、Normoxia より Hypoxia のほうが抵抗性を示した。さらに CDDP のほかに2種類の抗がん剤 (Gemcitabine, ADR) について検討した結果、やはり Normoxia より Hypoxia 下で耐性だった。低酸素になると、HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 α) という転写活性因子が発現し、その下流にある嫌気性代謝、血管新生、血管拡張、造血機能などの遺伝子を活性化して低酸素を克服すると報告されていたが、抗がん剤耐性についてはまだ報告されていなかった。

そこで、DNA microarray 法を用いて低酸素下で発現亢進する遺伝子を網羅的に検索し、アポトーシス抵抗性に働き得る遺伝子の Pim-1 を同定した。低酸素下での各種固形癌細胞株における Pim-1 発現を Northern blot および Western blot 法にて確認したところ、検索したすべての細胞株

においてHypoxia 下で発現亢進を認めた。Pim-1 が本当に抗がん剤耐性に関与しているのかを証明するために、Pim-1 の機能を抑制する dominant negative Pim-1 導入株を作製して抗癌剤感受性を検討した。その結果、vector 導入株では低酸素下で CDDP に対して抵抗性となるのに対して、dominant negative Pim-1 導入株は低酸素下でも正常酸素分圧下でも同様の CDDP 感受性を示した。

生体内でも同様な結果が得られるかを SCID マウスモデルで検討した。Vector 導入株においては腫瘍増殖を認めたが、DnPim-1 を移植した場合には一旦増殖した後退縮した。つまり dominant negative Pim-1 導入株では、抗癌剤耐性どころか造腫瘍性を失っていた。この原因としては、生体内では低酸素と同時に低栄養にもなっており、低酸素・低栄養下でのアポトーシス感受性に違いがあると考え、低酸素・低栄養下における Transfectants の生存を検討した。Dominant negative Pim-1 導入株は、Vector control に比較して低酸素・低栄養で誘導されるアポトーシスに対する感受性を部分的に回復していた。これによって、造腫瘍性喪失のメカニズムの一部を説明できる可能性があるが、他の機序も今後検討する必要があると思われる。

ついで各審査員から申請者に対し、本論文の内容とそれに関連する種々の質問が行なわれた。主な質問は以下の通りである。

- 1) 造腫瘍性とはどういう意味か。
- 2) Pim-1 は発癌に必要なか。
- 3) 膵臓癌は VEGF など血管新生因子を作っているのか。
- 4) 膵臓癌細胞株以外の細胞株も Pim-1 の発現があるのか。
- 5) 膵臓癌細胞株の DnPim-1 ではなく、血管新生が豊富な細胞株の DnPim-1 だったら腫瘍は生着するのではないか。
- 6) 酸素分圧の低い腫瘍組織の抗がん剤耐性、放射線感受性は報告されているのか。
- 7) 抗がん剤や放射線による感受性はアポトーシスなのか Necrosis なのか。
- 8) 低栄養とはどういうことか。
- 9) 膵臓癌の転移と栄養供給はリンパ管と関連性あるのか。
- 10) アポトーシスに関するほかの機序調べているのか。

これらの質問に対して申請者は明快に回答し、申請者は本研究を中心に十分な知識を有すると認められ、また、本研究内容が高く評価された。

以上より、申請者は博士(歯学)の授与に値すると判断された。