

学位論文題名

Increased mitochondrial DNA induces acquired docetaxel resistance in head and neck cancer cells

(頭頸部癌細胞においてミトコンドリア DNA の増加は
ドセタキセル耐性を引き起こす)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

新しいタキソイド系抗悪性腫瘍剤であるドセタキセルは本邦において2004年4月より頭頸部癌への適応が認められて以来、化学放射線併用療法や化学療法に広く用いられるようになり、頭頸部癌治療の Key Drug となりうる薬剤である。北海道大学病院耳鼻咽喉科では2001年8月よりドセタキセル併用化学放射線療法の第Ⅱ相臨床試験を開始し、初期治療効果が94%との成績を残したが、CRに至らない例や再発例も存在し、ドセタキセル耐性は临床上重要な問題である。しかしながら現在のところ頭頸部癌におけるドセタキセル耐性の機序解明やドセタキセル耐性株樹立の報告はない。

ミトコンドリア DNA はミトコンドリア内に存在する16569塩基からなる環状の DNA で、ミトコンドリア DNA の変異やコピー数の増減は発癌や抗癌剤耐性に関与することが報告されている。

本研究ではヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株を用いドセタキセルに対する耐性株を樹立し、ミトコンドリア DNA 量を比較することによりドセタキセル耐性の機序解明を試みた。

【材料と方法】

1) ドセタキセル耐性頭頸部扁平上皮癌細胞株の樹立

ヒト喉頭扁平上皮癌細胞株である HEp2 にドセタキセルを10 nM から160 nM まで段階的に濃度を上げて処理することにより耐性を獲得させた。得られた耐性細胞株 DRHEp2 はドセタキセル160 nM を含む培地で継代維持した。ドセタキセルに対する生存率の測定にはクリスタルバイオレット法を用いた。

2) 親株とドセタキセル耐性株におけるミトコンドリア DNA 量の比較

親株とドセタキセル耐性株におけるミトコンドリア DNA 量を用いて比較した。親株およびドセタキセル耐性株から1細胞を採取、DNA を抽出して long-distance nested PCR 法を用いてミトコンドリア DNA を増幅し、増幅産物を電気泳動にて比較した。また、サザンブロット法も行いミトコンドリア DNA 量を比較した。

3) 親株とドセタキセル耐性株におけるドセタキセル投与の有無による活性酸素産生量の比較

親株とドセタキセル耐性株において活性酸素の産生量を dihydroethidium を用いてフローサイトメトリーで測定した。また、ドセタキセルを加えたときの活性酸素産生量の変化も検討した。

【結果】

1) ドセタキセル耐性頭頸部扁平上皮癌細胞株の樹立

ドセタキセル耐性ヒト喉頭扁平上皮癌細胞株 DRHEp2 は親株である HEp2 と比較して約 75 倍の耐性を有した。

2) 親株とドセタキセル耐性株におけるミトコンドリア DNA 量の比較

long-distance nested PCR 法およびサザンブロット法においてドセタキセル耐性株は親株よりもミトコンドリア DNA 量が増加していた。耐性株にミトコンドリア DNA 量を減少させる臭化エチジウムで処理したところ、ミトコンドリア DNA 量は減少し、ドセタキセルに対する感受性も未処理の耐性株に比べ亢進していた。さらにドセタキセル耐性株は親株に比べ酸素消費量は亢進していた。ミトコンドリアの呼吸鎖を選択的に阻害する薬剤が耐性を解除できるか検討したところ、Fo-ATPase の選択的阻害薬であるオリゴマイシン A のみが耐性を解除できた。RNAi 法を用いて耐性株において Fo-ATPase の d-subunit の発現を抑えたところ、ドセタキセルに対する感受性は亢進した。

3) 親株とドセタキセル耐性株におけるドセタキセル投与の有無による活性酸素産生量の比較

ドセタキセル未処理下では、親株に比べて耐性株では活性酸素の産生量は減少していた。親株をドセタキセルで処理すると活性酸素の産生は濃度依存的に亢進したが、耐性株ではわずかの増加のみであった。また、親株を抗酸化剤である pyrrolidine dithiocarbamate で処理すると、ドセタキセルによる細胞死は抑制された。さらに、耐性株をドセタキセルおよびオリゴマイシン A で処理したものはドセタキセルのみで処理したものに比べて活性酸素の産生は明らかに亢進した。

【考察】

本研究において、ドセタキセル耐性株は親株に比べミトコンドリア DNA の量が増加していることが明らかになった。ミトコンドリア DNA の増加がドセタキセル耐性にどのような役割を持つかを調べるために、ミトコンドリアの呼吸鎖の選択的阻害薬を用いたところ、Fo-ATPase の選択的阻害薬であるオリゴマイシン A のみが耐性を解除できた。RNAi 法を用いて耐性株において Fo-ATPase の d-subunit の発現を抑えたところ、ドセタキセルに対する感受性は亢進した。このことから Fo-ATPase の増加がドセタキセル耐性獲得に関与していることが示唆された。また、耐性株をドセタキセルおよびオリゴマイシン A で処理したものはドセタキセルのみで処理したものに比べ活性酸素の産生は亢進した。オリゴマイシン A が Fo-ATPase を阻害することによりプロトンの移動がブロックされ、ミトコンドリアの膜電位が上昇することにより、自由電子が増加し、活性酸素の産生が亢進するものと思われる。

以上より、耐性株ではミトコンドリア DNA 量が増加し、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 V の Fo 部分が活性化されることにより活性酸素の発生が抑制されドセタキセル耐性を獲得することが考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 白 土 博 樹
副 査 教 授 福 田 諭

学位論文題名

Increased mitochondrial DNA induces acquired docetaxel resistance in head and neck cancer cells

(頭頸部癌細胞においてミトコンドリア DNA の増加は
ドセタキセル耐性を引き起こす)

新しいタキソイド系抗悪性腫瘍剤であるドセタキセルは各臓器の悪性腫瘍の治療に広く用いられている。しかし、ドセタキセル耐性症例も存在し、ドセタキセル耐性は临床上重要な問題である。また、現在のところ頭頸部癌におけるドセタキセル耐性の機序解明やドセタキセル耐性株樹立の報告はない。

ミトコンドリア DNA (以下 mtDNA) はミトコンドリア内に存在する環状の DNA で、mtDNA の変異や数の増減は発癌や抗癌剤耐性に関与することが報告されている。

本研究ではヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株を用いドセタキセルに対する耐性株を樹立し、mtDNA 量を比較することによりドセタキセル耐性の機序解明を試みた。

本研究において、ドセタキセル耐性株は親株に比べ mtDNA の量が増加していることが明らかになった。mtDNA の増加がドセタキセル耐性にどのような役割を持つかを調べるために、ミトコンドリアの呼吸鎖の選択的阻害薬を用いたところ、Fo-ATPase の選択的阻害薬であるオリゴマイシン A のみが耐性を解除できた。RNAi 法を用いて耐性株において Fo-ATPase の d-subunit の発現を抑えたところ、ドセタキセルに対する感受性は回復した。このことから Fo-ATPase の増加がドセタキセル耐性獲得に関与していることが示唆された。また、耐性株をドセタキセルおよびオリゴマイシン A で処理したものはドセタキセルのみで処理したものに比べ活性酸素の産生は亢進した。オリゴマイシン A が Fo-ATPase を阻害することによりプロトンの移動がブロックされ、ミトコンドリアの膜電位が上昇することにより、自由電子が増加し、活性酸素の産生が亢進するものと思われる。

以上より、耐性株では mtDNA 量が増加、Fo-ATPase が活性化され、活性酸素の発生が抑制されドセタキセル耐性を獲得することが考えられた。

審査にあたり、副査の白土教授より申請者が mtDNA の減少はシスプラチン耐性になるとの報告があると述べたが、それとの関係はいかかかということ、ドセタキセル耐性を解除できたオリゴマイシン A の毒性を少なくするアイデアはあるかということ、およびドセタキセル耐性株は mtDNA が増加し活性酸素が減少するのではと発表したのが、mtDNA の減少がシスプラチン耐性になるとの報告との関係はどうか、との質問があった。これらの質問に対し、申請者はドセタキセル耐性株ではシスプラチンに対する感受性は親株に比べ亢進しており、ドセタキセルとシスプラチンとの間には相反する耐性メカニズムがあるのではと考えられ、実際臨床で用いられているドセタキセル、シスプラチンおよび 5-FU を組み合わせた TPF 療法は理にかなっていると考えられること、オリゴマイシンのように完全に Fo-ATPase をブロック

するのではなく、本発表で示した Fo-ATPase の一部分を抑制することで毒性を軽減できる可能性があること、mtDNA 減少によりシスプラチン耐性になるという機序は本発表で示した活性酸素によるものとは別の耐性メカニズムが働いているのでは、と回答した。

副査の福田教授よりドセタキセル耐性株において 5-FU、放射線への影響はどうかということ、mtDNA 量の変化は変異、減少、増加の 3 パターンに分かれるが、各癌で異なることの原因、および抗酸化剤の臨床への応用はどうか、との質問があった。これらの質問に対して申請者はドセタキセル耐性株は 5-FU に対する感受性は親株と差がみられなかったが、他の報告では大腸癌細胞においてオリゴマイシン A 処理や Fo-ATPase の d-subunit を RNAi 法にて 5-FU 耐性になるとの報告があること、頭頸部癌や肺癌では mtDNA 量は増加していること、また喫煙者において唾液からの mtDNA 量は非喫煙者に比べ増加しているとの報告があることから、扁平上皮癌においては mtDNA が上昇すると考えられる、また抗酸化剤の臨床応用については本発表で用いた PDTC は毒性が強いが、ビタミン C や E にも抗酸化作用があり、補助治療として期待できるのでは、と回答した。

主査の秋田教授よりドセタキセル耐性株における他の抗癌剤に対する感受性について、ドセタキセル耐性株において mtDNA が増加するメカニズムについて、および薬剤耐性に関する分子マーカーへの応用について質問があった。これらの質問に対し、申請者はドセタキセル耐性株では親株に比べシスプラチンに対する感受性は亢進、5-FU に対しては親株と同様の感受性をもつこと、ドセタキセル耐性株において mtDNA が増加するメカニズムはまだ明らかでないこと、分子標的治療剤との関係は明らかではなく今後の研究課題となる、と回答した。

この論文は、ドセタキセル耐性に対する mtDNA、Fo-ATPase および活性酸素の関与を明らかにした点で高く評価され、今後の抗癌剤耐性メカニズムのさらなる解明に向けて期待されるものである。

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。