

移植固形腫瘍における新規制がん剤エチニルシチジンによる放射線誘発増殖抑制作用の増強効果に関する研究

学位論文内容の要旨

固形腫瘍に対して現在までの放射線治療が十分な治療効果を得ることのできない原因として、多くの腫瘍細胞はがん抑制遺伝子Tp53の変異を持つことや固形腫瘍内に放射線抵抗性低酸素細胞が存在する事が挙げられる。従って、それら抵抗因子を制御する様々な薬剤との併用療法が重要となってきた。本研究で用いた制がん剤エチニルシチジン (ECyd)は既存の薬剤とは異なり、標的細胞のRNA合成を阻害する新規制がん剤である。本研究の目的は、DNA損傷を作用機序とする放射線とこの新規の制がん剤ECydを組み合わせた方法を用いて*in vitro*および*in vivo*における抗腫瘍効果を検討することを目的とした。

様々なTp53 statusを有するマウス由来およびヒト由来の固形腫瘍に対し、3時間前のECyd投与によって、2 GyのX線照射で起こる腫瘍成長抑制は強く増強された。また組織学的検討から、この腫瘍成長抑制の増強効果にアポトーシスの増強と細胞増殖の抑制が関わっていることが明らかとなった。さらに、ECydはアポトーシス誘導を阻害し、かつ細胞分裂を調節するsurvivinの発現を抑制していた。次に、低酸素細胞に対するECydの放射線誘発細胞死への増強効果を*in vitro*実験系および*in vivo*実験系の両面から検討した。まず低酸素培養したヒト胃がん細胞に対してECyd処理とX線照射の併用によって、大気条件と同様にTp53非依存性にアポトーシス誘導の増強が観察された。また低酸素細胞において、ECyd処理による低酸素誘導性転写因子HIF-1 α の発現抑制が明らかとなった。特異的アンチセンスオリゴヌクレオチドによる発現抑制系を用いた実験で、HIF-1 α 発現が抑制された細胞に対するX線照射でアポトーシス誘導が増強された。この事は、ECydによる低酸素細胞に対するX線誘導アポトーシスの増強効果においてHIF-1 α が重要な作用標的であること示唆するものであった。また*in vivo*実験系では、併用処置した腫瘍内の低酸素細胞に*in vitro*の結果と同様アポトーシスが誘導されており、処置12日後の低酸素領域は無処置群やX線単独照射群に比べ有意に縮小していた。

以上の結果から、新規制がん剤ECydがsurvivinの発現を抑制することで腫瘍

細胞に放射線誘発アポトーシスを増強し、細胞増殖についても阻害作用を示した。また低酸素細胞に対しても、survivin発現抑制に加えてHIF-1 α の発現抑制も関与して細胞死を誘導したものと結論づけられる。その細胞死の結果、がん細胞のTp53 statusに関わりなく移植腫瘍の著しい成長抑制を引き起こしたものと考えられる。

本研究で得られた知見は、固形腫瘍に対して新規制がん剤であるECydが放射線による抗腫瘍効果を効率的に高め、低酸素細胞にも細胞死を誘導できる点で有望な放射線増感剤となりうる可能性を示したものであり、その意味は非常に大きいと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 稲 波 修

副 査 教 授 伊 藤 茂 男

副 査 教 授 桑 原 幹 典 (横浜薬科大学)

副 査 准教授 浅 沼 武 敏

学 位 論 文 題 名

移植固形腫瘍における新規制がん剤エチニルシチジンによる放射線誘発増殖抑制作用の増強効果に関する研究

固形腫瘍に対して放射線治療の治療効果を妨げる1つの要因として固形腫瘍内に放射線抵抗性低酸素細胞が存在する事が挙げられる。従って、低酸素で誘導される放射線抵抗性因子を制御する様々な薬剤との併用療法の開発が現在強く望まれている。エチニルシチジン (ECyd)は従来の薬剤とは異なり、標的としてRNA合成系を阻害する新規制がん剤として近年、開発された新規制がん剤である。申請者は放射線照射とこのECyd投与を組み合わせた方法を用いて培養細胞系および移植腫瘍系における抗腫瘍効果、特に低酸素細胞への効果を中心に検討した。

マウス由来大腸がんColon26細胞およびヒト胃腺がん由来MKN45細胞(野生型Tp53)とMKN28細胞(変異型Tp53)において、照射3時間前にECydの腹腔内投与すると、1～2 GyのX線照射によって誘導される腫瘍成長抑制効果を強く増強することが示された。また組織化学的手法を用いた解析によって、この腫瘍成長抑制の増強効果にアポトーシス増強と細胞増殖抑制が関わっていることが明らかとなった。さらに、ECydはアポトーシス誘導を阻害するタンパク質であるsurvivin、増殖を調節するリン酸化ERKならびにリン酸化AKTの発現を有意に抑制することも明らかとなった。次に、申請者は低酸素細胞に対するECydの放射線誘発細胞死への増強効果を検討した。低酸素培養したヒト胃がん細胞に対してECyd処理とX線照射の併用処置を行うことで、大気条件と同様にTp53非依存性アポトーシス誘導の増強が観察された。また本研究において、ECyd処理は低酸素誘導性転写因子HIF-1 α の発現抑制をおこなうことが明らかにされた。HIF-1 α がアポトーシス誘導に対して抑制的に働くこともアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた実験から明らかにされた。以上の事は、ECydによる低酸素細胞に対するX線誘導アポトーシスの増強効果において、HIF-1 α が重要な作用標的であることを示している。またMKN45細胞のマウス移植腫瘍を用いた実験で併用処置した腫瘍内の低酸素細胞にアポトーシスが誘導されており、低酸素領域は無処置群やX線単独照射群と比べ有意に縮小していた。また、ECydは腫瘍内のHIF-1 α 発現領域の縮小を起こすことも示された。以上の結果から、新規制がん剤ECydは移植腫瘍の低酸素細胞についても培養系と同様にHIF-1 α の発現抑制を介したTp53非依存的放射線誘発アポトーシス増強と細胞増殖阻害作用を引き起こすと結論づけられた。

本研究で得られた知見は、固形腫瘍に対して新規制がん剤であるECydが放射線による抗腫瘍効果を効率的に高め、低酸素細胞にも細胞死を誘導できる点で有望な放射線増感剤となりうる可能性を示したものであり、その意味は非常に大きいと考えられた。よって審査員一同は、上記博士論文提出者安井博宣の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規定第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。