

γ -secretase inhibitor と放射線照射併用による Notch 発現肺癌細胞株に対する抗腫瘍効果の検討

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 Notch は膜貫通型受容体で、神経、造血、血管といった様々な組織の細胞分化にとって重要な役割を果たしており、多くの癌種において Notch pathway の異常活性が癌化に密接に関連していることが報告されている。我々は、Notch3 が非小細胞肺癌組織の約 40%に過剰発現し、Notch のインヒビターである γ -secretase inhibitor (GSI)を用いて Notch3 を抑制すると *in vitro* またマウスモデルにおいて肺癌の増殖が阻止されることを示してきた。一方で放射線は日常診療において肺癌患者の治療に広く用いられており、その抗腫瘍効果の1つはアポトーシスによるものであることが報告されている。しかし、放射線治療を行う上で放射線抵抗性は重要な問題の1つとしてあげられる。乳癌幹細胞では、放射線照射後に Notch1 とリガンドである Jagged1 の発現が増強することや、神経膠腫幹細胞では、放射線照射後に Notch pathway の標的遺伝子が増強することが報告されている。これらの報告から、Notch pathway の活性が放射線抵抗性のメカニズムの1つである可能性が示唆されるが、肺癌において放射線照射に伴う Notch pathway の動態や GSI と放射線照射併用による抗腫瘍効果に関しては *in vitro* と *in vivo* 共に報告は少ない。このため、我々は本研究において、GSI と放射線照射併用による Notch 発現肺癌細胞株に対する抗腫瘍効果について検討した。

【対象と方法】 細胞株は Notch の発現と GSI の抗腫瘍効果が既に確認されている非小細胞肺癌細胞株 (HCC2429, H460, A549)を用いた。細胞株を一晩培養して、放射線照射 24 時間後に GSI を投与し、併用治療の抗腫瘍効果を MTT assay と clonogenic assay を用いて検討した。Notch1、Notch3、Notch pathway 下流の標的遺伝子 (HES-1、HEY-1) の発現と細胞内シグナル伝達系 (アポトーシスシグナル、MAPK pathway、PI3K/AKT pathway) に関連する蛋白の発現は Western Blot 法で確認した。アポトーシスは Annexin V と propidium iodide を使い、フローサイトメトリーで解析した。また抗腫瘍効果と Notch との関連性については、siRNA を用いて検討した。*in vitro* の結果をもとに、ゼノグラフトマウスモデルを用い、*in vivo* での抗腫瘍効果についても検証した。また腫瘍を摘出し Notch の発現を Western Blot 法で、Ki67 の発現を免疫組織染色で確認した。

【結果】 はじめに併用治療の適正な治療スケジュールを MTT assay を用いて検討した。GSI、放射線同時併用群、GSI 投与 24 時間後に放射線併用群の 2 種類の併用治療スケジュールでは単独治療と比較して相乗効果を認めなかった。GSI、放射線照射後に GSI を投与する逐次併用群では放射線単独群と比べ、

MTT assay において細胞増殖の抑制と clonogenic assay においてコロニー数の低下を認め、さらにフローサイトメトリーでは apoptosis 細胞の増加を認めた。このため以降の実験では放射線治療後に GSI を投与する方法を用いた。次に各種治療後の Notch 関連蛋白やアポトーシス関連蛋白の発現を検討した。放射線照射により、Notch と Notch pathway の標的遺伝子である Hey-1 の発現が増強し、更に放射線照射時に増強した Notch の発現は GSI の逐次併用により減弱した。逐次併用群では、アポトーシス抑制蛋白 (p-Bcl-2、Bcl-xL) と p-ERK の発現は単独治療と比較してより抑制され、アポトーシス促進蛋白 (Bim) と PARP の発現はより増強した。H460 において、siRNA を用いて Notch3 を抑制することで、GSI 単独群と逐次併用群の抗腫瘍効果は減弱した。さらにゼノグラフトマウスモデルにおいても併用群でより強い抗腫瘍効果を認め、治療後の腫瘍の NICD3 の発現を検討したところ増強した NICD3 の発現は併用群で抑制されており、in vitro の結果と同様であった。また、免疫組織染色で検討した腫瘍の Ki67 は、コントロールと比較して併用群では最も抑制されていた。全身毒性の指標として治療中のマウスの体重測定を施行したが、明らかな体重減少は認められなかった。

【考察】 本研究において、GSI と放射線照射併用は単独治療と比べて Notch 発現肺癌細胞に対して高い有効性を示した。併用治療スケジュールの検討を行ったところ、放射線照射後に GSI を投与する逐次併用療法が最も有意な抗腫瘍効果を認めた。放射線照射後の Notch pathway の活性化が放射線抵抗性の 1 つの要因であり、放射線照射後に GSI を投与することが、照射により活性化した Notch pathway を抑制し、より高い抗腫瘍効果を示すと考えられた。

併用治療群ではアポトーシス細胞数が有意に増加し、PARP の発現が誘導された。このことは、併用治療群の抗腫瘍効果がアポトーシスを介していることを示唆している。また、併用群では単独群と比べ、生存促進蛋白の p-ERK や抗アポトーシス蛋白の p-Bcl-2 と Bcl-xL が抑制されており、以上の結果は、GSI または放射線が Bcl-2 ファミリーを含むアポトーシス経路を活性化するという、過去の報告に矛盾しない。Bim は Bcl-2 のサブファミリーに属する BH3-only 蛋白であり、我々は肺癌において Notch3 を介したアポトーシスは Bim 依存的事であることを報告してきた。本研究では、併用治療が Bim を介したアポトーシスにより肺癌細胞の増殖が抑制されることを示した。このため、肺癌治療において Notch pathway の他にも、MAPK pathway や Bcl-2 pathway など様々な分子が治療のターゲットとなりうる可能性が示唆された。

GSI は Notch 以外の膜貫通蛋白にも作用することが報告されている。そのため、併用効果の Notch 依存性について Notch3 siRNA を用いて検討したところ、GSI 単独群と併用群において Notch3 siRNA 群でアポトーシス細胞が有意に低下しており、Notch 依存性であると考えられた。

さらにマウスモデルにおいても併用治療はより高い腫瘍抑制効果を認めた。GSI の臨床試験における制限毒性の 1 つが水様性の下痢であるが、今回の併用治療では重篤な副作用発現は認められず放射線との併用は認容性が高いと考えられた。

【結論】 本研究は、肺癌に対する GSI と放射線との併用効果の有用性に関する最初の報告である。現在、GSI を用いた固形癌の臨床試験は肺癌を含め、乳癌、中枢神経系の悪性腫瘍を中心に進行している。今回の我々の結果から GSI 単独もしくは放射線単独では肺癌に対する治療効果はある程度限られており、両者を併用することで更なる抗腫瘍効果が認められた。このことから本治療が新たな肺癌の治療法となる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	佐邊	壽孝
副査	准教授	濱田	淳一
副査	教授	秋田	弘俊
副査	教授	松野	吉宏
副査	教授	西村	正治

学位論文題名

γ -secretase inhibitor と放射線照射併用による Notch 発現肺癌細胞株に対する抗腫瘍効果の検討

本学位論文は肺癌治療における、放射線と γ -secretase inhibitor との併用効果を培養細胞、並びに、それらのマウスへの xenograft を用いて検討したものである。

γ -secretase は Notch とよばれる膜貫通型受容体の活性化に伴う切断を行う。切断された Notch の細胞質領域は核へと移行し、様々な遺伝子発現の制御に関与する。従って、 γ -secretase inhibitor (GSI)により Notch の活性化が阻害される。

Notch は、神経、造血、血管をはじめとする様々な組織の分化に重要な役割を果たす。一方、多くの癌種において、Notch シグナルの異常な活性化が、それらの発癌や悪性化に関与していることが報告されている。成人の正常な肺組織には通常、Notch の発現は認められない。申請者の属する研究室では、Notch isoform である Notch3 が非小細胞肺癌細胞株の約 40%に有意に発現しており、GSI 処理によってそれらの増殖を抑制できることを示した。肺癌治療には、その補助療法として放射線照射が広く用いられる。放射線照射の主な抗腫瘍効果は癌細胞のアポトーシス誘導である。しかし、癌細胞は放射線治療に抵抗性を示す事も多く、その成績向上の為に解決すべき点が多く残されている。例えば、悪性度の高いことが知られている癌幹細胞様乳癌細胞では、放射線照射後に Notch1 とそのリガンドである Jagged1 の発現が増強し、また、神経膠腫幹細胞においても、放射線照射後に Notch 標的遺伝子群の発現が増強する。これらの報告から、放射線照射による Notch の活性化が放射線抵抗性の一端である可能性が考えられる。肺癌における放射線照射に伴う Notch の動態や GSI との併用効果に関しては未だ報告は殆どなく、本研究ではこれらを検討した。

実験には、Notch 発現と GSI による抗腫瘍効果が確認されている、非小細胞肺癌細胞株 HCC2429、H460、A549 を用いた。培養細胞に放射線を照射し、24 時間後に GSI を投与し、その後の細胞増殖能を、MTT assay と clonogenic assay にて検討した。また、活性化 Notch の標的遺伝子 (HES-1、HEY-1) の発現、並びに、幾つかの代表的細胞内シグナル伝達蛋白質やアポトーシス関連蛋白質の量

や活性も Western Blot 法にて検討している。平行して、アポトーシス誘導に関して、Annexin V と propidium iodide を用いたフローサイトメリー解析も行った。GSI による抗腫瘍効果が実際に Notch 経路を介していることは、siRNA 法による Notch 発現阻害時に、その効果が消失する事により確認した。肺癌細胞移植のマウスへの移植実験系にても、同様な検討を行った。

まず最初に、GSI と放射線照射の併用処理の適切なプロトコールを検討している。その結果、GSI と放射線との同時処理、GSI 投与 24 時間後に放射線照射においては、各々の単独処理と同レベルの増殖阻害効果しか見られないことを明らかにした。しかし、放射線照射 24 時間後に GSI を投与したところ、単独処理と比べ、有意な細胞増殖抑制と細胞コロニー数の低下を認めた。フローサイトメリー解析においても、apoptosis を起している細胞数の増加が観察された。以降の実験では放射線照射後に GSI を投与し、この処理により、標準的経路によって細胞死が誘導され、その結果、細胞の増殖が阻害されていることを示した。マウスへの移植実験でもこのプロトコールで顕著な抗腫瘍効果が見られた。一方、全身毒性の指標としてマウスの体重測定を施行したが、明らかな体重減少は認められなかった。

本論文は、今後の肺癌治療における新たな可能性を示唆したものである。臨床応用には検討すべき点が多く残されてはいるが、申請者はこれらに関してもきちんとした議論を展開した。よって、平成 23 年 2 月 7 日の学位審査会において、本論文は北海道大学大学院医学研究科博士課程論文にふさわしいものと判断し合格とした。