

学位論文題名

腫瘍微小環境における MDR1の発現亢進を伴った
血管内皮細胞の薬剤抵抗性獲得について

学位論文内容の要旨

腫瘍血管新生は、腫瘍の進展や転移に重要な役割を果たしており、近年血管を標的とする血管新生阻害療法が新たな癌の治療戦略として注目され始めている。われわれはこれまで腫瘍血管内皮細胞 (Tumor Endothelial Cell: TEC) が、正常血管内皮細胞 (Normal Endothelial Cell: NEC) と比べ特異遺伝子の発現が亢進していること、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) などの細胞成長因子や Epidermal Growth Factor (EGF) レセプター阻害剤 (Amin and Hida et al. Cancer Res 2006) への感受性が高いこと、細胞増殖能や遊走能が高い (Matsuda et al. BBRC 2009) こと、さらには核型の異常があること (Hida et al Cancer Res 2004, Akino et al, Am J Pathol 2009) などを報告してきた。

血管新生阻害療法の背景に存在する概念は、「TEC は遺伝学的に安定であり薬剤抵抗性を獲得しない」というものであった。最近、この概念に基づいて腫瘍血管新生抑制を目的として、少量の抗がん剤を長期間用いるメトロノミック療

法が提唱された。

ところが、前述のようなわれわれが見出してきた TEC の核型異常は、従来の概念に反し TEC が遺伝的に不安定であること、腫瘍細胞と同様に薬剤抵抗性を獲得しうる可能性を示唆している。実際に、TEC はいくつかの薬剤に対して抵抗性を持つという報告が 2 つのグループからされているが、これら薬剤抵抗性のメカニズムについては依然不明なままである。

われわれは TEC と NEC の 5-FU、パクリタキセルに対する薬剤抵抗性の違いを検討した。血管内皮細胞の分離、培養は Hida らが報告した方法に準拠して行った。TEC として、ヒト高転移性メラノーマのマウス皮下移植腫瘍から分離されたメラノーマ血管内皮細胞を用いた。同一条件でマウスの正常皮膚から分離した正常皮膚血管内皮細胞 を NEC として用いた。

フローサイトメーターによってこれら血管内皮細胞におけるマウス血管内皮特異マーカーの発現、さらに培養後の血管内皮細胞はマトリゲルにおける管腔形成能を確認し、これらは血管内皮の特性を維持していることが示された。

抗がん剤に対する TEC と NEC の薬剤感受性の違いを比較検討するために、5-FU、パクリタキセルに対する感受性を MTS assay によって比較した。72 時間の 5-FU およびパクリタキセル処理によって TEC と NEC 生存細胞数は濃度依存

的に減少した。各薬剤の 50%阻害濃度 (IC50) は 5-FU: NEC 1.1 μ M, TEC 3.7 μ M、パクリタキセル: NEC 0.8nM、TEC 16nM で TEC はこれらの薬剤に対して抵抗性を示した。次に薬剤抵抗関連遺伝子であり、薬剤抵抗性をもつがん細胞で発現亢進していることが知られている Multidrug resistance (MDR1) 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で解析した。その結果 TEC における MDR1 mRNA 発現レベルは NEC に比べて 2.2 倍高かった。さらに MDR1 遺伝子の転写調節因子 Y-box binding 1 protein (YB-1) の細胞内局在を解析した。YB-1 の核内移行は MDR1 遺伝子の転写調節に関わっており、核における YB-1 の発現は多くの悪性腫瘍における薬剤抵抗性の予測因子として知られている。NEC では核における YB-1 の発現はほとんど認められなかったが、TEC では YB-1 の核内における集積が確認された。これらの結果から、腫瘍細胞と同様、TEC においても YB-1 の核への移行が MDR1 mRNA の発現亢進に関与していることが示され、TEC における薬剤抵抗性のメカニズムの 1 つである可能性が示唆された。

腫瘍環境内で NEC が薬剤抵抗性を獲得する可能性とそのメカニズムを検討するため、腫瘍細胞から放出される液性因子が NEC に及ぼす影響を解析した。腫瘍細胞（高転移性メラノーマ）から腫瘍細胞培養上清を回収し、ヒト微小血管内皮細胞（Human microvascular endothelial cell : HMVEC）を腫瘍細胞培養上

清で培養した。コントロールとして、HMVEC を腫瘍細胞用培地で培養し回収した培養上清を用いた。HMVEC を各培養上清で 5 日間培養した後、細胞増殖能を解析した結果、コントロールに比較して腫瘍細胞培養上清処理後の HMVEC の細胞増殖能は有意に亢進した。また、各培養上清処理後、24 時間無血清条件によってアポトーシスを起こした細胞の割合はコントロール 60.84% に対し、

腫瘍細胞培養上清処理群で 35.28% であった。これらの結果から、腫瘍細胞培養上清処理によって HMVEC の増殖能は亢進し、血清飢餓抵抗性を獲得することが示唆された。

次に、腫瘍細胞培養上清が HMVEC に薬剤抵抗性をもたらすかどうかについて解析した。腫瘍細胞培養上清処理 5 日後の HMVEC の MDR1 mRNA の発現量はコントロールに比較して 2 倍の発現亢進が確認された。さらに、わずか 1 日の腫瘍細胞培養上清処理によっても MDR1 mRNA の発現亢進が確認された。次に腫瘍細胞培養上清処理後の HMVEC における YB-1 の発現は、コントロールでは核内にはほとんどみられなかったが、腫瘍細胞培養上清処理 1 日後の HMVEC では、YB-1 の核内への集積を確認した。これらの結果により腫瘍細胞培養上清が HMVEC の YB-1 の核内移行と MDR1 mRNA の発現亢進を引き起こしていることが示された。

MDR1 mRNA によってコードされる P-gp は パクリタキセルを細胞外へ排出することが知られている。そこで、腫瘍細胞培養上清処理が及ぼす HMVEC のパクリタキセル感受性に対する影響を解析した。HMVEC を各培養上清処理 5 日後に 48 時間パクリタキセルによって処理した。腫瘍細胞培養上清処理により HMVEC のアポトーシス細胞の割合はコントロールに比較して低下し、これらの細胞はパクリタキセルに対して抵抗性をもっていることが示された。また、P-gp 阻害剤ベラパミルで処理すると腫瘍細胞培養上清処理後の HMVEC のアポトーシス細胞の割合は増加した。これらの結果から、腫瘍細胞培養上清処理によって引き起こされる HMVEC のパクリタキセルに対する抵抗性には YB-1 の核内移行と MDR1/P-gp の発現亢進が関与していることが示唆された。

本研究は、YB-1 の核内移行および MDR1 mRNA の発現亢進を伴って腫瘍血管内皮細胞が抗がん剤に対し抵抗性を示すこと、さらに正常血管内皮細胞が腫瘍由来液性因子への暴露で薬剤抵抗性を獲得することを世界で初めて明らかにした。このことからメトロノミック療法などの血管新生阻害療法に対する薬剤抵抗性獲得のメカニズムの解明や新たな治療法開発の必要性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 上 農夫男

副 査 教 授 進 藤 正 信

副 査 特任准教授 樋 田 京 子

学 位 論 文 題 名

腫瘍微小環境における MDR1の発現亢進を伴った 血管内皮細胞の薬剤抵抗性獲得について

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。以下に、論文の要旨と審査の内容を述べる。

【背景および目的】腫瘍血管新生は、腫瘍の進展や転移に重要な役割を果たしており、近年血管を標的とする血管新生阻害療法が新たな癌の治療戦略として注目され始めている。われわれはこれまで腫瘍血管内皮細胞 (Tumor Endothelial Cell: TEC) が、正常血管内皮細胞 (Normal Endothelial Cell: NEC) と比べ特異遺伝子の発現が亢進していること、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) などの細胞成長因子や Epidermal Growth Factor (EGF) レセプター阻害剤 (Amin and Hida et al. Cancer Res 2006) への感受性が高いこと、細胞増殖能や遊走能が高い (Matsuda et al, BBRC 2009) こと、さらには核型の異常があること (Hida et al Cancer Res 2004, Akino et al, Am J Pathol 2009) などを報告してきた。

血管新生阻害療法の背景に存在する概念は、「TEC は遺伝学的に安定であり薬剤抵抗性を獲得しない」というものであった。最近、この概念に基づいて腫瘍血管新生抑制を目的として、少量の抗がん剤を長期間用いるメトロノミック療法が提唱された。ところが、われわれの先行研究は、TEC の核型異常は従来の概念に反し TEC が遺伝的に不安定で腫瘍細胞と同様に薬剤抵抗性を獲得しうる可能性があることを示唆している。実際に、TEC はいくつかの薬剤に対して抵抗性を持つという報告が2つのグループからされているが、これら薬剤抵抗性のメカニズムについては依然不明なままである。

そこで本研究では、TEC の薬剤抵抗性の有無を検討し、さらに腫瘍微小環境内の腫瘍細胞—腫瘍血管内皮細胞間の相互作用によって血管内皮細胞が薬剤抵抗性を獲得するメカニズムを解析することを目的とした。

【材料および方法】マウス TEC および NEC をメラノーマ移植腫瘍および正常皮膚か

ら分離培養した。TEC の 5-フルオロウラシル (5-FU) およびパクリタキセルに対する感受性を MTS Assay により解析した。腫瘍内で NEC が薬剤抵抗性を獲得する可能性について解析するために、ヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC) を腫瘍 (メラノーマ) 細胞培養上清によって処理した。薬剤抵抗性に関与する膜タンパク P-glycoprotein (P-gp) をコードする遺伝子 MDR1 の mRNA 発現量および、MDR1 の転写因子 Y-box binding protein 1 (YB-1) の核内の発現量について腫瘍細胞培養上清が与える影響を解析した。

【結果】 TEC は NEC に比較し 5-FU およびパクリタキセルに対しての感受性が低く、MDR1 mRNA 発現量が亢進していた。腫瘍細胞培養上清処理によって、HMVEC における MDR1 mRNA 発現量は亢進し YB-1 の核内移行もみられた。また、さらに腫瘍細胞培養上清処理後の HMVEC は血清飢餓状態およびパクリタキセルに対してより抵抗性を示した。また、その抵抗性は P-gp の阻害剤であるベラパミルによって解消された。

【結論】 腫瘍血管内皮細胞は 5-FU, パクリタキセルに対し抵抗性を示し、正常血管内皮細胞は腫瘍由来液性因子によって薬剤抵抗性を獲得する。YB-1 の核内移行および MDR1 mRNA の発現亢進が腫瘍血管内皮細胞の薬剤抵抗性獲得のメカニズムの一つである可能性が示唆された。

以上、論文について概要が説明された後、各審査員より、本研究の背景、方法、結果、考察および関連の研究について質問がなされた。主な質問内容は、①正常血管内皮細胞の組織特異性、②5-FU, パクリタキセルこれら抗がん剤はメトロニック療法において血管新生抑制効果だけでなくがん細胞に対する細胞殺傷性はあるか、③転写因子 YB-1 は MDR1 遺伝子の転写調節領域のどの部位に結合するのか、④腫瘍血管内皮細胞の異常性の獲得に関与している腫瘍由来因子は何かなどであった。論文提出者はいずれの質問に対しても明確かつ的確に回答し、さらに今後の研究についても発展的な将来展望を示した。

試問の結果、本論文は、腫瘍血管内皮細胞が抗がん剤に抵抗性を示し、また正常血管内皮細胞は腫瘍由来液性因子によって薬剤抵抗性を獲得することを明らかにした。さらに、この腫瘍血管内皮細胞の薬剤抵抗性獲得メカニズムに YB-1 の核内移行および MDR1 mRNA の発現亢進が関与していることを示唆した点が、今後の歯科医学の発展に大きく貢献するものと評価された。さらに、学位申請者は、本研究を中心とした専門分野はもとより、関連分野についても十分な学識を有していることを審査員一同が認めた。

よって、学位申請者は博士 (歯学) の学位授与に値するものと認められた。