氏　　名	岩朝　勤（いわさ　つとむ）
学位の種類	博　士（医学）
学位記番号	医第１００１号
学位授与の日付	平成21年3月21日
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当
学位論文題目	Radiosensitizing effect of YM155, a novel small molecule survivin suppressant, in non-small cell lung cancer cell lines （新規低分子サバイビン阻害剤YM155の肺癌細胞株における放射線増感効果の検討）
論文審査委員	（主　査）　教授　中川和彦
	（副主査）　教授　西尾和人
	（副主査）　教授　西村恭昌

論文内容の要旨

【目的】

サバイビンは抗アポトーシス蛋白の一種で、多くの癌種に高発現しており、治療抵抗や予後不良に繋がるとされている。YM155 はこのサバイビンを標的とした新規低分子化合物で、サバイビンの発現を抑制する事が確認されている。サバイビンをアンチセンスオリゴヌクレオシドや siRNA を用いて抑制することで、放射線の増感効果が生じることが報告されており、今回 YM155 により同様の効果が得られるかどうかを、肺癌細胞株を用いて検討を行った。

【方法】

YM155 による放射線増感効果に関しては、アポトーシス法、コロニー形成法及び担癌マウスモデルを用いて検討を行った。DNA リペアに関しては、γ-H2AX を用いた免疫染色法を用いて検討を行った。

【結果】

YM155 は肺癌細胞株において、サバイビンの発現を濃度依存的また時間依存的に抑制する事が確認された。一方で、他の抗アポトーシス蛋白及びサバイビンの発現を調節する蛋白には全く影響を及ぼさなかった。次に、コロニー形成法を用いて放射線単独群と併用群でのコロニー形成率の測定を行ったが、併用群でコロニー形成が抑制され、併用による放射線増感効果を認めた。また、サバイビンが抗アポトーシス蛋白である事から、YM155 の放射線との併用効果をアポトーシスに関して検討を行った。TUNEL 法では放射線照射後 24 時間以降、併用群で優位にアポトーシス細胞数の増加を認め、その 24 時間時点でのカスパーゼ3活性を測定したところやはり併用群で優位にカスパーゼ活性の増強を認めた。以上より、放射線増感効果の 1 つにアポトーシス増強効果が示唆された。サバイビンと DNA リペアの関連は過去の論文で、サバイビンを抑制することでリペア能力の低下が認められたとの報告がなされている。よって、今回の併用効果がこのDNAリペアに影響を与える事で生じている可能性について、DNA 障害の指標である double strand breaks に特異的に結合するγ-H2AX の免疫染色を用いて検討を行った。放射線単独群に比較して、YM155 併用群では 24 時間後でも優位にスポットの残存を認め、DNA リペアの障害が生じていることが示唆された。最後に、併用による放射線増感効果について担癌マウスを用いて検討を行った。YM155 は浸透圧ポンプを用いて 7 日間皮下持続投与を行い、放射線は YM155 投与3日目に 10Gy 単回もしくは 2Gy×5 の分割照射を行った。結果、他の群に比較して YM155 併用群で優位に抗腫瘍効果を認め、放射線増感効果があることが示された。

【結論および考察】

YM155 は vitro、vivo で放射線増感効果を示した。そのメカニズムとして、アポトーシスの増強及び DNA リペアの阻害が示唆された。今回の実験結果より放射線との併用療法での効果が臨床でも期待出来得ると思われる。

博士論文の印刷公表	公表年月日	出版物の種類及び名称
	2008年10月15日　公表	出版物名 Clinical Cancer Research Vol. 14　p. 6496～6504
	公表内容	2008年10月15日　発行
	全文	

論 文 審 査 結 果 の 要 旨

survivin は IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein、抗アポトーシス蛋白) family の一つであり、ミトコンドリアを介したアポトーシス経路において caspase を抑制することで抗アポトーシス作用を示す。近年、この survivin を標的とする治療法の開発が進んでおり、antisense oligonucleotide や dominant-negative mutant を用いた前臨床研究で抗腫瘍効果を示すことが報告されている。しかしながら、これらの薬剤の臨床への転用は困難であることが多い。YM155 は新規低分子 survivin 阻害剤であり、survivin を蛋白レベル及び mRNA レベルで抑制することが報告されており、in vitro、 in vivo で抗腫瘍効果を示すことも報告されている。さらに、単剤での臨床試験がいくつかの癌腫で現在試行中である。

survivin は種々の癌細胞に過剰発現しており、その発現が抗癌剤や放射線の治療抵抗や予後不良につながるとされている。反対に antisense oligonucleotide や siRNA を用いて survivin を抑制することで放射線増感効果が生じるとの報告がある。したがって、本研究では、YM155 と放射線の併用による増感効果の検討を行った。

方法及び結果

YM155 が肺癌細胞株における survivin 発現に与える影響を調べる為まず Western Blot 法にて検討を行った。YM155 は survivin 発現を濃度依存的、時間依存的に抑制することが確認された。次に、YM155 が放射線感受性に与える影響を clonogenic assay を用いて検討を行った。用いた肺癌細胞株はともに放射線増感効果がある事が示され、その際生存率より求められた Enhancement Factor (EF)はそれぞれ 1.57 及び 1.61 であった。YM155 による放射線増感効果に関してそのメカニズムを検討する上で、survivin が抗アポトーシス蛋白であることから YM155 の放射線障害性アポトーシスに与える影響について検討を行った。TUNEL 法、caspase-3 活性測定法により検討を行ったが、ともに併用群で優位にアポトーシスが増大していることが確認され。survivin が DNA repair に関与していることが近年報告されており、この DNA repair は放射線増感効果にも影響を及ぼすことから、YM155 の放射線照射後の DNA repair に与える影響に関して DNA damage の指標である DNA Double Strand Breaks (DSBs) に特異的に結合する γH2AX を蛍光免疫染色することで検討を行った。YM155 存在下では γH2AX のスポットが 24 時間時点でも多数残存しており、YM155 による放射線照射後の DNA repair 抑制の可能性が示唆された。最終的に担癌マウスモデルを用いて YM155 の放射線増感効果に関する検討を行ったが、放射線単回照射における検討においても、放射線分割照射における検討を行ったが、どちらの検討においても YM155 と放射線との併用群で優位に抗腫瘍効果を示した。

考察

Survivinは癌治療において重要な分子標的であるために、survivinの発現を調節する様々なメカニズムを反映して多くの治療法が開発されてきた。YM155はsurvivinの発現を抑制する低分子化合物であり、in vitro、in vivoでYM155は高い抗腫瘍効果を示した。また、単剤での第1相臨床試験がすでに施行されており、重篤な副作用を示さなかった事も報告されているものの、放射線との併用療法に関しては未だ検討されていない。

本研究において、我々はClonogenic assayによりYM155が放射線感受性を増強させる事を示した。そのメカニズムの一つとして、YM155が放射線障害性アポトーシスを増大させることにより放射線感受性を増大させたことを示唆した。また、survivinの他の機能としてDNA DSBs修復の調節を通して放射線照射後の腫瘍細胞生存を増強するということが報告されており、我々は、YM155が肺癌細胞株において放射線障害性DSBsの修復を抑制することを示した。この事は、YM155による放射線誘発のDNA repairの抑制が放射線増感効果に繋がったことを示唆した。

放射線療法と化学療法の間の交差耐性はアポトーシスの欠陥及び、DNA repairの増強に起因するとされている。従って我々の実験結果は、YM155がアポトーシスを促進し、DNA repairを抑制することにより放射線耐性を克服する可能性を示し、また化学療法に対する感受性を増大させる可能性を示唆した。以上の事より我々の実験結果は、今後のYM155と放射線療法の併用療法の臨床における有用性を示唆するものであった。

氏　　名	田中（たなか）　薫（かおる）
学位の種類	博　士（医学）
学位記番号	医第１００２号
学位授与の日付	平成21年3月21日
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当
学位論文題目	SRPX2 is overexpressed in gastric cancer and promotes cellular migration and adhesion （胃癌高発現遺伝子SRPX2は細胞の遊走・接着機能を誘導する）
論文審査委員	（主　査）　教授　中川和彦
	（副主査）　教授　金丸昭久
	（副主査）　教授　義江修