

論文内容の要旨

氏名	岡野意浩		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	医第1119号		
学位授与の日付	平成25年3月22日		
学位授与の要件	学位規則第5条		
学位論文題目	Appropriate inhibition of autophagy after treatment with imatinib mesylate enhances cytotoxicity in malignant peripheral nerve sheath tumor cells (適正なオートファジーの抑制は、悪性末梢神経鞘腫に対するイマチニブの効果を増強する)		
論文審査委員 (主査)	教授	竹村	司
(副主査)	教授	佐藤	隆夫
(副主査)	教授	辰巳	陽一

【目的】
 神経線維腫症に合併した悪性末梢神経鞘腫 (MPNST) の男児例を経験した。本腫瘍は従来の治療に抵抗性の難治腫瘍であり、platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) を発現していることから、その抑制作用を持つイマチニブ (STI) を用いた新規治療の可能性が示唆される。そこで、MPNST 細胞株 3 種を用いて STI の *in vitro* における作用について検討した。

【方法】
 MPNST 細胞株 3 種 (YST-1, PSS, Sch-2) を用いた。STI 処理後、cell viability を MTT 法で検討した。Autophagy の検出は、電子顕微鏡、ウェスタンブロット法による LC3B-I から-II へのシフトおよび acidic vesicular organelles (AVO) の発現により検討した。また、autophagy 系路を種々の薬剤や siRNA により阻害し、その影響を検討した。

【結果】
 細胞株 3 種は PDGFR を発現し、YST-1 株は STI への感受性が高かったが、Sch-2 株は耐性だった。YST-1 株では、STI 処理で apoptosis が誘導されたが、zVAD-fmk の存在下でその抑制効果は阻害されず、非 apoptosis 細胞障害機序の関与が示唆された。STI 処理により MPNST3 株に autophagy が誘導された。Autophagy 誘導の初期に影響する 3-methyladenine や siRNA による beclin-1 発現抑制により、STI による細胞障害性は阻害され、STI の細胞障害に autophagy の誘導が必要と考えられた。次に、autophagosome 形成に関わる LC3B の発現抑制や lysosome 阻害剤 (baflomycin A1, BFA) の併用で、STI 単独で感受性の低い PSS や Sch-2 株でも細胞障害が増強された。特に、YST-1 株では BFA の併用で apoptosis が増強した。

【結論】
 STI の抗腫瘍効果に autophagy が関与し、autophagy 系路の初期の段階を阻害すると STI の抗腫瘍効果は減弱したことから STI の抗腫瘍効果に autophagy 誘導が必須であると考えられた。しかし、一連の autophagy 経路の内、autophagosome 形成以降は STI への抵抗性に関与し、その過程を選択的に阻害すると STI の感受性を増強できることが示唆された。

博士論文の印刷公表	公表年月日	出版物の種類及び名称
	2013年 月 日 公表予定	出版物名 Acta Medica Kinki University
	公表内容	2013年 月 日 発行予定
	全文と要約	

論文審査結果の要旨

本研究は、悪性末梢神経鞘腫（MPNST）の細胞株を用いて、オートファジーを適切に抑制することによりイマチニブによる細胞死を増強することを検討したものである。

MPNST は化学療法や放射線療法といった従来の治療に抵抗性の難治腫瘍であり、platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) を発現していることから、その抑制作用を持つイマチニブを用いた新規治療の可能性が示唆された。そこで、3種のMPNST細胞株を用いて *in vitro* におけるイマチニブの作用について検討した。

理研細胞バンクより購入した3種のMPNST細胞株（YST-1、PSS、Sch-2）を用いて、イマチニブ処理後の cell viability を MTT 法で検討した。

3種の細胞株は PDGFR- α 、 β の両方あるいはいずれかが発現していた。3種の細胞株でイマチニブの濃度依存性に cell viability の低下を認め、YST-1 株は STI への感受性が高かったが、Sch-2 株は耐性だった。アポトーシスの誘導について cytochrome C や PARP、caspase といった蛋白をウェスタンブロット法にて検出したところ、YST-1 では時間依存性・濃度依存性に発現の増強を認めた。しかし、PSS 株、Sch-2 株では同様の所見は認められなかった。また、汎 caspase 阻害剤である z-VAD の存在下で cell viability を測定したところ、イマチニブによる cell viability の低下は抑制されず、MPNST 細胞株におけるイマチニブによる細胞死には非アポトーシス細胞死の関与が示唆された。

そこで、第2のプログラム細胞死といわれる autophagy に着目した。Autophagy の検出はウェスタンブロット法による LC3B-I から-II へのシフト、p62-sequestosome1 の減少、電子顕微鏡、および acidic vesicular organelles (AVO) の発現により検討した。また、autophagy 系路を種々の薬剤や siRNA により阻害し、その影響を検討した。

種々の autophagy の検出法によりイマチニブにより3種のMPNST細胞株に autophagy が誘導

されることが明らかになった。Autophagy 誘導の初期に影響する 3-methyladenine や siRNA による beclin-1 発現抑制により、イマチニブによる細胞障害性は抑制された。次に、autophagosome 形成に関わる LC3B の発現抑制や lysosome 阻害剤 (bafilomycin A1) の併用で、イマチニブ単独で感受性の低い PSS 株や Sch-2 株でも細胞障害が増強された。特に、YST-1 株では bafilomycin の併用で apoptosis の増強が認められた。

Autophagy 経路の初期の段階で阻害するとイマチニブの細胞障害性が減弱したことから、イマチニブの細胞障害性に autophagy 誘導が重要であると考えられた。しかし、一連の autophagy 経路の内、autophagosome 形成以降は薬剤耐性に関与し、その過程を選択的に阻害するとイマチニブの細胞障害性を増強できることが明らかとなった。

今後、Bafilomycin などの薬剤を用いて適切に autophagy を抑制することで、難治性である MPNST における新規治療の開発が期待され、本研究は非常に有意義なものと考えられた。