

氏名	福本 晋吾
(ふりがな)	(ふくもと しんご)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成30年7月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Synergistic anti-proliferative effects of mTOR and MEK inhibitors in high-grade chondrosarcoma cell line OUMS-27 (高悪性度軟骨肉腫細胞株 OUMS-27 に対する mTOR および MEK 阻害薬を用いた腫瘍増殖抑制の 相乗効果)
論文審査委員	(主) 教授 佐 浦 隆 一 教授 廣 瀬 善 信 教授 高 井 真 司

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目的》

高悪性度の軟骨肉腫は悪性骨腫瘍の約20%を占め、骨肉腫、骨髄腫に次いで頻度の多い骨腫瘍であるが、化学療法や放射線治療は効果がなく、外科的切除のみが有効とされ、その予後は病理学的悪性度と適切な外科的切除の有無に依存する。しかし近年、軟骨肉腫に対する免疫化学療法について多くの報告がなされるようになった。

さて、PI3K/Akt/mTOR(Akt)と RAF/MEK/ERK(MEK)経路は細胞増殖に関与する主要なシグナル伝達経路であり、多くの悪性腫瘍において治療の標的としての研究がなされているが、これらの経路間には相互の代償性機構が存在し、双方の経路の遮断による腫瘍増殖抑制効果に関する報告も多く挙げられている。

そこで、我々は高悪性度軟骨肉腫細胞株(OUMS-27)を用いて mTOR 阻害薬と MEK 阻害薬の腫瘍増殖抑制のそれぞれの効果および相乗効果の有無について検討した。

《材料、方法》

軟骨肉腫のモデルとしてヒト高悪性度軟骨肉腫株である OUMS-27 cell line を、mTOR 阻害薬は rapamycin、MEK 阻害薬は PD 0325901 を用いた。培養した OUMS-27 に rapamycin、PD 0325901 または両阻害薬を同時に添加し、以下の実験を行った。

生細胞数に対する影響は、rapamycin、PD 0325901 の単独添加の濃度を $10\ \mu\text{M}$ から $40\ \mu\text{M}$ 、併用添加は PD 0325901 を $10\ \mu\text{M}$ で固定し、rapamycin を $10\ \mu\text{M}$ から $40\ \mu\text{M}$ で検討した。

ERK、p-ERK 活性およびカスパーゼ活性に対する影響は、rapamycin、PD 0325901 の単独添加の濃度を $10\ \mu\text{M}$ 、併用添加は PD 0325901、rapamycin を各 $10\ \mu\text{M}$ で検討した。また、アポトーシスの検出には PD 0325901 の単独添加の場合の濃度は $10\ \text{nM}$ から $10\ \mu\text{M}$ 、併用添加の場合は PD 0325901 を $10\ \mu\text{M}$ で固定し、rapamycin を $10\ \text{nM}$ から $10\ \mu\text{M}$ で実験を行った。

1. 細胞増殖定量

阻害薬添加 48 時間後に MTT 法を用いて各阻害薬の濃度ごとの OUMS-27 の生細胞数を測定した。

2. Western blotting

阻害薬添加 48 時間後に western blotting 法を用いて ERK、p-ERK 発現を測定し、Akt 経路阻害時の MEK 経路の活性化の状態を調べた。

3. アポトーシスの検出

阻害薬添加 48 時間後に TUNEL 染色を行い、アポトーシス細胞を検出した。また、フローサイトメトリーを用いて各阻害薬について濃度ごとにアポトーシスの定量を行った。

4. カスパーゼ活性

阻害薬添加 24 時間後にルミノメーターを用いて caspase 3/7、8、9 活性を測定した。

5. 細胞周期解析

阻害薬添加 48 時間後にフローサイトメトリーを用いて、各阻害薬の濃度ごとに G1、G2、S 期の割合を計測し、細胞周期解析を行った。

《結果》

1. 各阻害薬とも濃度依存性に生細胞数の減少が認められた。また、rapamycin、PD 0325901 併用添加では単独よりも有意に生細胞数の減少が認められた。
2. rapamycin 添加により p-ERK の発現が増加、PD 0325901 添加で p-ERK の発現が低下した。併用添加では rapamycin 単独添加よりも p-ERK の発現は低下していた。
3. rapamycin 添加、併用添加ではコントロールよりも多くのアポトーシス細胞が検出された。フローサイトメトリーによる定量では、各阻害薬添加によりアポトーシス細胞割合の増加が認められた。一方、併用添加では rapamycin 単独添加よりも有意にアポトーシス細胞が増加していた。
4. rapamycin 添加により caspase 3/7、8、9 の活性化が認められた。また、併用添加では rapamycin 単独添加よりも caspase 3/7、8、9 の活性が増加していた。
5. 各阻害薬添加により G1 期の割合は増加し、S 期の割合は減少した。

《考察》

多くの悪性腫瘍で mTOR および MEK 阻害薬の腫瘍増殖抑制効果が報告されている。しかし、mTOR 阻害薬の単独投与では、Akt 経路のフィードバック機構や Akt、MEK 経路間の代償性機構により腫瘍増殖抑制効果が減弱することや薬剤耐性の問題が指摘されている。しかし、Akt、MEK 経路の阻害薬を併用することによる腫瘍増殖抑制の相乗効果も数多く報告されている。

今回の研究では rapamycin 添加時に p-ERK の発現が増強していることが western blotting で確認され、OUMS-27 では mTOR 阻害薬により代償性に MEK 経路が活性化す

ることが示された。また、mTOR、MEK 阻害薬併用して両経路を阻害することによる腫瘍増殖抑制の効果について調べたところ、細胞増殖定量では各阻害薬添加により濃度依存性に生細胞数の減少を認め、rapamycin、PD 0325901 併用添加では rapamycin 単独よりも強い細胞増殖抑制効果が得られた。そして、これらの濃度では rapamycin、PD 0325901 ともにアポトーシスを誘導しており、併用添加では、カスパーゼ活性の増加による単独よりも強いアポトーシスの誘導を認めた。特に今回の検討では rapamycin および併用添加ではカスパーゼ 3/7、8、9 の活性化を認め、アポトーシスの誘導が内因性、外因性の両方の経路を介して行われている可能性が示された。また、rapamycin は細胞周期を G1 期で停止させることで細胞増殖を抑制するとされているが、本研究においても同様の結果が得られた。

mTOR 阻害薬単独投与では腫瘍増殖抑制は認められても、腫瘍縮小は認められず、切除不能な軟骨肉腫に対する補助化学療法として考えられてきた。また、分子標的薬の単独投与では代償性機構による治療効果の減弱や薬剤耐性の獲得の問題も指摘されている。一方、近年の研究では PI3K 阻害薬や MEK 経路の阻害薬との併用により腫瘍縮小が認められたとの報告もあり、複数の分子標的薬の併用による治療効果も期待されている。

今回の検討では、rapamycin、PD 0325901 併用投与が相乗的に OUMS-27 の増殖を抑制したことから、mTOR、MEK 阻害薬の併用投与は、薬剤耐性の獲得を防ぎつつ、単独投与で効果不十分な軟骨肉腫に対する有効な治療法となる可能性が示された。

《結論》

mTOR、MEK 阻害薬併用療法は、軟骨肉腫に対する有効な治療法となる可能性が示された。

論文審査結果の要旨

軟骨肉腫は化学療法や放射線治療は効果がなく外科的切除のみが有効とされているが、高悪性度の軟骨肉腫は予後不良例も多く、新たな治療法の確立が期待されている。

PI3K/Akt/mTOR(Akt)と RAF/MEK/ERK(MEK)経路は細胞増殖に関与する主要な経路で、多くの悪性腫瘍において治療の標的として研究が行われている。本研究ではこれらの経路の阻害薬による腫瘍増殖抑制の機序および相乗効果について検討した。

申請者は本研究で rapamycin の OUMS-27 増殖抑制効果を明らかにした。そして、その機序としてカスパーゼを介するアポトーシスの誘導、細胞周期の停止を証明した。また、rapamycin 添加により OUMS-27 の ERK が活性化していることを明らかにしたが、これは Akt 経路を阻害することで MEK 経路が活性化されることを示すデータであり、OUMS-27 では二つの経路間に代償性機構が存在する可能性を示唆するものである。そして、両経路の阻害薬を併用することで、単独添加時よりも強い細胞増殖抑制、アポトーシスの誘導が得られることも明らかにした。

分子標的薬の単独投与では代償性機構による治療効果の減弱や薬剤耐性の獲得の問題も指摘されており、複数の分子標的薬の併用による治療効果が期待されている。本研究では申請者により OUMS-27 に対する mTOR、MEK 阻害薬の併用による相乗効果の可能性が示され、臨床的にも重要な知見と考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第11条第1項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Acta Histochemica 120(2): 142-150, 2018