

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
右梅 貴信	主査 教授 勝 岡 洋 治 副査 教授 大 槻 勝 紀 副査 教授 谷 川 允 彦 副査 教授 芝 山 雄 老 副査 教授 大 道 正 英
主論文題名 FTY720 Induced bcl-associated and fas-independent Apoptosis in Human Renal Cancer Cells <i>In Vitro</i> and Significantly Reduced <i>In Vivo</i> Tumor Growth in Mouse Xenograft (FTY720 による bcl-経路を介したアポトーシス:マウス腎癌モデルを用いた癌増殖抑制効果の検討)	
学位論文内容の要旨	
<p>[研究目的]</p> <p>現在臨床で使用されている抗癌剤は、細胞増殖における代謝拮抗作用を利用したものが殆どであり、癌細胞のみならず cell cycle の速い血液細胞、特に顆粒球に強く作用し、時に致死的な重症感染症を引き起こすことが最大の問題点である。FTY720 は、“リンパ球を特異的にアポトーシスに誘導する”というユニークな作用機序を持った免疫抑制剤として開発された新しい薬剤である。今回この作用機序に注目し本薬剤の癌細胞に対する選択的アポトーシス誘導効果と、腫瘍増殖抑制効果、および、そのメカニズムをヒト腎癌ヌードマウス移植モデルを用いて検討した。</p> <p>[研究方法]</p> <p><i>In vitro</i>:ACHN(腎癌細胞)、HK-2(正常尿細管細胞)の細胞において、FTY720 が癌細胞に選択的にアポトーシスを誘導すること、また、そのメカニズムを colorimetric protein assay、real-time RT-PCR 定量分析、Western blot analysis を用いて検索した。 <i>In vivo</i>:ヒト腎癌ヌードマウス移植モデルを作成し FTY720、シスプラチンの腫瘍増殖抑制効果を検討した。</p> <p>[結果]</p> <p>FTY720 の癌細胞に対する高い薬剤感受性:シスプラチンの薬剤感受性は ACHN より HK-2 で高かったが、FTY720 の薬剤感受性は 30 μM 以下の濃度では HK-2 より ACHN で有意に高く、flow cytometry の結果も同様であった。 FTY720 治療による癌細胞でのアポトーシス誘導: FTY720 で治療された癌細胞は、電顕像でのクロマチンの萎縮を伴った核の断片化、また、電気泳動におけるラダー所見(DNA 断片化を示す)など、アポトーシスに特徴的な所見を呈し、癌細胞が FTY720 によってアポトーシスに誘導されていることが示唆された。 FTY720 がアポトーシスを誘導する細胞内シグナル伝達:FTY720 を投与した癌細胞では caspases-3 の活性が増加していたが、caspases-8 では有意な差を認めなかった。その結果、FTY720 は Fas-dependent death receptor pathway を介してではなく、mitochondrial death pathway を介してアポトーシスを引き起こしていることが示された。m-RNAs レベルでも caspases-3 やアポトーシスを促進する</p>	

Bcl 関連蛋白である Bad, Bax, Bid, Btf の有意な増加、およびアポトーシスを抑制する Bcl 関連蛋白である Bcl-2 の発現減少が認められた。Bcl 関連蛋白とは対照的に caspases-8, Fas, や TNF-R1 複合体の構成要素である FADD, TRADD では有意な差はみられなかった。これらの結果は Western blot analyses でも同様であり、FTY720 が Fas-independent, Bcl-associated pathway を介してアポトーシスを引き起こしていることを示唆する所見と考えられた。

FTY720 で治療された癌細胞での ERK 活性の減少:癌細胞での ERK 活性は、FTY720 未治療群では EGF 刺激によって有意に促進したが、EGF 刺激による ERK 活性化は、1 μ M での FTY720 前処理によって有意に抑制された。これらの結果より FTY720 は癌細胞において EGF によって惹起される ERK の活性化を抑制することが示唆された。

FTY720 による腫瘍増殖の抑制:シスプラチン投与群では腫瘍の経時的な増大が認められ、組織的には癌細胞は核分裂を伴って活発に増殖し細胞死はほとんど見られなかった。これに対して、FTY720 投与群 (10mg/kg/day 以上) では投薬開始から 12 週目には腫瘍は治療開始時の半分以下に縮小し、摘出した腫瘍は弾性硬、白色調で血流は乏しかった。また、組織学的には、癌細胞の構造はアポトーシスに特徴的な崩壊像を呈し TUNEL 染色、電子顕微鏡においてもアポトーシスに特徴的な像が確認された。

[考察]

腎癌は、現在、泌尿器癌領域で、もっとも治療困難な癌腫のひとつである。近年の定期健康診断の普及と、画像診断の発達に伴って、毎年 6000 例以上の症例が初発腎癌症例として登録され多くの症例が根治治療の対象として外科的切除を適用されている。しかし、腎癌は術後 5 年以上経過した症例において再発、転移を認めることが少なくなく、このような症例に対しては現在 IFN や、IL2 などの免疫療法を行うことが通例であるが、それらの奏効率も 10% 以下といわれている。今回の研究では、代表的な抗癌剤であるシスプラチンを比較対象として、腎癌、および正常尿細管細胞における細胞障害性を“リンパ球を特異的にアポトーシスに誘導するというユニークな作用機序を持った免疫抑制剤 FTY720”のそれと比較検討した。その結果、シスプラチンが腎癌細胞より正常尿細管細胞で細胞障害性が高く、マウスモデルにおいて肝、腎機能障害や骨髄抑制などの重篤な副作用が出現し、腫瘍発育の抑制効果も認められなかったのに対し、FTY720 は正常尿細管細胞に比較して腎癌細胞で有意に細胞障害性が高く、in vivo モデルにおいても(片腎モデルにおいても)骨髄抑制や肝、腎機能障害などの副作用を殆ど認めることなく著明な抗腫瘍効果を認めた。これらの結果は、FTY720 治療が腎癌摘出後の片腎症例や腎機能障害を有する症例にも安全に施行できる腎癌に対する新しい治療として期待できると考えられた。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	右梅 貴信
論文審査担当者		主 査 教授 勝 岡 洋 治 副 査 教授 大 槻 勝 紀 副 査 教授 谷 川 允 彦 副 査 教授 芝 山 雄 老 副 査 教授 大 道 正 英	
主論文題名 FTY720 Induced bcl-associated and fas-independent Apoptosis in Human Renal Cancer Cells <i>In Vitro</i> and Significantly Reduced <i>In Vivo</i> Tumor Growth in Mouse Xenograft (FTY720 による bcl-経路を介したアポトーシス:マウス腎癌モデルを用いた癌増殖抑制効果の検討)			
論文審査結果の要旨			
<p>腎癌の一般的な治療法は外科的切除である。しかし、進行癌症例では術後再発、転移を認めることが少なくなく、このような症例に対しては現在 IFN や、IL2 などの免疫療法を施行することが多いが、それらの奏功率は 10% 以下と低く、有効な治療法は確立されていないのが現状である。癌の成長には細胞増殖とアポトーシス(細胞死)との平衡が深くかかわっている。急速に成長する腫瘍では細胞のアポトーシスの頻度も少なく、増殖率も高い。しかし、細胞が著しく増殖する腫瘍でも、アポトーシスが細胞増殖よりも高頻度で生じれば腫瘍の成長速度はさほど早くはならない。この意味で“癌細胞におけるアポトーシスの誘導”は癌治療の新しい戦略であると考えられる。本研究では、FTY720 のリンパ球を特異的にアポトーシスに誘導するという作用機序に注目し、癌細胞に対する選択的アポトーシス誘導効果と、腫瘍増殖抑制効果およびそのメカニズムをヒト腎癌ヌードマウス移植モデルを用いて検討し、以下のような結果を得ている。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) FTY720 の薬剤感受性は HK-2 (正常尿細管細胞) に比較して ACHN (腎癌細胞) で有意に高かった。 2) FTY720 は癌細胞において Fas-independent, Bcl-associated pathway を介してアポトーシスを引き起こしていることが確認された。 3) FTY720 は癌細胞において EGF によって惹起される ERK の活性化を抑制することが確認された。 4) FTY720 は <i>in vivo</i> 腎癌モデルでも重篤な副作用も無くその抗腫瘍効果が確認された。 <p>以上の結果より、FTY720 は正常細胞に比較して癌細胞で有意に細胞障害性が高く、癌細胞にアポトーシスを誘導することによって腫瘍増殖抑制効果を発揮することが確認された。FTY720 は腎癌の新しい治療薬になりうると考えられ、今後の臨床応用に期待が持たれるものと思われる。</p> <p>以上より、本論文は本学大学院学則第9条に定める所の博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) ANTICANCER RESEARCH 27(1): 75-88, 2007</p>			