

氏 名 はやし ともひで
林 智秀

学 位 の 種 類 博 士 (医学)

学 位 記 番 号 富生命博甲第 92 号

学位授与年月日 平成 29 年 9 月 28 日

専 攻 名 認知・情動脳科学専攻

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

学位論文題目 Impact of T-LAK cell originated protein kinase (TOPK)
expression on outcome in malignant glioma-a novel
therapeutic target
(T-LAK cell originated protein kinase (TOPK)の発現は悪性
神経膠腫の予後と相関し, 新たな治療目標となりうる)

論文審査委員

(主査) 教 授 西条 寿夫

(副査) 教 授 森 寿

(副査) 教 授 藤井 努

(副査) 教 授 林 龍二

指 導 教 員 教 授 黒田 敏

【学位論文内容の要旨】

Abstract

Background – This study was aimed to evaluate the expression of T-LAK cell originated protein kinase (TOPK) in the cultured glioma cells and surgical specimen from the glioma patients. The effects of a novel TOPK inhibitor, OTS964 on the cultured glioma cells were also examined.

Methods – TOPK protein level and TOPK mRNA level in glioma cell lines were examined using Western blot and RT-PCR, respectively. Their subcellular localization of TOPK was examined using immunohistochemistry. Their half-maximum inhibitory concentration (IC_{50}) value against OTS964 was also determined. TOPK and Ki-67 expression was examined by immunohistochemistry using 58 samples with gliomas. Their co-localization was examined by double fluorescence immunohistochemistry. Impacts of TOPK/Ki-67 expression on the overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in 32 patients with glioblastoma multiforme (GBM) were examined, using Kaplan-Meier and Cox proportion hazard model.

Results – TOPK protein and mRNA were detected in the glioma cell lines. About 20 to 30% of them were detected in the cytosol on immunohistochemistry. OTS964 showed significant growth-inhibitory effect on glioma cell lines with IC_{50} values of about 70 to 120 nM. Significantly higher expression of TOPK and Ki-67 was found in GBM than in non-GBM. A majority of TOPK-positive cells were also positive for Ki-67 and vice versa. However, higher expression of TOPK, but not Ki-67, was significantly associated with poor OS and PFS in GBM patients.

Conclusions – The findings strongly suggest the biological and clinical importance of high TOPK expression and therapeutic potential of TOPK inhibitors to treat gliomas, especially GBM.

【論文審査の結果の要旨】

〔目的〕

神経膠腫は原発性脳腫瘍で最も発生頻度が高く、特に悪性神経膠腫は、化学療法や放射線治療が大きく進歩した現在においてもきわめて予後不良である。一方、セリン・スレオニンキナーゼである T-lymphokine-activated killer cell-originated protein kinase (TOPK) は、肺癌や大腸癌など種々の腫瘍細胞において発現が認められ、癌細胞の有糸分裂を促進すると伴にその遊走や浸潤にも関与している。さらに最近の研究によると、TOPK の発現が種々の腫瘍の悪性度や患者の予後不良度と相関し、逆に TOPK 阻害剤である OTS964 は、肺癌細胞の異種移植モデルにおいて、細胞増殖の抑制とアポトーシスを誘導することが報告されている。しかし、脳腫瘍における TOPK の意義は不明である。本研究では、1) 神経膠腫細胞株における TOPK の発現、2) TOPK の kinase 活性の阻害剤である OTS964 の神経膠腫細胞株の増殖に対する効果、および 3) 患者から摘出した神経膠腫における TOPK の発現と臨床病理学的な所見及び患者の予後との関連性を検討した。

〔方法〕

1. 神経膠腫細胞株における TOPK の発現

神経膠腫細胞株 (A172, T98G, U87, U251, TM-1, TM-31)、陰性コントロールであるヒト結腸癌細胞株 HT-29、および陽性コントロールである肺癌細胞株 A549 を培養し、蛍光免疫染色、RT-PCR、およびウエスタンブロッティング法で、TOPK の組織学的発現、mRNA 発現、および蛋白の発現量を解析した。

2. 神経膠腫細胞株の増殖に対する TOPK 阻害剤 OTS964 の効果

上記細胞株を 1 晩培養した後、種々の濃度の OTS964 を添加して 72 時間培養し、細胞生存率を解析した。測定は 3 回行い、各腫瘍細胞に対する OTS964 の 50% 阻害濃度 (IC₅₀) は、生存率 50% を挟む OTS964 の 2 点の濃度の生存率の直線近似から算出した。

3. 摘出神経膠腫における TOPK 発現と臨床病理学的所見及び予後との関連性

- 1) 神経膠腫患者 57 例の手術標本を多形神経膠芽腫 (glioblastoma multiforme; GBM) 群および非 GBM 群の 2 群に分け、免疫組織染色で TOPK と細胞増殖関連タンパク Ki-67 の陽性率を比較した。
- 2) 患者を、標本における TOPK 陽性細胞の割合に基づいて TOPK 高値群 (n=9) と TOPK 低値群 (n=23) に、また Ki-67 陽性細胞の割合に基づいて Ki-67 高値群 (n=14) と Ki-67 低値群 (n=18) に分け、Kaplan-Meier 法を用いて 2 群における予後 (全生存期間と無増悪生存期間) を比較解析した。

3) TOPK を含む各因子の予後に与える影響を明らかにするため、Cox 比例ハザードモデルを用い、TOPK 陽性細胞の発現頻度、Ki-67 陽性細胞の発現頻度、年齢、性別、Karnofsky performance status (KPS)、神経膠腫に対する標準的抗癌剤である temozolomide の使用の有無、および放射線治療の有無を予後（全生存期間と無増悪生存期間）に対する説明変数として回帰分析を行った。

[結果]

1. 神経膠腫細胞株における TOPK の発現

免疫染色では、各神経膠腫細胞株において 20-30%の細胞が TOPK 陽性であった。また、神経膠腫細胞株における TOPK の mRNA および蛋白発現は、A549 とほぼ同等に認められたが、HT-29 株では検出されなかった。

2. 神経膠腫細胞株の増殖に対する TOPK 阻害剤 OTS964 の効果

各神経膠腫細胞株に対する OTS964 の 50%阻害濃度 (IC₅₀) は、A549 細胞株とほぼ同等であったが、HT-29 株では高濃度であった。

3. 摘出神経膠腫における TOPK 発現と臨床病理的な所見及び予後との関連性

1) GBM 群は非 GBM 群と比較して、有意に Ki-67 陽性細胞と TOPK 陽性細胞の割合が増加していた。また GBM 群では、蛍光 2 重免疫染色で TOPK 陽性細胞の約 70%が Ki-67 陽性であった。

2) TOPK 高値群では TOPK 低値群と比較して、有意に全生存期間と無増悪生存期間が短縮していた。一方、Ki-67 高値群と Ki-67 低値群の間には、予後に有意差は認められなかった。

3) 全生存期間と無増悪生存期間の双方において、TOPK 陽性細胞の割合が独立した予後決定因子として抽出された。

[総括]

悪性神経膠腫は、現代においてもきわめて予後不良であり、新たな治療戦略が求められている。本研究では、TOPK が悪性神経膠腫の新たな治療戦略の標的になりうる可能性を明らかにするため、神経膠腫細胞株および摘出神経膠腫標本を用いて TOPK の発現を解析した。その結果、

1) TOPK が神経膠腫細胞株および摘出標本において高率に発現し、その発現頻度が摘出標本の組織悪性度と関連している、2) 神経膠腫における TOPK の発現は、患者の予後を決定する独立因子である、および 3) in vitro 実験において TOPK 阻害剤である OTS964 が、神経膠腫細胞株の増殖を抑制することなどが明らかになり、TOPK が悪性神経膠腫の重要な治療標的であることが示された。

以上のことから、腫瘍の悪性化に関わる TOPK の役割を神経膠腫において初めて明らかにした点は新規性が高く、また現代においてもきわめて予後不良である悪性腫瘍（悪性神経膠腫）の有望な治療戦略を明らかにしたことは特に医学における重要性が高いと評価された。さらに、TOPK

の阻害剤が有用である可能性が示されたことから臨床応用も期待され、臨床的意義が高いと評価された。以上から、本審査委員会は本論文が博士（医学）の学位に十分値するものと判定した。