

氏 名 とうげ まさよし
峠 正義

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博乙第 70 号

学位授与年月日 平成 30 年 9 月 26 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 4 項該当

学位論文題目

Critical contribution of MCL-1 in EMT-associated
chemo-resistance in A549 non-small cell lung cancer
(MCL-1 は A549 非小細胞肺癌細胞の上皮間葉転換に伴う
抗癌剤耐性において重要な働きを担う)

論文審査委員

(主査)	教授	山崎	光章
(副査)	教授	服部	裕一
(副査)	教授	西田	尚樹
(副査)	教授	林	龍二
(紹介教員)	教授	芳村	直樹

論文内容の要旨

〔目的〕

肺癌は本邦で増加傾向を示しており、癌死亡原因の第一位となっている。未だ全肺癌症例の 5 年生存率は 15-20%と低く、その治療効果は満足し得るものではない。肺癌の最も効果的な治療法は外科的切除であるが、完全切除が行われた早期肺癌であってもしばしば術後の再発・転移が起こる。そのため、生存率の改善を期待してシスプラチンベースの術後補助化学療法が行われている。しかしながら、最も治療効果が期待される I 期肺癌については、術後補助化学療法の効果が示されていない。一方、近年、上皮間葉転換が腫瘍の伸展や抗癌剤耐性に重要な役割を果たしていることが報告されている。

そこで、本研究は上皮間葉転換に伴い抗癌剤耐性を獲得する機序の解明ならびに新たな治療ターゲットの探究を目的とした。

〔方法並びに成績〕

最初に、TGF- β を加えた培地(5ng/ml)で A549 細胞を培養すると、上皮間葉転換が誘導されることを確認した。TGF- β を作用させた A549 細胞(以後 A549/TGF- β 細胞)は紡錘形に変化し、経時的に E-cadherin が減少、N-cadherin は増加した。

次に、A549 細胞と A549/TGF- β 細胞に各種抗癌剤(シスプラチン、パクリタキセル、ゲムシタビン、ビノレルビン)を作用させ、WST-1 assay を用いてその感受性を評価した。A549/TGF- β 細胞では、上記すべての抗癌剤に対して感受性の低下が認められた。さらに、シスプラチンを作用させた後に western blotting 法を行い、PARP と caspase3 の評価を行った。その結果、A549/TGF- β 細胞は A549 細胞と比べて、アポトーシスの誘導が抑制されていた。

そこで、抗アポトーシス作用を有する BCL2 family の発現について western blotting 法と RT-PCR 法で調査を行った。A549 細胞に TGF- β を作用させると、MCL-1 と BCL2A1 が蛋白質レベルおよび mRNA レベルで増加することが判明した。MCL-1 の発現量は TGF- β 添加後 24 時間でピークに達し、72 時間後も維持された。

次に、TGF- β を作用させることで増加した MCL-1 と BCL2A1 が、抗癌剤耐性の原因であるかを調べた。まず、siRNA を用いて MCL-1 と BCL2A1 を抑制し、TGF- β を加えて上皮間葉転換を誘導した細胞と誘導していない細胞にそれぞれシスプラチンを作用させ、WST-1 assay と western blotting 法で評価を行った。MCL-1 を抑制すると、上皮間葉転換に伴うシスプラチン抵抗性が減弱した。一方、BCL2A1 を抑制しても抵抗性は変化しないことが判明した。

さらに、pcDNA3.1 に HA/MCL-1 を組み込み、A549 細胞に導入して安定発現株を樹立した。これにシスプラチンを作用させたところ、western blotting 法と apoptosis assay でアポトーシス抵抗性の増強が確認された。以上より、A549 細胞において、上皮間葉転換に伴う抗癌剤耐性獲得には MCL-1 が重要な役割を担っていることが判明した。

そこで、BCL2 阻害薬である obatoclox mesylate を用いて上皮間葉転換に伴う抗癌剤耐性への影響について評価した。上皮間葉転換を誘導した A549 細胞に、シスプラチンと obatoclox mesylate の両方を作用させると、シスプラチンへの耐性が減弱することが判明した。

〔総括〕

A549 細胞において Mcl-1 は、上皮間葉転換に伴うシスプラチン抵抗性に重要な役割を担っており、Mcl-1 を阻害することで、獲得された耐性が減弱することを報告できた。MCL-1 は今後の肺癌治療の新しいターゲットになる可能性があると考えられる。

学位論文審査の要旨

本邦での部位別癌死亡率の第一位は肺癌であり、その最も効果的な治療法は外科的切除であるが、完全切除が行われた早期肺癌であっても術後の再発・転移が問題となる。そのため、術後に生存率の改善を期待して化学療法が行われるが、肺癌における抗癌剤耐性がしばしば問題となる。近年、上皮系細胞が間葉系細胞に変化する上皮間葉転換が、腫瘍の浸潤や抗癌剤耐性に重要な役割を果たすことが報告されてきたが、肺癌における抗癌剤耐性を獲得する機序については未だ不明な点が多い。そこで、峠正義君は、ヒト線癌由来のA549非小細胞肺癌の上皮間葉転換細胞を用い、シスプラチンに対する感受性低下の原因となるアポトーシス作用を有するBCL2 familyに着目し、抗癌剤耐性を獲得する機序ならびに新たな治療戦略について検討した。

【方法ならびに成績】

最初、TGF- β を作用させたA549 (A549/TGF- β) 細胞の形態が紡錐形に変化し、経時的にはE-cadherinが減少しN-cadherinが増加し、上皮間葉転換が誘導されることを確認した。また、抗癌剤に対する細胞生存率を評価するためにWST-1 assayを用いてA549細胞とA549/TGF- β 細胞に抗癌剤(シスプラチン、パクリタキセル、ゲムシタビン、ビノレルビン) を作用させたところ、A549/TGF- β 細胞では全ての抗癌剤に対して感受性の低下を認めた。

そこで、western blotting法を用いてA549/TGF- β 細胞にシスプラチンを作用させたところ、caspase-3の活性化とPARPの分解が抑制され、アポトーシス抵抗性が認められた。また、A549/TGF- β 細胞では、抗アポトーシス作用を有するBCL family であるMCL-1とBCL2A1のタンパク質量およびmRNA量の増加を認めた。

次に、A549/TGF- β 細胞で増加したMCL-1とBCL2A1が抗癌剤耐性の原因となりうるかについて検討した。siRNAを用いてMCL-1とBCL2A1を抑制し、A549細胞とA549/TGF- β 細胞にそれぞれシスプラチンを作用させ、WST-1 assayとwestern blotting法によって検討した。その結果、MCL-1を抑制すると、上皮間葉転換に伴うシスプラチン抵抗性が減弱したが、BCL2A1を抑制しても抵抗性が変化しないことが明らかとなった。さらに、pcDNA3.1にHA/MCL-1を組み込み、A549細胞に導入してMCL-1を過剰発現させた。この細胞にシスプラチンを作用させたところ、caspase-3の活性化とPARPの分解が抑制され、アポトーシス抵抗性の増強を認めた。以上より、A549細胞において、上皮間葉転換に伴う抗癌剤耐性獲得にはMCL-1が重要な役割を担っていることを明らかにした。

最後に、BCL2阻害薬であるobatoclox mesylate の上皮間葉転換に伴う抗癌剤耐性への影響について検討した。A549/TGF- β 細胞にシスプラチンとobatoclox mesylateを併用して作用させると、caspase-3の活性化とPARPの分解が促進し、シスプラチンへの感受性が増強することを明らかにした。

【総括】

峠正義君は、上皮間葉転換を誘導したA549細胞が抗癌剤への耐性を獲得し、BCL family であるMCL-1が上皮間葉転換に伴うシスプラチン抵抗性に重要な役割を担っていることを明らかにした。本研究成果によって、抗癌剤抵抗性に対するMCL-1の重要性を示したことは新規性が高く、上皮間葉転換に伴う抗癌剤耐性獲得に関する病態を明らかにしたことは学術的に重要である。またBCL2阻害薬が新たな治療の目標となる可能性を示したことは今後の臨床的発展性を大いに期待させる。以上より、本審査委員会は本研究を博士（医学）の学位に十分値すると結論した。