

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 obatoclax 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 obatoclax 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。