

博士論文（要約）

子宮頸癌に対するアポトーシス誘導
を介した治療戦略に関する研究

中村寛江

[序論]

子宮頸癌では、ヒトパピローマウイルス（HPV）がん遺伝子である E6 によって p53 が不活性化されており、p53 依存性アポトーシス機構が破綻している可能性が考えられる。進行・再発子宮頸癌に最もよく使われ、効果が高いとされる薬剤にシスプラチン（CDDP）がある。CDDP を含む化学療法は主に p53 を中心とする内因性のアポトーシス経路を活性化することで抗腫瘍効果を示す事が多いが、依然として奏功率は低く、新たな治療戦略が求められている。

本研究では p53 経路に依存せず、外因性経路を介してアポトーシスを誘導できる、腫瘍特異的アポトーシス誘導因子 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) に着目した。TRAIL は正常細胞には発現せず、腫瘍特異的に発現している death receptor (DR) 4、DR5 を介して腫瘍特異的にアポトーシスを誘導しうるが、TRAIL に対する耐性があることも知られている。本研究では、TRAIL 耐性を克服し、効率的に TRAIL 誘導性アポトーシスを誘導するために、TRAIL 耐性の因子を追究した。さらに、TRAIL 耐性株においても効果的にアポトーシスを誘導する方法として、STAT3 と survivin の抑制と TRAIL の併用を試みた。

STAT3 はシグナル伝達機能と転写活性を持ち、生存・増殖などを調節する因子であり、子宮頸癌を含む様々な癌種で異常活性化されていることが報告されている。STAT3 を抑制することは抗腫瘍効果をもたらす可能性がある。

Survivin はアポトーシス阻害因子 (inhibitor of apoptosis (IAP)) の一つで細胞死誘導阻害、細胞の有糸分裂制御 (細胞周期制御) の機能を持つ。survivin は胎児の発生段階で発現し、分化した正常細胞ではほぼ発現が認められない事が知られている。一方、子宮頸癌を含む多くの癌細胞で survivin は強発現し、予後と逆相関していることが報告されており、癌の治療ターゲットとして注目されている。

Resveratrol (RVT) は天然由来ポリフェノールの一種で、免疫経路、アポトーシス経路、細胞増殖シグナルなど多くの経路に作用することで抗酸化作用、抗腫瘍作用、抗炎症作用を持つことが知られており、様々な癌種で臨床試験も行なわれている。STAT3 と survivin を抑制することも知られているが、子宮頸癌細胞において、それらを抑制することで TRAIL 感受性を増強するかどうかは明らかとなっていない。

本研究の目的は、

1. 子宮頸癌細胞において TRAIL 耐性の要因となっている因子を追究すること
 2. STAT3 阻害が TRAIL 誘導性アポトーシスを増強させるかを明らかにすること
 3. survivin 阻害が TRAIL 誘導性アポトーシスを増強させるかを明らかにすること
 4. resveratrol が子宮頸癌細胞において、STAT3, survivin を抑制し、TRAIL 誘導性アポトーシスを増強するか明らかにすること
- である。

[方法]

1. HPV16 陽性子宮頸癌細胞株 CaSki (TRAIL 感受性株) と SiHa (TRAIL 耐性株)を用い、TRAIL 感受性の差の要因を追究するため、アポトーシス関連蛋白の基礎発現をアポトーシスアレーを用いて評価した。また、TRAIL 刺激後のアポトーシス関連蛋白の変化をウェスタンブロット (WB) 法で評価した。続いて、TRAIL 刺激での NF κ B, STAT3 の反応を WB 法で評価した。
2. TRAIL 耐性株 SiHa において STAT3 抑制が TRAIL 誘導性アポトーシスを増強させるかを評価するため、STAT3 特異的 siRNA、STAT3 阻害剤 S3I-201 を用いて STAT3 活性を抑制し、TRAIL 誘導性アポトーシスを annexin-V 染色を用いてフローサイトメトリで評価した。また、CCK-8 を用いた細胞増殖アッセイで、S3I-201 刺激後に TRAIL 刺激を加えることが細胞生存に与える影響を評価した。さらに、ER ストレス誘導因子である tunicamycin が SiHa の STAT3 を抑制するかを WB 法で評価し、tunicamycin 刺激が TRAIL 誘導性アポトーシスを増強するかを annexin-V 染色及び CCK-8 アッセイで評価した。
siRNA による STAT3 発現抑制がシスプラチン誘導性アポトーシスに与える影響を annexin-V 染色を用いてフローサイトメトリで評価した。
3. CaSki, SiHa での survivin の機能を評価するため、survivin 特異的 siRNA を用いて survivin 発現を抑制し、接着細胞数カウントにより細胞生存を評価し、PI 染色を用いて細胞周期を評価した。続いて TRAIL 耐性株 SiHa において、survivin 抑制が TRAIL 誘導性アポトーシスを増強させるかを評価するため、survivin 特異的 siRNA, survivin 阻害剤 YM155 を用いて survivin を抑制し、TRAIL 誘導性アポトーシスを annexin-V 染色を用いてフローサイトメトリで評価した。
siRNA による survivin 発現抑制がシスプラチン誘導性アポトーシスに与える影響を annexin-V 染色を用いてフローサイトメトリで評価した。
4. RVT が SiHa において survivin, STAT3 活性を抑制することを PCR 法、WB 法で評価し、RVT 刺激が TRAIL 誘導性アポトーシスを増強させるかを annexin-V 染色を用いてフローサイトメトリで評価した。

[結果]

まず、TRAIL 感受性株 CaSki と TRAIL 耐性株 SiHa での TRAIL 感受性の差の要因を追究した。

アポトーシスアレーにより CaSki と SiHa のアポトーシス関連蛋白の基礎発現の差を検討したが、有意な差は認めなかった。TRAIL 刺激後のアポトーシス関連蛋白の反応にも有意な差はなかった。続いて TRAIL 刺激で活性化しうる非アポトーシス蛋白経路 NF κ B と STAT3 に着目した。TRAIL 刺激により、CaSki SiHa 共に NF κ B が賦活化されたのに対して、STAT3 は CaSki では抑制され、SiHa では抑制されなかった。

次に、STAT3 発現を抑制することによって、TRAIL 耐性株 SiHa において TRAIL 誘導性アポトーシスを誘導できるかを検討した。siRNA を用いた STAT3 発現抑制、および STAT3 阻害剤 S3I-201 による STAT3 活性抑制後に TRAIL 刺激を行い、アポトーシスを評価したところ、両者ともに有意にアポトーシス誘導が増強した。また、S3I-201 刺激後に TRAIL を添加すると、細胞生存は抑制された。ER ストレス誘導因子 tunicamycin (TM) は、濃度依存的に STAT3 活性を抑制し、TRAIL 誘導性アポトーシスを相乗的に増強させた。一方、siRNA による STAT3 発現抑制は SiHa の CDDP 誘導性アポトーシスを増強しなかった。

さらに、STAT3 に比し、より癌特異的な標的として survivin に着目した。子宮頸癌細胞における survivin の機能を追究し、survivin 抑制が TRAIL 耐性株 SiHa において TRAIL 誘導性アポトーシスを増強するかを検討した。siRNA を用いて survivin 発現を抑制すると、SiHa、CaSki 共に細胞生存率が低下し、G2/M 細胞周期停止が誘導された。siRNA による survivin の発現抑制、survivin 阻害剤 YM155 による survivin 抑制は TRAIL 耐性株 SiHa において、TRAIL 誘導性アポトーシスを相乗的に増強させた。なお、siRNA による survivin 発現抑制、YM155 による survivin 阻害のいずれも SiHa の CDDP 誘導性アポトーシスを増強しなかった。

最後に、RVT が TRAIL 誘導性アポトーシスを増強できるかを検討した。SiHa 細胞において、RVT は STAT3 活性と survivin 発現が抑制し、TRAIL 誘導性アポトーシスを相乗的に増強した。

[考察]

子宮頸癌は HPV によって p53 の機能が抑制されている、という特徴を持ち、従来から施行されている化学療法のみでは臨床効果が不十分であることから、子宮頸癌細胞に効果的にアポトーシスを誘導する方法を検討した。

TRAIL は DR4、DR5 を介して腫瘍特異的に、かつ p53 経路を介さずにアポトーシスを誘導することから、子宮頸癌に対する効果的な治療としての可能性を持つ。

HPV16 陽性 CaSki は TRAIL 感受性があり、SiHa 細胞は TRAIL 耐性であることが報告されている。本研究においては、まず CaSki と SiHa の TRAIL に対する反応性の差の要因を追究した。アポトーシス関連蛋白の基礎発現、及び TRAIL 刺激後のアポトーシス関連蛋白の反応の比較では、両者の TRAIL 感受性の差の要因を見出す事はできなかった。そこで次に TRAIL によって誘引されうる、非アポトーシス経路に着目した。TRAIL 刺激によって CaSki の STAT3 は抑制され、SiHa の STAT3 は抑制されなかったことから、TRAIL 感受性の差は、TRAIL に対する STAT3 の応答の差が要因である可能性が示唆された。続いて、STAT3 を抑制すると、TRAIL 耐性株 SiHa においても、TRAIL 誘導性アポトーシスを効果的に誘導することが可能となった。子宮頸癌において、TRAIL 感受性の差の要因が STAT3 活性である可能性が本研究で初めて明らかとなった。

STAT3 は正常細胞にも広く分布することから、より癌特異的な治療標的として、次に抗アポトーシス蛋白である survivin に着目した。survivin の発現抑制は CaSKI, SiHa で G2/M 細胞周期停止を誘導し、細胞増殖を抑制した。また、survivin 抑制は TRAIL 耐性 SiHa においても、TRAIL 誘導性アポトーシスを誘導した。

STAT3, survivin を共に抑制する可能性のある因子として、天然由来ポリフェノールである RVT に着目した。RVT は SiHa において STAT3, survivin を抑制し、TRAIL 誘導性アポトーシスを増強した。

なお、SiHa で STAT3, survivin をそれぞれ抑制しても CDDP 誘導性アポトーシスは増強されなかった。

これまでに、STAT3 抑制, survivin 抑制と CDDP の併用でアポトーシスの増強効果を示した報告は複数あるにも関わらず、SiHa 細胞において CDDP との併用ではアポトーシスを増強することはなかった。STAT3・survivin 抑制が TRAIL 誘導性アポトーシスを増強し、CDDP 誘導性アポトーシスを増強しない要因は、TRAIL, CDDP それぞれが誘導するアポトーシスシグナルの違いによると考える。TRAIL 誘導性アポトーシスでは、caspase-8 の誘導が不可欠であり、アポトーシス誘導蛋白と抗アポトーシス蛋白のバランスによって最終的にアポトーシスが誘導されるかを決定する。抗アポトーシス作用を持つ survivin や STAT3 を抑制することは、このバランスをアポトーシスに傾けさせ、TRAIL 誘導性アポトーシスが顕著に増加したと考えられる。一方、CDDP は DNA 障害を来すことで、主に p53 を中心とした内因性経路を経てアポトーシスを誘導する。子宮頸癌では p53 の機能が抑制されているため、CDDP 誘導性アポトーシスを増強するためには、抗アポトーシス蛋白を抑制するよりも、DNA 損傷センサーを増強するなど、DNA 損傷応答の経路を標的とする手段を併用する事が有効だと考えられる。

以上より、p53 の機能異常を持つ子宮頸癌細胞においては、STAT3 抑制、survivin 抑制と TRAIL の併用が有効である可能性が示唆された。

進行・再発子宮頸癌に一律に化学療法を行なうのではなく、コンパニオン診断を行い、治療を個別化する上で、今回の研究が一助となる可能性がある。今後は、TRAIL 単独、もしくは STAT3・survivin 阻害と TRAIL の併用療による治療において効果予測のバイオマーカーの探索が必要であると考ええる。

CDDP を主としたこれまでの化学療法のみでは臨床効果が不十分であることから、今後の治療効果改善に繋がるように本研究の臨床応用が期待される。