

審査の結果の要旨

氏名 大本 晃弘

本研究は希少がんかつ難治がんである消化器神経内分泌がん (NEC) に対して、その細胞株を用いて殺細胞性抗がん剤の感受性に関する評価を行い、この結果を基礎データとして分子標的薬剤 (PARP 阻害剤、EZH2 阻害剤) の効果を検証することを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 3種のNEC細胞株に対するCDDPの薬剤感受性をviability assayで評価したところ、化学療法歴のない手術標本から樹立された食道原発株 (TYUC-1) の感受性が最も高く、樹立前にCDDPをはじめとした多種にわたる化学療法歴のある膵原発株 (A99) は不良であった。薬剤感受性と一致するように、抗がん剤の薬剤耐性との関連が指摘されるATP binding cassette subfamily B member1 (ABCB1) の遺伝子、タンパク発現を評価したところ、A99での発現が最も亢進しているのに対してTYUC-1では発現を認めなかった。
2. 原発臓器の正常細胞由来不死化細胞株である膵管細胞株と十二指腸細胞株をコントロールとして消化器NEC細胞株におけるPARP1の遺伝子発現を評価したところ、A99、TYUC-1において有意な発現上昇を認めた ($P = 0.0008$; $P = 0.014$)。EZH2 遺伝子発現は、TYUC-1において有意に亢進しており、A99についても上昇傾向であった ($P = 0.037$; $P = 0.071$)。EZH2 のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性により生成されるヒストンH3 リシン 27 トリメチル (H3K27me3) のタンパク発現は、EZH2 遺伝子発現に一致してTYUC-1で増強していた。
3. PARP 阻害薬 Veliparib に対する *in vitro* の感受性はCDDP 低感受性株であるA99で最も高く、CDDP との併用効果も高かった。本細胞株においては、Veliparib 投与により蛍光染色においてDNA二本鎖切断を反映する γ -H2AX 染色陽性細胞比率が増加し、CDDP との併用により更なる陽性細胞率の上昇が観察された。セルサイクルアッセイを行ったところ Veliparib 投与によりS期細胞比率の上昇を認め、S期の進行に必要な細胞周期制御調節因子であるCyclin A ならびにCDK2の遺伝子発現が上昇した。本細胞株をBALB/cヌードマウスに移植したゼノグラフトモデルにおいて、Veliparib 投与は体重減少をきたすことなく有意に腫瘍の増大を抑制した ($P = 0.045$)。
4. EZH2 阻害薬 Tazemetostat に対する *in vitro* の感受性はTYUC-1において、他の二つ

の細胞株と比較し 40 倍程度上昇していた。TYUC-1 を使用してセルサイクルアッセイを行うと、アポトーシスを反映し sub-G1 期の細胞比率が薬剤の投与期間・濃度依存的に上昇し、cleaved PARP1 シグナルの増強を認めた。ウェスタンブロッティングにおいては、TCC-NECT-2、TYUC-1 共に 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の Tazemetostat 投与により H3K27me3 のシグナルは同様に消失しており、EZH2 阻害薬の抗腫瘍効果はエピジェネティックな機序のみではなく、腫瘍の遺伝子変異を含めた複合的な要因により決定されることが示唆される結果であった。ゲノム解析からは 3 種の細胞株で *EZH2* 変異は明らかでなかった。

以上、本論文はこれまで前臨床的研究がほとんど行われてこなかった消化器 NEC の一部に対して PARP 阻害剤、EZH2 阻害剤が有用である可能性を示した。同時に各腫瘍により薬剤の感受性や作用メカニズムが多様であることを明らかにした。本研究は、今後の消化器 NEC に対する治療開発の基盤的データとして重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。