

論文の内容の要旨

論文題目 子宮体癌細胞株に対する抗マラリア薬クロロキンとサバイビン阻害薬 YM155 の抗腫瘍効果の検討

氏名 福田 友彦

子宮体癌は婦人科悪性腫瘍の中で最も発症頻度が高く、世界的にもさらに増加する傾向にある。初期子宮体癌の治療は手術が中心となり、化学療法、放射線療法なども併用されるが、進行例や再発例には主に化学療法が選択される。化学療法として、パクリタキセルとカルボプラチン併用療法やドキソルビシンとシスプラチン併用療法が主に用いられるが、それ以外の治療選択肢は少なく、進行例および再発例への治療効果は限定的であり、標準的化学療法後の再発例に有効な薬剤も限られており、新規抗癌剤の登場が囑望されている。

クロロキンは 1934 年にドイツで合成された抗マラリア薬で、現在もマラリアの治療に使用されている。クロロキンは近年、抗炎症作用やオートファジー阻害作用等の新規作用が明らかとなり、全身性エリテマトーデスや関節リウマチなどの膠原病やがんの治療薬として開発が進んでいる。日本では網膜症が副作用で起きることから発売中止となったが、誘導体であるヒドロキシクロロキンが全身性エリテマトーデスの治療薬として承認された。海外では複数のがん種でクロロキンをを用いた臨床試験が施行されており、がん治療への応用が期待されている。オートファジーは自己食食を意味し、細胞内代謝を正に制御することで腫瘍増殖を促進する可能性が示唆されており、オートファジー阻害ががん抑制に寄与する可能性がある。クロロキンはオートファゴソームのリソソームへの結合阻害を介してオートファジーを阻害することが知られており、この阻害

作用は抗がん作用の機序の一つである可能性がある。子宮体癌に対するクロロキンの効果やオートファジーの関与は不明であることから、本研究では子宮体癌細胞株におけるクロロキンの細胞増殖抑制効果とオートファジーの関与について検討した。複数の子宮体癌細胞株に対し、クロロキンは濃度依存性に細胞増殖を抑制した。50%増殖阻止濃度は他がん種細胞株で報告されている濃度と比較し低値であり、子宮体癌細胞株がクロロキン高感受性である可能性が示唆された。また、クロロキンは Ishikawa, AN3CA, KLE 子宮体癌細胞株に対し、オートファジーを阻害し細胞死を誘導した。Ishikawa 細胞のオートファジー関連遺伝子 *ATG5*, *ATG7* をノックダウンすることでクロロキンへの感受性が低下することから、細胞死誘導にオートファジー阻害が関与することが示された。また、シスプラチン添加培地で長期培養し樹立したシスプラチン耐性 Ishikawa 細胞は、親株と比較しオートファジーが亢進しており、クロロキンへの感受性も亢進していた。また、5 μ M のクロロキンを併用すると、シスプラチン感受性は親株では明らかな変化を認めなかったが、シスプラチン耐性株では有意な改善を認めた。以上から、クロロキンによるオートファジー阻害がシスプラチン耐性を克服することが示された。

SIRT6 はサーチュインファミリーに属するクラス 3 ヒストン脱アセチル化酵素であり、主に核に局在し、HIF1 α 、TNF α 、NF- κ B などの様々ながん促進遺伝子と相互作用することが知られている。また、SIRT6 はがんに特徴的な代謝である好氣的解糖すなわち Warburg 効果を負に制御することでがん抑制遺伝子として働く可能性が示されている。子宮体癌はメタボリックシンドロームなどの生活習慣病が発症リスク因子となることが知られており、代謝の制御を司る SIRT6 が子

宮体癌において癌抑制に寄与する可能性が示唆されるため、子宮体癌細胞株を用いて SIRT6 の機能解析を施行した。子宮体癌 16 細胞株とコントロールとして子宮内膜不死化細胞を用いてウェスタンブロット法を施行したところ、子宮体癌細胞株においては SIRT6 タンパク発現が子宮内膜不死化細胞と比較し低下していた。また当院で手術を行った子宮体癌 104 症例の組織マイクロアレイを作成し免疫染色を行ったが、核内 SIRT6 高発現群では低発現群と比較し、全生存率が良好な傾向がみられた。SIRT6 タンパクが比較的低発現であった AN3CA, KLE 子宮体部細胞株に対し SIRT6 を過剰発現させると細胞増殖が抑制され、逆に SIRT6 を siRNA でノックダウンすると細胞増殖が亢進することから、SIRT6 が 2 株に対し細胞増殖抑制効果を持つことが分かった。フローサイトメトリー解析で、SIRT6 過剰発現で subG1 分画の有意な増加を認め、細胞死が誘導された。以上から、SIRT6 は子宮体癌細胞株に細胞死を誘導し細胞増殖を抑制することが示された。細胞死関連タンパクのウェスタンブロット法を施行したところ、SIRT6 過剰発現で抗細胞死因子サバイビンの発現が抑制された。定量的リアルタイムPCRでもサバイビン mRNA 発現低下を認め、AN3CA 細胞を用いてサバイビンプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイで評価したところ、SIRT6 は有意にサバイビンプロモーター活性を抑制した。また、AN3CA, KLE 細胞とコントロールの子宮内膜不死化細胞でサバイビンのノックダウンを行うと、子宮体癌細胞株特異的に細胞死が誘導された。従って、SIRT6 はサバイビンの発現抑制機序により、細胞死を誘導することが示された。この結果からサバイビンの阻害も子宮体癌に対し有効な治療選択肢となる可能性が示唆された。以上の結果を受け、他がん腫で既に臨床試験も進行しているサバイビン阻害薬 YM155 に着目し、

子宮体癌細胞株に対する細胞増殖抑制効果について検討したが、YM155 は AN3CA, KLE 細胞株に対し、濃度依存性に細胞増殖を抑制した。またウェスタンブロット法では YM155 が 2 株に対し、濃度依存性にサバイビンのタンパク発現を抑制し、フローサイトメトリー解析で YM155 は 50nM の比較的低濃度で 2 株に対し顕著な細胞死を誘導することが示された。YM155 によるサバイビン阻害と siRNA を用いたサバイビンのノックダウンによるサバイビンのタンパク発現抑制効果は同程度であったが、YM155 の方が顕著にアポトーシスを誘導し、YM155 のサバイビン阻害以外の細胞増殖抑制機序も推測された。

以上の研究結果から、子宮体癌細胞株に対する抗マラリア薬クロロキンとサバイビン阻害薬 YM155 の抗腫瘍効果が証明された。YM155 は子宮体癌に対する初回化学療法として、クロロキンはシスプラチン抵抗性の再発子宮体癌の化学療法としての臨床応用が期待される。また、SIRT6 は子宮体癌においてがん抑制遺伝子として機能することを証明し、SIRT6 を標的とした分子標的治療も子宮体癌に対する新規治療になり得る可能性が示唆された。