

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 福田 友彦

子宮体癌は婦人科癌の中で最も発症頻度が高く、再発時の化学療法の選択肢が乏しいことから、本研究は子宮体癌に対する新規化学療法の開発を目指し、抗マラリア薬クロロキンおよびサバイビン阻害薬 YM155 の子宮体癌細胞株における抗腫瘍効果を検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. 子宮体癌細胞株にクロロキンを添加し、MTT アッセイで短期の細胞増殖を、コロニー形成アッセイで長期の細胞増殖を、フローサイトメトリーで細胞周期とアポトーシスを評価した。クロロキンは子宮体癌細胞株に対しアポトーシスを誘導し細胞増殖を抑制し、細胞増殖抑制効果は p53 の変異の有無と無関係であった。Ishikawa 株にクロロキンを添加し、LC3 のウエスタンブロット法と細胞免疫染色でオートファジーについて評価し、オートファジー構成因子である ATG5 と ATG7 のノックダウンを施行し MTT アッセイを用いて細胞増殖抑制効果を評価した。クロロキンは Ishikawa 株でオートファジーを抑制し、ATG5 と ATG7 のノックダウンでクロロキンの感受性が有意に低下した。また、ATG5 と ATG7 のノックダウンでオートファジーが阻害され、細胞増殖も抑制傾向にあった。以上から、オートファジー阻害は子宮体癌細胞株に対し細胞増殖を抑制する可能性と、クロロキンがオートファジーを阻害する事で抗腫瘍効果を持つ可能性が示唆された。
2. Ishikawa 株に子宮体癌の代表的抗癌剤であるシスプラチンを添加し、オートファジーについて評価したところ、シスプラチンは Ishikawa 株にオートファジーを誘導した。Ishikawa 株に長期にシスプラチンを添加し、シスプラチン耐性株(CP-r)を樹立しクロロキンの感受性を MTT アッセイで評価した。CP-r はクロロキン感受性が親株より良好であり、5 μ M のクロロキン併用でシスプラチンへの感受性の回復を認めた。また、Ishikawa 株に ATG5 と ATG7 のノックダウンを施行し、シスプラチン感受性を MTT アッセイで評価した。一部の siRNA でシスプラチン感受性の亢進を認め、シスプラチンによるオートファジー誘導が細胞増殖促進効果を持つ可能性が示唆された。
3. 子宮体癌 104 症例で組織マイクロアレイを作成し、ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT6 の免疫組織化学を施行した。核内 SIRT6 高発現群では有意差は認めなかったが ($p=0.18$)、予後の良い傾向にあった。次に、子宮体癌細胞株 16 株とコントロールとして子宮内膜上皮不死化細胞を用いて、SIRT6 のウエスタンブロット法を施行した。子宮体癌細胞株では、コントロールと比較し全般的に SIRT6 発現が低下していた。
4. 比較的 SIRT6 低発現であった AN3CA と KLE 株を用いて、SIRT6 の過剰発現とノ

ックダウンを施行し、生存細胞数計測で細胞増殖を評価した。SIRT6 過剰発現で細胞増殖抑制が、ノックダウンで細胞増殖亢進を認め、SIRT6 は子宮体癌細胞株に対し細胞増殖抑制効果を持つことが示された。2 株を用いて、SIRT6 過剰発現を施行しフローサイトメトリーでアポトーシスを評価したところ、共にアポトーシスが誘導された。同時にウエスタンブロット法でアポトーシス関連分子の発現について評価し、共にサバイビンの発現抑制を認めた。2 株に SIRT6 のノックダウンを施行しサバイビン発現を評価したところ、逆にサバイビンの発現亢進を認めた。AN3CA 株でルシフェラーゼアッセイを施行し、サバイビンプロモーターの転写活性に与える影響を、リアルタイム PCR で mRNA 発現を評価した。SIRT6 はサバイビンの転写活性を有意に抑制し、mRNA 発現も抑制傾向にあった。以上から、SIRT6 によるサバイビンの転写抑制を介する細胞死誘導機序が示唆された。

5. AN3CA と KLE 株と子宮内膜不死化細胞を用いてサバイビンのノックダウンを施行し、フローサイトメトリーでアポトーシスを評価した。サバイビン抑制は子宮体癌細胞株選択的にアポトーシスを誘導した。2 株を用いて、サバイビン阻害薬 YM155 の細胞増殖抑制効果を MTT アッセイで、アポトーシス誘導をフローサイトメトリーで評価した。YM155 は低濃度で顕著な細胞死を誘導し、濃度依存性に細胞増殖を抑制した。また、サバイビン発現抑制はノックダウンと YM155 で同程度であったが、YM155 のアポトーシス誘導はより顕著であり、YM155 のサバイビン阻害以外のアポトーシス誘導機序が示唆された。

以上、本論文は子宮体癌細胞株に対するクロロキンと YM155 の抗腫瘍効果を明らかにし、SIRT6 が子宮体癌においてがん抑制遺伝子として機能する可能性を示した。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可能性が期待され、本研究は子宮体癌化学療法に新たな選択肢を提示する端緒となると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。