

論文の内容の要旨

論文題目 滑膜肉腫に対する治療薬の探索

(Investigation of effective chemotherapy for synovial sarcoma)

氏名 山崎 寛之

■背景

滑膜肉腫(synovial sarcoma)は、全軟部肉腫の約 10%(年間発症例数が人口 100 万人に対して 1-3 人)を占める悪性腫瘍で青年期(10-40 歳代)に多く発症する。滑膜肉腫は組織由来不明の悪性軟部腫瘍であり、好発部位は四肢の関節近傍、特に膝関節周辺である。この腫瘍は、18 番染色体上の *SYT* (synovial sarcoma translocation)遺伝子と X 染色体上の *SSX* (synovial sarcoma X chromosome breakpoint)遺伝子の転座 t(X; 18)(p11.2; q11.2)によって *SYT-SSX* 融合遺伝子を生じる。この *SYT-SSX* 融合遺伝子はラット正常繊維芽細胞に発現させると、足場非依存的に増殖し、ヌードマウスにおいて腫瘍形成を誘発することが報告されており、*SYT-SSX* 融合遺伝子が滑膜肉腫発症の引き金になっていることが示唆されている。滑膜肉腫は局所再発や転移に関して治療後も長期に渡り経過観察が必要な腫瘍であり、予後不良の腫瘍であるものの、希少腫瘍のため治療法の開発が進んでおらず、治療法が確立されていないのが現状である。現在、滑膜肉腫に対する化学療法として二本鎖 DNA 切断を誘起する AI (アドリアマイシン・イフォスファミド)療法が行われているものの、その奏功率は 50%未満と低く、滑膜肉腫と DNA 修復の関連性について調べた研究はこれまでにない。そこで私は、滑膜肉腫に対する有効な化学療法の確立を目的として、滑膜肉腫における二本鎖 DNA 修復活性の異常に関して解析を行った。

■実験方法および実験材料

1. 滑膜肉腫細胞における DNA 相同組み換え修復活性の解析
滑膜肉腫細胞において DNA 相同組み換え修復活性が低下しているのか解析するため、二本鎖 DNA 切断を誘発する電離放射線や薬剤に対する感受性をコロニーアッセイ法により解析した。さらに、DNA 相同組み換え修復活性を測定するため、DR-GFP レポーター遺伝子をゲノムに挿入した滑膜肉腫細胞株(DR-GFP レポーターアッセイ細胞株)を作成した。さらに、DNA 相同組み換え修復のどのステップに異常を起しているのか解析するため、電離放射線照射によって二本鎖 DNA 切断を誘発し、4 時間後に細胞を固定した。固定した細胞に数種類の DNA 相同組み換え修復因子に対する抗体を作用させ、免疫染色法を用いて蛋白質の二本鎖 DNA 切断部位(DNA 損傷部位)への集積を調べた。
2. 滑膜肉腫の PARP 阻害剤感受性解析
DNA 相同組み換え修復活性が低下している細胞は PARP 阻害剤感受性を示すことが知られて

いる。そこで、PARP 阻害剤に対する感受性をコロニーアッセイにより解析した。また、DNA 一本鎖切断を誘起するテモゾロミドとの併用を同様にコロニーアッセイにより解析した。

3. 滑膜肉腫のプロテアソーム阻害剤感受性解析

DNA 相同組換え修復活性が低下している細胞がプロテアソーム阻害剤の一つであるボルテゾミブに感受性を示すことが報告されている。そこで、ボルテゾミブによる細胞増殖抑制効果を測定するため、薬剤を添加してから 48 時間後の細胞数を数えることで、薬剤に対する感受性を測定した。また、ボルテゾミブ添加によって影響を受ける遺伝子を探索するため、IC50 の 4 倍の濃度のボルテゾミブを滑膜肉腫細胞に 4 時間作用させ、RNA を回収後、マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。

■実験結果と考察

1. 滑膜肉腫細胞における DNA 相同組み換え修復活性の解析

臨床で用いられている AI 療法は、アドリアマイシンが二本鎖 DNA 切断を、そしてイフォスファミドはアルキル化剤で DNA 一本鎖切断を引き起こす。これらの DNA 損傷によって最終的に二本鎖 DNA 切断を生じさせる古典的な抗がん剤である。この二本鎖 DNA 切断を修復する経路は相同組み換え修復 (homologous recombination) と非相同末端結合 (non-homologous end joining) 修復の 2 つの経路が存在する。滑膜肉腫は発症由来細胞がわかっていないため、DNA 相同組み換え修復で働く NBS1 が欠損した GM07166VA7 細胞(以下、GM 細胞と表記)および NBS1 を発現させた GM07166VA7 細胞(以下、GM-NBS1 細胞と表記)をコントロールとして用いた。まず、滑膜肉腫が二本鎖 DNA 切断に感受性を示すかをコロニーアッセイにより測定した。その結果、滑膜肉腫細胞は GM 細胞と同様に DNA 損傷に対して感受性を示した(Fig. 1A)。さらに DR-GFP レポーターアッセイを用いて、細胞内における実際の DNA 相同組み換え修復活性を測定したところ、GM-NBS1 細胞と比較して DNA 相同組み換え修復活性が低下していた(Fig. 1B)。

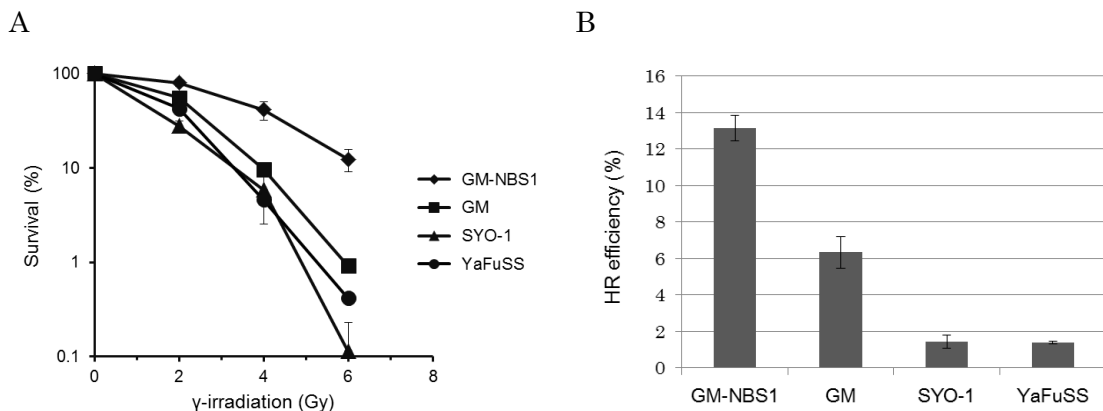


Figure 1. 滑膜肉腫細胞は DNA 相同組み換え修復活性が低下している

以上の解析結果から、滑膜肉腫細胞は DNA 相同組み換え修復活性が低下していることがわかった。次に、滑膜肉腫細胞の DNA 相同組み換え修復活性が低下している原因を探索するため、滑膜肉腫細胞に電離放射線を照射し、二本鎖 DNA 切断を誘発した。4 時間後に細胞を固定し、複数の DNA 相同組み換え修復因子の抗体を用いた細胞染色を行った。その結果、滑膜肉腫細胞では DNA 相同組み換え修復で働く RPA32 の DNA 損傷部位への集積は正常であったが、RAD51 の DNA 損傷部位への集積は低下していた。DNA 相同組み換え修復の後半部分では一本鎖 DNA 上に結合した RPA32 は RAD51 と相互作用し、一本鎖 DNA 上で RPA32 と RAD51 は入れ替わることが知られている。従って、RAD51 が一本鎖 DNA 上に結合した RPA32 と入れ替わることが出来ないことが原因となり、滑膜肉腫細胞の DNA 相同組み換え修復活性が低下していることがわかった。

2. 滑膜肉腫の PARP 阻害剤感受性解析

PARP 阻害剤は DNA 相同組み換え修復異常の細胞を選択的に合成致死に導くことが知られている。そこで、DNA 相同組み換え修復活性が低下している滑膜肉腫細胞を用いた PARP 阻害剤(オラパリブ)感受性試験を行った。コロニーアッセイの結果から、オラパリブが濃度依存的に滑膜肉腫細胞の増殖を抑えることがわかった(Fig. 2A)。さらに治療への応用を志向し、一本鎖 DNA 切断を引き起こし、PARP を一本鎖 DNA に固定することが知られているアルキル化剤(テモゾロマイド)とオラパリブの併用による細胞増殖能への影響を評価した。その結果、テモゾロマイド単剤では滑膜肉腫細胞の増殖抑制効果は示さないが、オラパリブと併用することにより相乗的な細胞増殖抑制能を示すことがわかった(Fig. 2B)。

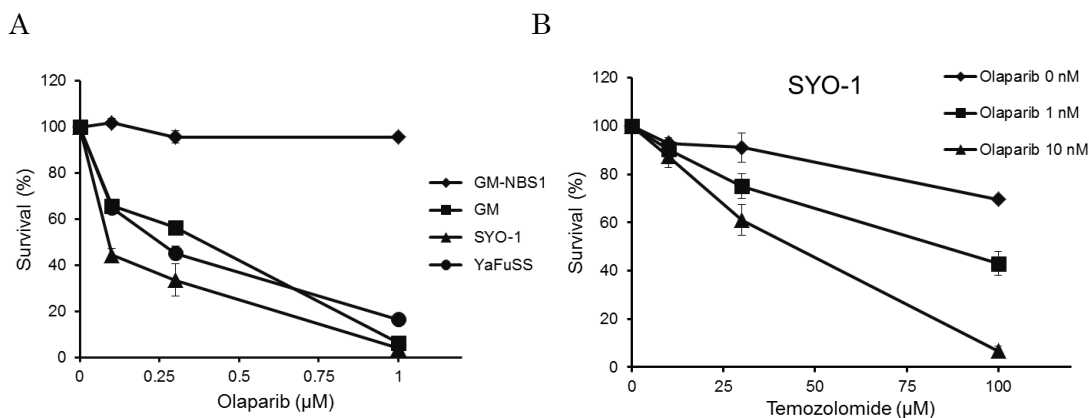


Figure 2. 滑膜肉腫細胞は PARP 阻害剤オラパリブに対して感受性を示す

以上の解析結果から、PARP 阻害剤(オラパリブ)、あるいはアルキル化剤(テモゾロマイド)との併用は滑膜肉腫の治療薬として有効性が期待される。今後、マウスに移植した滑膜肉腫細胞を用いたオラパリブの抗腫瘍効果の検証を行う予定である。

3. 滑膜肉腫のプロテアソーム阻害剤感受性解析

DNA 相同組み換え修復活性が低下した細胞は、プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブに対して感受性を示すことが知られている。そこで、ボルテゾミブが滑膜肉腫細胞においても細胞増殖抑制阻害効果を示すのか検証を行った(以下の実験ではコントロール細胞として DNA 相同組み換え活性が正常な HeLa 細胞を用いている)。その結果、ボルテゾミブが濃度依存的に滑膜肉腫細胞の増殖を抑えることが分かった(Fig. 3)。

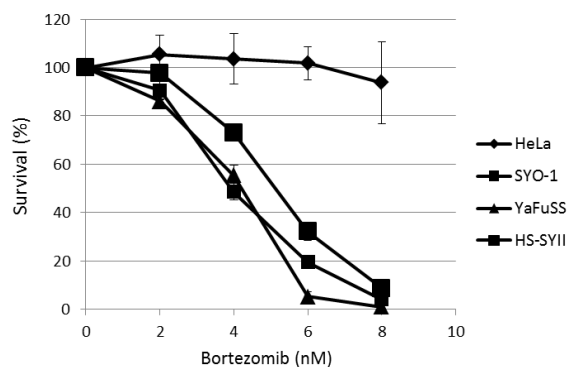


Figure 3. 滑膜肉腫細胞はプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブに対して感受性を示す

また、プロテアソーム阻害剤の一つであるボルテゾミブは蛋白質の分解を阻害することから細胞内の多くの経路に影響を与えることが予想された。そこで、ボルテゾミブ添加によって影響を受ける遺伝子、あるいは遺伝子経路を探索するため、IC₅₀ の 4 倍の濃度のボルテゾミブを滑膜肉腫細胞に 4 時間作用させ、マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、ボルテゾミブ添加によって多くの遺伝子の発現が変化することが分かった(Table 1 and 2)。

Table 1. Genes upregulated by bortezomib

Table 2. Genes downregulated by bortezomib

		Fold Change					Fold Change		
		SYO-1	YaFuSS	HS-SYII			SYO-1	YaFuSS	HS-SYII
GDF15	NM_004864	21.88049	12.26375	3.04224	DDIT3	NM_004083	-11.74071	-2.18020	-9.56401
PVRL4	NM_030916	8.70874	3.10129	3.84951	SLC35E3	ENST00000399333	-5.82641	-2.45551	-3.16840
CDKN1A	NM_078467	7.43843	3.98530	3.26020	TLR9	NM_017442	-4.88908	-2.24071	-4.58796
FOSL1	NM_005438	5.60136	3.33706	4.35265	CHAC1	NM_024111	-4.75774	-19.27754	-3.36462
PLK3	NM_004073	4.58082	8.64686	3.69640	TAS2R10	NM_023921	-3.72388	-7.50066	-5.33246

ボルテゾミブ添加によって発現上昇する遺伝子の中にがん抑制遺伝子 p53 の標的遺伝子が入っていることが分かった(Table 1)。p53 の活性化は細胞周期停止やアポトーシスを誘導することが知られている。従って、今後、ボルテゾミブ添加による滑膜肉腫細胞の増殖抑制と p53 の活性化との関連を調べる予定である。