

## 審査の結果の要旨

氏名 西川 武司

本研究は、抗癌剤などの治療耐性のメカニズムの一つとして癌細胞や血管内皮細胞によるオートファジー誘導に注目し、イソチオシアネートの一種であるスルフォラファン(SUL)の効果を検討したものである。癌細胞および腫瘍血管内皮細胞に対して抑制作用を有することが確認されている SUL を作用する際に、オートファジーの特異的阻害剤を併用することにより、SUL の抗腫瘍作用および抗血管新生作用の増強が得られるかについて検討し、下記の結果を得ている。

### 1. ヒト大腸癌細胞株 (WiDr) に対する SUL の効果およびオートファジー阻害剤併用の影響

(1) SUL 単独処理にて、WiDr の増殖は濃度依存的に抑制された。高濃度の SUL(80 $\mu$ M)処理では、アポトーシスが強く誘導されたが、より低濃度の SUL(40  $\mu$ M)では、増殖抑制は認められたものの、アポトーシスの誘導は認めなかった。

(2) SUL 処理(20-40  $\mu$ M)において、オートファジーの特徴的な所見、すなわち acidic vesicular organelles(AVOs)形成および light chain 3(LC3)局在を認めた。Western blot にて LC3-II の発現が確認され、SUL の濃度依存的に増加した。

(3)オートファジーの特異的阻害剤である 3-methyladenine(3-MA)の併用により、SUL のアポトーシス誘導作用が増強した。アポトーシス誘導は caspase-8 の活性化、ミトコンドリアよりの cytochrome-c の放出、caspase-9 の活性化、caspase-3 の活性化を伴っていた。

(4)コロニー形成能評価では、SUL を単独処理細胞の多くは、オートファジー誘導により一時的なコロニー形成能の抑制がみられるものの、その後、回復することが確認された。一方、3-MA を併用した細胞は、より低濃度の SUL でも、著明なコロニー形成能の抑制が認められ、アポトーシスが誘導されたと考えられた。

### 2. 血管内皮細胞 (HUVECs) に対する SUL の効果およびオートファジー阻害剤併用の影響

(1) 大腸癌細胞 (WiDr) 同様、血管内皮細胞の増殖は高濃度 SUL の処理によっ

て抑制され、アポトーシス誘導によるものであった。より低濃度 SUL の処理では、増殖は抑制されたものの、アポトーシスは誘導されていなかった。

- (2) 低濃度 SUL 処理では、AVOs 形成および LC3 局在を特徴とするオートファジーの誘導を認めた。Western blot にて LC3-II の発現が確認された。
- (3) オートファジー阻害剤 (3-MA) の併用により、SUL のアポトーシス誘導作用は増強した。WiDr と同様、caspase-8, -9, -3 の活性化および cytochrome-c の放出を伴うものであった。
- (4) コロニー形成能の評価では、低濃度 SUL でも一時的なコロニー形成能の抑制がみられるものの、その後回復することから、オートファジー誘導により多くの細胞は静止状態にあったと考えられた。3-MA を併用することにより、低濃度 SUL 処理でも著明なコロニー形成能の抑制が認められ、アポトーシスが誘導されたと考えられた。
- (5) Matrigel 上での血管内皮細胞による管腔形成は、SUL の単独処理でも濃度依存的に抑制されたが、オートファジー阻害により抑制が増強することが確認された。

以上、本論文は大腸癌細胞および血管内皮細胞が SUL の作用に対する防御機構としてオートファジーを誘導することを確認し、オートファジー阻害剤との併用により SUL の抗腫瘍および抗血管新生作用が増強することを明らかにした。本研究は、現在、癌治療の分野において最も重要な課題である抗癌剤に対する治療耐性克服のための新たな戦略を提唱する重要な研究であると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。