

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 宮本 雄一郎

本研究は子宮頸癌に対する proteasome 阻害剤 Bortezomib の抗腫瘍効果を検討したものである。子宮頸部の発癌にはハイリスク型のヒトパピローマウイルスの感染が重要であり、ウイルスの持つ癌蛋白 E6,E7 の作用により、宿主細胞の癌抑制蛋白 p53,pRB は proteasome にて分解され、癌化のストレスが蓄積する。proteasome 阻害剤は、proteasome による癌抑制蛋白の分解を阻害し、発現を回復させることで、抗腫瘍効果が得られることが予想される。子宮頸癌細胞株を用いた *in vitro*、*in vivo* における Bortezomib の抗腫瘍効果につき、下記の結果を得ている。

1, ハイリスク HPV 陽性子宮頸癌細胞株である HeLa, CaSKi 細胞を用いて、*in vitro* での proteasome 阻害剤(Bortezomib)の抗腫瘍効果を確認した。MTT 法にて子宮頸癌細胞株での Bortezomib の至適濃度 (IC50) を測定し、0.1 μ M と決定した。RI を用いた pulse chase 法にて proteasome 阻害が起きていることを確認した。ウエスタンブロット・蛍光免疫染色法により細胞株での p53, hScrib, pRB 等癌抑制蛋白の発現回復を解析し、これらの発現が濃度・時間依存的に回復することが確認できた。Flow cytometry を用いて、細胞周期の変化とアポトーシス誘導能を確認したところ、細胞周期においては G2/M 停止が惹起され、ANNEXIN V 染色にて十分なアポトーシスが誘導されていることも確認できた。

2, 次に Bortezomib により蓄積した p53 が機能的であるかどうかを、RT-PCR 法を用いて、p53 下流遺伝子の変化を検討した。p53 の RNA 発現レベルは上昇しなかったが、p53 下流の遺伝子である NOXA、AIP1、GADD45 の転写レベルは著明に上昇した。proteasome 阻害により蓄積された p53 蛋白は機能的に正常なものであり、下流遺伝子の転写を促進していることが示唆された。また Bortezomib により惹起されるアポトーシスの機序を調べるため、siRNA 法により p53・hScrib・hDlg をノックダウンした。p53 をノックダウンした場合には Bortezomib を作用させてもアポトーシスは起きなかった。hScrib・hDlg のノックダウンでは、アポトーシスは十分誘導された。このため、Bortezomib による子宮頸癌細胞株へのアポトーシスは p53 の発現回復により引き起こされている可能性が強く示された。

3, 子宮頸癌の化学療法として標準治療となっている cisplatin と Bortezomib の併用効果を検討した。薬剤の投与の順番による効果の違いについて、ウエスタンブロットによる p53 蛋白回復の強さ、ANNEXIN V によるアポトーシス細胞数にて評価した。p53 の発現回復・ア

ポトース誘導能については、2 剤を同時投与したときが一番効果が強く、次に Bortezomib→cisplatin の順次投与にて強く認められた。cisplatin→Bortezomib の順では逆に p53 発現回復・アポトース誘導は減弱された。また併用効果については Chou and Talalay assay (Median Effect 法) にて検討した。Combination index (CI) は Bortezomib→cisplatin、同時投与の両治療スケジュールでは $CI < 1$ の synergistic effect が得られ、逆に cisplatin→Bortezomib では $CI > 1$ の antagonistic effect であった。

4, HeLa, CaSki 細胞株の皮下移植担癌マウスを作製し、*in vivo* での Bortezomib の抗腫瘍効果を確認した。腫瘍の増殖阻害を確認し、また腫瘍切片において p53・hScrib の発現回復とアポトース惹起を確認した。HeLa・CaSki ヒト子宮頸癌マウスモデルにおいて、Bortezomib の腫瘍増殖抑制効果は十分に確認でき、この効果は cisplatin と併用することで増強することが示唆された。マウスより摘出した腫瘍において、Bortezomib 治療群において p53, hScrib, p21 の発現が高い傾向があった。またこの群では十分なアポトースが誘導されていた。

以上、本論文にて proteasome 阻害剤 Bortezomib が、ハイリスク HPV 陽性の子宮頸癌細胞株 HeLa, CaSki 細胞において、*in vitro*, *in vivo* にて十分な抗腫瘍効果があることを示し、またそのアポトース誘導の機序に p53 の発現回復が重要であることを確認した。Bortezomib は子宮頸癌の分子標的療法として有効である可能性が示された。従来標準治療とされてきた cisplatin との併用により抗腫瘍効果が強く現れるため、Bortezomib は子宮頸癌治療の選択肢の一つとして有望であると考えられる。本研究はこれまで子宮頸癌で検討されてこなかった分子標的療法としてその分子機序まで考察し、子宮頸癌治療に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。