

論文の内容の要旨

論文題目 癌転移能および抗癌剤感受性に及ぼす分化抑制因子 (Id) 抑制
の影響

氏名 秀野泰隆

研究の背景と目的

悪性新生物は本邦における死因の 1 位を占めており、その中でも膵癌や大腸癌は男女共に増加傾向を示している。

膵癌は早期発見が困難であり、進行した状態で発見されることが多く、予後不良で死亡率の高い悪性腫瘍である。また、化学療法や放射線治療などの治療に対して感受性が低いことが知られており、新たな治療法の開発が必要である。一方、大腸癌は早期の症例では予後良好であり、また進行癌においても化学療法の進歩により予後延長が期待でき、化学療法の果たす役割は大きくなってきている。しかし、薬剤耐性の出現が知られており、その克服が必要であると考えられる。

そこで本研究では、転写調節因子であり、癌の進行において重要な役割を果たす分化抑制因子 Id (inhibitor of differentiation / inhibitor of DNA binding) 蛋白に着目した。Id 蛋白の構造は、ヘリックス・ループ・ヘリックス (HLH) 蛋白のうちクラス V サブファミリーに属する。一般に転写調節因子である HLH 蛋白は、二量体を形成し DNA と結合して作用する。しかし、Id 蛋白は DNA 結合能を欠失しており、ベーシック HLH 蛋白である E 蛋白などとヘテロ二量体を形成し、これらの蛋白が DNA への結合を阻害して、転写活性を阻害する。このように Id 蛋白は Runx2 や MyoD などといった分化誘導因子や、p16

や p21 などの CDK (cyclin-dependent kinase) インヒビターを抑制することにより、分化抑制・細胞増殖促進をさせる。

このように様々な機能を有する Id 蛋白であるが、成熟組織にはほとんど発現が認められず、胎児組織や腫瘍などの未分化細胞や増殖細胞において高発現し、卵巣癌、乳癌、前立腺癌、大腸癌、胃癌、膵癌など多くの癌種で発現が確認されている。以上のように癌組織において強発現し、正常組織で発現しないという特徴から、Id 蛋白は癌治療の適切な標的となり得ると考えた。

本研究では、RNA 干渉 (RNAi) を用いて Id1、Id3 をダブルノックダウンした膵癌および大腸癌細胞株を使用し、新たな治療標的分子となり得るかについて検討を行った。第一章では、Id1/Id3 ダブルノックダウンによる膵癌細胞の *in vitro* における性質と *in vivo* における転移形成能に及ぼす Id 蛋白の影響について、第二章では同様に Id1/Id3 ダブルノックダウンが大腸癌細胞の抗癌剤感受性に及ぼす影響について検討した。

方法・結果

膵癌細胞株 MIA-PaCa2 の Id1/Id3 ダブルノックダウンにより、マウスにおける腹膜播種転移形成能が抑制され、特に腫瘍結節の重量の有意な低下が確認された (親細胞群 (P 群) ; 3.4 ± 0.9 (g)、Mock control 群 (M 群) ; 4.0 ± 1.2 (g)、Id1/Id3 ダブルノックダウン群 (IdKD 群) ; 2.2 ± 1.1 (g))。また、腹水中の VEGF 濃度を測定したところ、IdKD 群で低下傾向を認めた (P 群 ; 977.5 ± 340.0 (pg/ml)、M 群 ; 735.5 ± 103.3 (pg/ml)、IdKD 群 ; 433.6 ± 162.3 (pg/ml))。 *in vitro* の検討では細胞増殖能を MTS 法で測定し、1 日目の値に対する比率を計算したところ、5 日目に IdKD 群で低下を認めた (P 群 ; 46.5 倍、M 群 ; 46.4 倍、IdKD 群 ; 32.2 倍)。また、細胞の遊走能を wounded monolayer repair assay で測定したところ、IdKD 群の wound 閉鎖率は低下していた (P 群 ; $76.9 \pm 0.03\%$ 、M 群 ; $80.4 \pm 0.04\%$ 、IdKD 群 ; $62.1 \pm 0.03\%$)。次に細胞表面のインテグリン発現をフローサイトメトリーで測定したところ、IdKD 群で $\alpha 3 \beta 1$ および $\alpha 6 \beta 1$ の発現低下が認められた (M 群の発現と比べ、IdKD 群では $\alpha 3$; 88.3%、 $\alpha 6$; 83.9%、 $\beta 1$; 90.8%)。これらはいずれも細胞外基質であるラミニンとの接着に重要な接着因子である。そこでラミニンへの接着能を検討したところ、IdKD 群で接着率の低下を認めた (P 群 ; $87.33 \pm 0.03\%$ 、M 群 ; $86.0 \pm 0.04\%$ 、IdKD 群 ; $76.17 \pm 0.03\%$)。

次に Id1/Id3 をダブルノックダウンした大腸癌細胞株 HT29 を用い、抗癌剤感受性への影響を検討した。今回の検討には、大腸癌の化学療法に広く使用されている 5-fluorouracil (5-FU)、イリノテカン (SN38) およびオキサリプラチンを用いた。その結果、5-FU に対する感受性は、Id1/Id3 ダブルノックダウンにより変化しなかったが、SN38 およびオキサリプラチンの感受性は、IdKD 群で有意に増強した。その機序を検討したところ、SN38 においてはアポトーシスの割合が増加傾向を示していた (SN38 $0.5\mu\text{M}$ での細胞周期解析

においてアポトーシスを示す subG1 期に分布する細胞の割合;P 群:32.66%、M 群:29.88%、IdKD 群:41.76%)。一方、オキサリプラチンに関しては、IdKD 群で他の細胞群と比べて、より低濃度で細胞周期の停止を起こしていた(オキサリプラチン 12 μ M 作用時の G1 期の割合;P 群:29.75%、M 群:26.27%、IdKD 群:48.76%)。また、アポトーシスの誘導においても IdKD 群で増加が確認された(オキサリプラチン 12 μ M 作用時のアポトーシスの割合;P 群:15.08%、M 群:18.82%、IdKD 群:27.20%)。

考察

Id1/Id3 ダブルノックダウンによる膵癌および大腸癌への影響を検討した。Id1/Id3 ダブルノックダウンによって膵癌では、増殖能および遊走能の低下、ラミニン受容体の発現低下による腹膜への接着の低下といった直接的な影響や、VEGF 産生低下による血管新生抑制といった間接的な影響により、マウスにおける腹膜播種転移結節形成能が低下したと推測された。したがって、Id 蛋白を抑制することで膵癌の腹膜播種転移を抑制することが可能であり、Id 蛋白は膵癌治療の新しい戦略を構築する上で有望な標的分子となり得ると考えられた。

一方、大腸癌の抗癌剤感受性に及ぼす Id1/Id3 ダブルノックダウンの影響を検討した結果、抗癌剤の種類によって影響が異なることが確認された。Id1/Id3 ダブルノックダウンによる 5-FU の効果に対する影響は認められなかったが、イリノテカン (SN38) およびオキサリプラチンに対する感受性は増強した。SN38 に関しては、Id1/Id3 ダブルノックダウンの細胞周期への影響は認められなかったが、アポトーシスの増加が確認された。このことから、Id1/Id3 ノックダウンによる SN38 の感受性増強はアポトーシス誘導が原因であると考えられた。一方、オキサリプラチンに関しては、Id1/Id3 ダブルノックダウンすることにより低濃度で細胞周期が停止し、またアポトーシス誘導の増加も認められた。よって、オキサリプラチンにおいては細胞周期停止とアポトーシス誘導の両者への影響によって、感受性の増強が認められたと考えられた。今回の検討から、Id1/Id3 ダブルノックダウンにより、イリノテカンやオキサリプラチンを用いた大腸癌化学療法の治療成績を向上させる可能性があると考えられた。また、切除標本における Id 蛋白の検出などを行うことにより、抗癌剤感受性を予測するマーカーとして臨床応用できる可能性が示唆された。

しかし、Id 蛋白を抑制することは現時点では困難であり、抑制効率の良い方法を検討する必要がある。例えば、本研究で使用した RNA 干渉を応用する場合には、siRNA を標的的部位に選択的かつ効率的に到達させるための適切なドラッグデリバリーシステムが必要であり、実際に臨床応用を実現するためには今後、克服すべき課題は多い。

以上のように、Id 蛋白の造腫瘍性や薬剤感受性を制御するメカニズムを解明すること

は、より合理的かつ効果的な治療プロトコルの開発につながると考えられ、また Id 蛋白の抑制は癌治療の新しい戦略の一つになりうると考えられる。