




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第526号	氏名	馬 良
審査委員会委員	主査氏名	白尾 国昭	
	副査氏名	杉尾 隼二	
	副査氏名	松尾 哲孝	
<p>論文題目: Dual targeting of heat shock proteins 90 and 70 promotes cell death and enhances the anticancer effect of chemotherapeutic agents in bladder cancer (膀胱癌に対する heat shock protein 90/70 同時阻害による細胞死誘導効果と抗癌剤増強効果に関する研究)</p> <p>論文掲載雑誌名: ONCOLOGY REPORTS</p> <p>論文要旨【緒言】本論文では、癌細胞で活性化され、その増殖に関与していると考えられている heat shock protein(HSP)に注目し、HSP90 阻害と各種抗癌剤との併用効果について検討した。さらに、HSP70/HSP90 同時阻害と各種抗癌剤との併用効果についても検討した。【研究対象及び方法】ヒト膀胱癌組織を用いた免疫組織染色、膀胱癌細胞 (T24、1376、5637、RT4、KK47) を用いた Real-time RT-PCR、Cell count assay、Flow cytometry、Western blot、Caspase3/7 assay 及び透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察を行った。なお、HSP90 阻害剤は 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin(17AAG)、HSP70 阻害剤は Pifithrin-μ (PFT-μ) を用い、抗癌剤は Cisplatin、Docetaxel 及び Gemcitabine を用いた。【結果】ヒト膀胱癌組織 (n=33) はいずれも癌細胞特異的に HSP90 染色陽性であった。膀胱癌細胞株はいずれも HSP90 mRNA 及び蛋白の発現を認め、全ての膀胱癌細胞において3種の抗癌剤単独と比較して、17AAG の併用の方がより細胞増殖抑制効果が増強した。T24 細胞において、抗癌剤単独と比較して各抗癌剤に 17AAG を併用することで、細胞死誘導が増強された。各抗癌剤と 17AAG の併用で Caspase3/7 活性と Cleaved-PARP 蛋白の発現は抗癌剤単独に比べさらに増加した。また、T24 膀胱癌細胞の western blot 解析では 17AAG により Akt 及びリン酸化 Akt 蛋白の発現が減少したが、17AAG による HSP70 蛋白発現の誘導効果を認めた。次に、HSP90/HSP70 同時阻害による細胞死誘導効果を検討した。T24 細胞において、PFT-μ 単独での細胞増殖抑制効果あるいは細胞死誘導効果は限定的であったが、PFT-μ と抗癌剤あるいは 17AAG の併用によって細胞増殖抑制効果と死誘導効果を増強し、抗癌剤と 17AAG 及び PFT-μ の3剤併用により最も強い細胞増殖抑制および細胞死誘導効果を認めた。さらに抗癌剤と 17AAG および PFT-μ の3剤併用は、最も強い Caspase3/7 の活性の亢進と Cleaved-PARP 蛋白の発現増強を認めた。TEM による観察にて、17AAG と PFT-μ の併用は T24 膀胱癌細胞において、強い細胞死誘導効果を認め、T24 膀胱癌細胞の western blot では 17AAG と PFT-μ の併用は Akt と Bad の活性を強力に抑制した。【考察】膀胱癌細胞において、HSP90 阻害は、抗癌剤による細胞増殖抑制効果および殺細胞効果を増強すると考えられ、HSP90 阻害が活性化 Akt を抑制することがその一因と考えられた。しかしその一方で、HSP90 阻害は HSP70 発現を誘導し、癌細胞は自ら細胞死を回避していると推察された。HSP90 阻害に加え、HSP70 を阻害することにより、殺細胞効果はさらに促進されることから、HSP90 阻害療法の抵抗性克服には HSP70 の抑制が1つの鍵となることが示唆された。</p> <p>本研究は、膀胱癌細胞において、HSP90阻害またはHSP90とHSP70の同時阻害が抗癌剤による細胞増殖抑制効果および殺細胞効果を増強することを示したものである。現在、抗癌剤だけでは十分な効果が期待できない進行膀胱癌の領域において非常に意義のある研究と思われる。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 (課)・論	第 5 2 6 号	氏 名	馬 良
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	白尾 国昭 (印)	
	副査氏名	形尾 隼二 (印)	
	副査氏名	松尾 哲孝 (印)	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. HSP90 の正常細胞や他のがん細胞での発現はどうですか？ 2. がん細胞での HSP90 と HSP70 の発現量はどうだったのでしょうか？ 3. HSP70 の作用について説明してください。 4. 細胞に加えた抗がん剤の濃度は、どのようにして決めたのか説明してください？ 5. 薬剤添加後、細胞数を測定する際に、死細胞は認められたのでしょうか？ 6. 17AAG と抗がん剤の作用が相乗効果を示すとした根拠を示してください。 7. 17AAG の作用が濃度依存的であるとした根拠は何でしょうか？ 8. 17AAG と抗がん剤の両者が同時に投与された場合も濃度依存的であると考えてよいのでしょうか？ 9. Figure 1 の western blot で、17AAG (HSP90 阻害薬) の添加により HSP90 の蛋白発現が抑制されていない理由を説明してください。 10. cell viability assay で細胞株ごとに 17AAG 濃度が異なっていますが、何を根拠に設定しているのかを説明してください。 11. 5つの細胞株から、T24 細胞を選んだ理由について説明してください。 12. 主に実験で使用した T24 細胞株の遺伝子学的性質について説明してください。 13. 17AAG により HSP70 の mRNA レベルが上昇しているが、HSP90 の mRNA レベルはどうなっていますか？ 14. 17AAG+PFT-u の dual inhibituon の解析 (Figure 7) では、Akt pathway 下流の Bad およびリン酸化 Bad を検討しているものの、他の因子は提示されていません。Akt pathway 上流の STAT-MAPK も抑制されていますか？また、どのように考えますか？ 15. 機序が異なる 3つの抗がん剤に対して HSP90 および HSP70 阻害剤の有効性について、どのようなメカニズムが考えられますか？ <p style="margin-top: 20px;">これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 馬 良

論 文 題 目

Dual targeting of heat shock proteins 90 and 70 promotes cell death and enhances the anticancer effect of chemotherapeutic agents in bladder cancer (膀胱癌に対する heat shock protein 90/70 同時阻害による細胞死誘導効果と抗癌剤増強効果に関する研究)

要 旨

【緒言】 進行性膀胱癌に対する標準的な化学療法である GC (Gemcitabine + Cisplatin) 療法や MVAC (methotrexate + vinblastine + adriamycin + cisplatin) 療法、あるいは近年その有効性が論じられている taxan 系抗癌剤である docetaxel や paclitaxel を用いた抗癌剤療法は、長期の完全奏効が得られることは稀であり、決して満足のいく治療法とは言えない。最近、癌細胞で活性化され、その増殖に関与していると考えられている heat shock protein (HSP) が、新たな標的分子として注目されており、HSP90 と各種抗癌剤との併用効果について検討することを目的とした。さらに、HSP90 阻害による HSP70 誘導効果を検討し、HSP70/HSP90 同時阻害と各種抗癌剤との併用効果について検討した。

【研究対象及び方法】 ヒト膀胱癌組織の免疫組織染色、膀胱癌細胞 (T24、1376、5637、RT4、KK47) を用いた Real-time RT-PCR、Cell count assay、Flow cytometry、Western blot、Caspase 3/7 assay 及び透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察を行った。HSP90 阻害剤 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17AAG) と HSP70 阻害剤 Pifithrin- μ (PFT- μ) を用い、抗癌剤は Cisplatin (CDDP)、Docetaxel (DTX) 及び Gemcitabine (GEM) を用いて検討した。

【結果】 ヒト膀胱癌組織 (n=33) はいずれも癌細胞特異的に HSP90 染色陽性であった。5 つの膀胱癌細胞株はいずれも HSP90 mRNA 及び蛋白の発現を認め、全ての膀胱癌細胞において CDDP、GEM、DTX の抗癌剤単独と比較して、各抗癌剤と 17AAG の併用により細胞増殖抑制効果が増強した。T24 細胞において、抗癌剤単独と比較して各抗癌剤に 17AAG を併用することで、細胞死誘導が増強した。各抗癌剤によって Caspase 3/7 の活性と Cleaved-PARP 蛋白の発現は増加したが、17AAG 併用によって Caspase 3/7 活性と Cleaved-PARP 蛋白の発現はさらに増加した。また、T24 膀胱癌細胞の western blot 解析では 17AAG により Akt 及びリン酸化 Akt 蛋白の発現が減少したが、17AAG によって HSP70 蛋白発現の誘導効果を認めた。HSP90 阻害によって 5 つの膀胱癌細胞株はいずれも HSP70 mRNA 及び蛋白の発現が増加した。以上より、膀胱癌細胞に対し HSP90 阻害剤である 17AAG は抗癌剤の殺細胞効果を増強すると考えられたが、同時に HSP70 を誘導することが明らかとなった。次に、ヒト膀胱癌組織における HSP70 の発現と、HSP90/HSP70 同時阻害による膀胱癌細胞の細胞死誘導効果を検討した。ヒト膀胱癌組織 (n=28) はいずれも癌細胞特異的に HSP70 染色陽性であった。T24 細胞において、PFT- μ 単独での細胞増殖抑制効果あるいは細胞死誘導効果は限定的であったが、PFT- μ と抗癌剤あるいは 17AAG の併用によって細胞増殖抑制効果と死誘導効果を増強し、抗癌剤と 17AAG および PFT- μ の 3 剤併用により最も強い細胞増殖抑制および細胞死誘導効果を認めた。さらに抗癌剤と 17AAG および PFT- μ の 3 剤併用は、最も強い Caspase3/7 の活性の亢進と Cleaved-PARP 蛋白の発現増強を認めた。TEM による観察にて、17AAG と PFT- μ の併用は T24 膀胱癌細胞において、強い細胞死誘導効果を認め、T24 膀胱癌細胞の western blot では 17AAG と PFT- μ の併用は Akt と Bad の活性化を強力に抑制した。

【考察】 膀胱癌細胞において、HSP90 阻害は、抗癌剤による細胞増殖抑制効果および殺細胞効果を増強すると考えられ、HSP90 阻害が活性化 Akt を抑制することがその一因と考えられた。しかしその一方で、HSP90 阻害は HSP70 発現を誘導し、癌細胞は自ら細胞死を回避していると推察された。HSP90 阻害に加え、HSP70 を阻害することにより、殺細胞効果はさらに促進されることから、HSP90 阻害療法の抵抗性克服には HSP70 の抑制が 1 つの鍵となることが示唆された。HSP90 阻害あるいは HSP90/HSP70 の同時阻害と、従来の抗癌剤との併用による新たな進行性膀胱癌治療の可能性が示唆され、今後、in vivo 及び臨床研究による検証が必要と考えられた。