

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 398 号	氏 名	天 田 耕 平
審 査 委 員 会 委 員		主査氏名	花 田 礼 子 
		副査氏名	平 野 隆 
		副査氏名	松 尾 哲 孝 
<p>論文題目</p> <p>Involvement of clusterin expression in the refractory response of pancreatic cancer cells to a MEK inhibitor (膵癌細胞の MEK 阻害薬抵抗性反応における clusterin 発現の関与)</p> <p>論文掲載雑誌名 Cancer Science</p> <p>論文要旨</p> <p>本研究は、膵臓管腺癌 (PDAC) 細胞が MEK 阻害剤 PD0325901 に対する抵抗性を獲得するメカニズムを解明するため、clusterin (CLU) の発現動態に着目し解析した研究である。</p> <p>MAP キナーゼ経路の恒常的な活性化が癌病態の進行に重要な役割を果たしているが、MEK 阻害薬による治療効果はこれまでの臨床試験で限定的であった。本研究では、ヒト膵癌細胞株 MIA/luc を用いた同所移植モデルにおいて、MEK 阻害薬 PD0325901 (PD) を投与した腫瘍が一旦縮小するも再増大することが確認された。マイクロ RNA アレイによる網羅的発現解析により PD 抵抗性獲得に関わる 12 の遺伝子が特定され、その中でも CLU に着目して解析を行った。PD 処理により CLU の発現が迅速に誘導され、膵癌細胞がアポトーシスを回避して増殖維持することが示された。また、CLU ノックダウンやノックアウトにより PD 耐性が顕著に低下し、相乗的な増殖抑制効果が確認された。</p> <p>CLU を恒常的に発現している膵癌細胞株 PANC-1 において CLU ノックダウンを行ったところ、増殖能の顕著な抑制とアポトーシス誘導が確認された。さらに、他の膵癌細胞株 27 株中 22 株で、CLU の恒常的発現または PD 処理による誘導が確認され、PD と CLU ノックダウンの併用により、21 株中 13 株で増殖抑制の上乗せ効果が得られた。膵管癌症例 91 例の組織検体に対する免疫組織化学解析では、約半数で CLU 発現が陽性であり、分化度との相関が見られた。これにより、CLU の発現が MEK 阻害薬の効果予測に有用である可能性や CLU が治療標的となり得る可能性が示唆された。</p> <p>以上の結果から、CLU は抗アポトーシス作用を介して膵癌細胞の治療抵抗性に寄与しており、特に MEK 阻害薬との併用で治療効果が期待されることが示された。</p> <p>本研究では、<i>in vitro</i>、<i>in vivo</i> ならびにヒト (患者) の膵臓管腺癌サンプルを用いて、MEK 阻害剤に対する治療抵抗性の分子メカニズムを探究し、clusterin を介した作用を明らかにした。本研究結果は膵管腺癌の新たな治療戦略に結びつく重要な知見である。</p> <p>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・ 	第398号	氏名	天田耕平
審査委員会委員	主査氏名	花田礼子	
	副査氏名	平野隆	
	副査氏名	松尾哲孝	
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、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. 現在、膵臓管腺癌 (PDAC) に対して最も有効といわれている薬剤は何か? 2. PDACに対するMEK阻害剤の有効性は低いとのことだが、その理由やメカニズムは何か? 3. MEK阻害剤以外の薬剤の耐性機構とclusterin (CLU) との関連は報告されているのか? 4. 本研究ではMEK阻害剤として、PD0325901 (PD)を用いているが、本薬剤を選択した理由は何か? 5. CLU-K01とCLU-K02の違いはあるのか?同じ領域を欠損させているのか? 6. 免疫組織染色において、CLU発現の半定量化の評価方法や客観指標は何か? 7. ヒト検体ではAdjuvant Chemotherapyの有無に加え、各群のCLU発現の有無はどうか? 8. <i>in vivo</i>実験において、PD耐性獲得に伴うCLU mRNA発現動態やBRK発現の経時的变化はどうか? 9. 様々な膵癌細胞株でCLU mRNAの恒常的発現が認められるが、このCLU mRNA発現のトリガーは何か? 10. CLU mRNA発現上昇とCLU mRNA発現上昇しない細胞株の違いが原因は何か? 11. ヒトの検体解析において中高分化型の方がCLU mRNA発現が高いのはなぜか?また、CLU遺伝子変異を有する症例はあるのか?CLU発現量と病態予後との関連はあるのか? 12. CLUは血中に存在するのか?病態進展のバイオマーカーとなり得ると考えられるか? 13. 様々な腫瘍に対するMEK阻害剤の有効性は、どれくらい明らかになっているのか? 14. 本論文のMEK阻害剤抵抗性に関する研究は、どのような経緯で導かれたのか? 15. 移植実験の難易度はどうか?容易であれば、腫瘍形成のタイムコース実験は、intensityではなく、腫瘍の大きさ表示がより顕著な効果が示されるのではないか。 16. 増殖能抑制の評価方法は? 17. 増殖抑制効果は、細胞周期のどの地点に作用していると考えているか。 18. 膵臓がんに対しての分子標的薬は一般的に行われているのか? 19. 膵臓癌の組織型として膵臓管腺癌はどのくらいの割合で存在するのか? 20. 今回、使用したcell lineはMIAを主として用いていますが、その選定の理由は? 21. TP53抗体はLuciferaseとの関連はあるのか? 22. Proliferation assayでMTT assayとMTS assayを行っているが、その違いと目的はどうか? 23. <i>In vivo</i>実験で、腫瘍細胞がマウスでPDに対する抑制が効かないと述べているが、肉眼的には腫瘍増殖抑制効果があるように見える。25日目以降での腫瘍増殖抑制はどうか? 24. Fig 2のGでは、MIA/lucにおけるCLUタンパク質の誘導発現では、PD投与直後にCLUが発現しているが、BRKのリン酸化を認めず、BRKの発現自体も低下しているように見えるが、一見細胞増殖抑制にCLUが関与しているように見えるが、どのように考えますか? 25. Table1では、PD aloneで細胞増殖抑制を81%認めており、4例に無効例を示している。その4例のうち、1例にPDとCLU-KDの複合投与で細胞増殖抑制を認めている。この複合治療で効果を認めたPK59には、他の細胞株と異なった特性があるのか? <p>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 天 田 耕 平

論 文 題 目

Involvement of clusterin expression in the refractory response of pancreatic cancer cells to a MEK inhibitor

(膵癌細胞の MEK 阻害薬抵抗性反応における clusterin 発現の関与)

要 旨

【ア. 緒言 (目的)】 難治癌である膵癌の発症過程において、KRAS 遺伝子の変異に伴う MAP キナーゼ経路の恒常的活性化は重要な役割を果たしている。しかしこの経路を標的とした治療薬は、膵癌患者を対象とした臨床試験で有効性を示していない。そこで膵癌における MAP キナーゼ経路標的治療薬抵抗性に関わる分子メカニズムを解明するため本研究を企画した。

【イ. 研究対象及び方法、ウ. 結果】 ヒト膵癌細胞株 MIA/luc を同所移植した免疫不全マウスを 2 群 (治療群と対照群) に分け、治療群に対して MAP キナーゼ経路阻害薬である MEK 阻害薬 (PD0325901 : 以下 PD と略す) による治療を開始した。治療群の腫瘍は一旦縮小したもののすぐに再増大した。そこで網羅的発現解析を施行して治療群と対照群の腫瘍の発現プロファイルを比較し、治療群の腫瘍で発現変動する 12 の遺伝子を抽出した。その中から本研究では Clusterin (CLU) に着目した。

MIA/luc における CLU mRNA および CLU タンパクの発現誘導は、PD 添加 12 時間後より認められた。また、MIA/luc の PD 抵抗性は CLU のノックダウンあるいはノックアウトにより有意に低下した。

次に、CLU を恒常的に発現しているヒト膵癌細胞株 PANC-1 に対して CLU をノックダウンしたところ、増殖能が顕著に抑制された。このとき、Sub-G1 期の細胞増加と DNA 断片化、カスパーゼの活性化が観察され、アポトーシスが誘導されていることがわかった。

他の膵癌細胞株での CLU 発現動態を確認したところ、27 株中 22 株 (81.5%) で、CLU の恒常的発現もしくは PD 添加による発現誘導が確認された。また、PD 添加に CLU ノックダウンを併用することにより、21 株中 13 株 (61.9%) で細胞増殖抑制の上乗せ効果が確認された。

最後に、大分大学医学部附属病院の膵管癌切除症例 91 例の組織検体を用いて CLU の発現動態を免疫組織化学で解析した。CLU は 91 例中 46 例 (50.6%) で陽性を示した。臨床病理学的因子の中で分化度との相関が見られ、低分化型に比べて中・高分化型で陽性例が有意に多かった。

【エ. 考察】MIA/luc は PD 添加に伴う CLU の発現誘導により PD 抵抗性を獲得した。PANC-1 は恒常的に発現する CLU によって生存能を維持していた。以上の結果から、CLU は抗アポトーシス作用を介して細胞保護的な役割を果たしていることが示唆された。免疫組織化学にて膵管癌症例の約半数で CLU 発現陽性が確認されたが、陰性症例の中には治療薬投与によって CLU 発現が誘導される症例も含まれることが予想される。これら CLU の恒常的あるいは誘導性発現を示す症例に対しては、CLU を標的とする治療の有効性が期待される。したがって CLU 標的治療の有効性を予測するためのがんオルガノイドを用いた体外検査法の開発が望まれる。

【オ. 結論】膵癌細胞において CLU は抗アポトーシス作用を介して MEK 阻害薬抵抗性に関与することから、膵癌の有望な治療標的となりうる。CLU の発現動態を調べることで MEK 阻害薬や CLU 標的治療の効果予測が可能となる。