

京都大学	博士 (医 学)	氏 名	永 井 宏 樹
論文題目	Nitric oxide enhances pemetrexed cytotoxicity via NO-cGMP signaling in lung adenocarcinoma cells in vitro and in vivo. (NO は肺腺癌細胞において in vitro および in vivo の環境下で NO-cGMP シグナル経路を介して pemetrexed の抗癌剤感受性を増強させる)		
(論文内容の要旨) ペメトレキセド(PEM)は肺腺癌の全身化学療法において使用される葉酸拮抗薬であり、上記癌種においては最も治療効果が期待できる抗がん薬の1つである。一酸化窒素(NO)は cGMP を介するシグナル経路を介して生体内で様々な反応を来す事が知られている。NO による抗癌剤の感受性改善効果についてはタキサン系やアントラサイクリン系の抗がん薬において報告されているが、PEM に対する感受性改善効果についての報告はなく、本研究では in vitro および in vivo の条件下において NO による PEM の感受性改善効果について検証した。in vitro ではヒトの肺腺癌細胞である A549 細胞において PEM によるアポトーシスへの NO の影響を調べた。ELISA を用いて評価した結果、PEM 単独に比較し、PEM に NO を併用した場合、有意にアポトーシスが増強される事が確認された。引き続き、Western Blot および RT-PCR を用いて、PEM の耐性に関わる蛋白質である RFC1、FPGS、GGH、TS、MRP5 について NO が与える影響について調べた。PEM の耐性機序として、RFC1、FPGS の発現減少、TS、GGH、MRP5 の発現亢進が報告されているが、NO の投与により、RFC1 と FPGS の mRNA は増加し、Western blot においても発現量の増加を認めた。その他の3つの蛋白質の発現においては NOC-18 による影響は全く見られなかった。さらに、上記の反応に cGMP を介しているかを確認するため、グアニル酸シクラーゼ阻害剤である ODQ を NO に加えて同様の実験を行った場合、RFC1 および FPGS の発現増加が抑制される事が確認された。これらの結果より、NO は cGMP を介して RFC1 および FPGS の発現を増加させ、PEM の細胞内濃度を上昇させる事によって、PEM によるアポトーシスを増強させている可能性が考えられた。次に、in vivo ではマウスの肺腺癌細胞である LLC 細胞を C57/BL マウスの肝季肋部に皮内注射する事により皮下に腫瘍を形成させ、NO 供与体としてのニトログリセリン(GTN)、グアニル酸シクラーゼ阻害剤の ODQ を PEM と共に投与する事で、in vivo における NO の PEM による抗腫瘍効果への影響を検証した。腫瘍を形成した C57/BL6 マウスを 5 群(各群 7 匹)に分け、それぞれの群において①生理食塩水、②GTN 単独、③PEM 単独、④ PEM と GTN 併用、⑤PEM 及び GTN、ODQ の 3 者併用、にて治療を行い、経時的に腫瘍径を計測し、腫瘍成長曲線を作成した。その結果、GTN をペメトレキセドと共に併用する事で有意に腫瘍の増大が抑制され、また更に ODQ を上乗せする事により、その抑制効果が拮抗される事が確認された。これにより in vitro と同様に、in vivo においても NO が NO-cGMP シグナル経路を用いて PEM の抗腫瘍効果を増強させた事が確認された。 本研究は in vitro および in vivo の両条件下において NO による PEM の感受性改善効果を初めて示した。今後は臨床研究を通して上記効果をさらに検証すべきである。			

(論文審査の結果の要旨)

一酸化窒素(NO)による抗癌剤の感受性増強効果についてはこれまでも報告されてきているが、ペメトレキセド(PEM)に対する感受性増強効果についての報告はなく、本研究では in vitro および in vivo において NO による PEM の感受性増強効果について検証した。in vitro において PEM によるアポトーシスへの NO の影響について評価した結果、低酸素環境において、PEM 単独に比較し PEM に NO を併用した場合、有意にアポトーシスが増強される事が確認された。RT-PCR および Western Blot を用いて PEM の耐性に関わる蛋白質である RFC1、FPGS、GGH、TS、MRP5 の発現について NO の影響を調べた結果、PEM の influx transporter である RFC1 と PEM を細胞内で安定化させる作用を持つ FPGS において有意に発現量の増加を認め、さらにこの作用は cGMP を介する可能性が示唆された。in vivo においては担癌マウスを用い腫瘍成長曲線を作成した結果、PEM 単独に比較し PEM に NO を併用した場合、cGMP を介して腫瘍成長が有意に抑制される事が示された。これにより in vitro、in vivo ともに NO が cGMP を介して PEM の抗腫瘍効果を増強させた事が確認された。以上の研究は NO の抗癌剤増強効果の解明に貢献し、更なる臨床研究への橋渡し研究に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 24 年 11 月 5 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降