

京都大学	博士（医学）	氏名	諏訪達也
論文題目	SPINK1 as a plasma marker for tumor hypoxia and a therapeutic target for radiosensitization （血漿蛋白質 SPINK1 を活用した悪性固形腫瘍内低酸素分画のモニタリングと放射線治療効果の増感に関する研究）		
（論文内容の要旨） 腫瘍内低酸素領域は放射線抵抗性の一因で、その量はがん患者の予後不良と関連する。そのため、腫瘍内低酸素分画を簡便かつ正確に測定する方法や、腫瘍内低酸素を標的とする治療法を確立することにより、個別化放射線治療の実現に繋がると期待されている。本研究では、低酸素応答性に発現が誘導される分泌蛋白質をスクリーニングし、腫瘍内低酸素分画を簡便にモニターする血液マーカーとして、また低酸素がん細胞に起因する放射線抵抗性を克服する治療標的として有用な、serine protease inhibitor Kazal-type I (SPINK1)を同定した。 ヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa 等を様々な酸素条件下（20～0.1%未満）で培養することにより、SPINK1 の発現が酸素濃度 0.1%未満の重篤な条件下でのみ、hypoxia-inducible factors (HIFs)依存的に、転写開始レベルで誘導されることが見出された。低酸素環境下で新規合成された SPINK1 蛋白質は細胞外に分泌され、培地中に蓄積した SPINK1 蛋白質の量は細胞内の SPINK1 mRNA 量と強く相関した。ヒト由来がん細胞株の皮下異種移植腫瘍内で、SPINK1 は低酸素領域で強く、またその周囲でも僅かに検出され、SPINK1 と内在性低酸素マーカーCA9 の腫瘍内発現量は強い相関を示した。移植腫瘍への酸素供給量を人為的に減少させるとその程度に相関して腫瘍内と血漿中の SPINK1 量が増加した。腎細胞癌の臨床検体では、SPINK1 は腫瘍血管から離れた領域で強く検出されたのに加え、血管近傍でも検出され、低酸素領域から血管内へと拡散する可能性が示唆された。以上の結果から、低酸素領域から血中に分泌された SPINK1 を指標に腫瘍内の低酸素分画を予測できる可能性が示された。 In vitro のコロニー形成試験に於いて、SPINK1 の過剰発現により酸素存在下（20%や3% O ₂ ）でも放射線抵抗性が誘導されることが確認された。この放射線抵抗性は培地中に組換え SPINK1 蛋白質を添加することでも誘導されたが、抗 SPINK1 中和抗体の添加により無効化された。また、N 末端のシグナルペプチドを欠失させた非分泌性 SPINK1 変異体の過剰発現では放射線抵抗性は誘導されなかった。以上の結果から、SPINK1 蛋白質がパラクリン的にがん細胞の放射線抵抗性を誘導することが示された。さらに、皮下移植腫瘍を対象にした in vivo 腫瘍増殖試験でも SPINK1 の過剰発現で放射線抵抗性が誘導された。 SPINK1 による放射線抵抗性は、epidermal growth factor receptor (EGFR)の薬理的な阻害により消失した。放射線照射後に 53BP1 やγ H2AX の foci としてモニターされる DNA 二重鎖切断の数も、SPINK1 の過剰発現により有意に減少したが、この効果も EGFR 阻害剤存在下では消失した。また SPINK1 が nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)による抗酸化経路を EGFR 依存的に活性化し、放射線照射後の活性酸素種の蓄積を抑制することが確認された。さらに、SPINK1 による放射線抵抗性も Nrf2 阻害剤存在下で消失した結果と合わせ、以上の結果から低酸素がん細胞が分泌した SPINK1 が隣接細胞の EGFR-Nrf2 依存的な放射線抵抗性をパラクリン的に誘導することが示された。			

本研究により、SPINK1 が腫瘍内低酸素分画を予測する簡便な血液マーカー、及び低酸素がん細胞に起因する放射線抵抗性を克服する治療標的となる可能性が示された。

（論文審査の結果の要旨）

腫瘍内低酸素領域は放射線抵抗性の一因で、その量はがん患者の予後不良と関連する。そのため、腫瘍内低酸素分画を簡便・正確・非侵襲的に測定する方法や、同領域による治療抵抗性を抑制する手法を確立することにより、個別化放射線治療の実現に繋がると期待されている。本論文では、ゲノムワイドスクリーニングにより、腫瘍内低酸素分画を簡便にモニターする血漿マーカーとして、また、低酸素がん細胞に起因する放射線抵抗性を克服する治療標的として有用な、serine protease inhibitor Kazal-type I (SPINK1)を同定した。細胞培養実験により、SPINK1 の発現が重篤な低酸素環境下で hypoxia-inducible factors (HIFs)依存的に転写開始レベルで誘導されることを確認した。新生された SPINK1 蛋白質は低酸素がん細胞から分泌され、隣接細胞の抗酸化能を EGFR-Nrf2 依存的に活性化することで、パラクリン的に放射線抵抗性を誘導した。この放射線抵抗性は抗 SPINK1 抗体存在下で抑制された。担がんマウスモデルの血漿中 SPINK1 蛋白質量は、腫瘍内低酸素分画と強く相関した。以上の結果から、腫瘍内低酸素分画のモニタリングと放射線治療効果の増感を可能にする血漿蛋白質として SPINK1 の有用性が見出された。

以上の研究は、悪性固形腫瘍内の低酸素分画を診断する新たな手法の確立、及び同分画に起因する放射線抵抗性誘導機構の解明に貢献し、がんに対する個別化放射線治療の実現に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（諏訪 達也）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、令和4年1月7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