

京都大学	博士（医学）	氏 名	松原 央
論文題目	Involvement of ERK activation in human osteosarcoma cell resistance to the HDAC inhibitor FK228 (HDAC 阻害剤 FK228 耐性ヒト骨肉腫株における ERK 活性化の関与)		
(論文内容の要旨)			
【目的】骨肉腫は若年者の長管骨の骨幹端に好発する骨の悪性腫瘍である。診断時に遠隔転移のない例で5年無病生存率は70%、転移例では30%とさらなる治療法の開発が望まれる腫瘍である。ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬はヒストンをアセチル化し、クロマチンのリモデリングを誘導する。FK228 (depsipeptide) は環状構造のペプチドで、Class I, Class II の HDAC を強力に阻害する HDAC 阻害剤であり、ヒト骨肉腫細胞株に対して Fas-FasL 経路を介して細胞死を誘導することが報告されている。しかし、FK228 が P 糖蛋白の発現を誘導し、自らがその基質となることも報告されている。現在、難治性腫瘍に対し第1相、第2相の臨床試験が行なわれ、期待される新薬のひとつとされている。今回 FK228 耐性ヒト骨肉腫株を樹立し、その耐性克服法を見出し、耐性メカニズムについて検討した。 【方法】暴露法と限界希釈法により2種類の FK228 耐性ヒト骨肉腫細胞株を樹立し、これを用いた。他の HDAC 阻害剤や抗癌剤への感受性、薬剤排出能、ならびにシグナル伝達阻害剤との併用時の細胞死について検討し、耐性メカニズムについて解析した。 【結果】樹立した FK228 耐性株と親株の 50%細胞阻害濃度 (IC50) は、HOS (親株 7.4nM、耐性株 1031nM)、U2OS (親株 10.4nM、耐性株 3960nM) と 139 倍、381 倍の耐性を示した。しかし、他の HDAC 阻害剤には耐性を示さず、P 糖蛋白の基質となる抗癌剤 (etoposide や doxorubicin) には耐性を示した。耐性株は親株では認めない P 糖蛋白を発現しており、P 糖蛋白の阻害剤を併用したところ、耐性株は親株のレベルまで感受性が低下した。しかし、耐性株は低濃度の FK228 でもヒストン H3 のアセチル化が誘導されており、P 糖蛋白以外にも耐性化のメカニズムがあることが示唆されたため、FK228 投与後のシグナル経路を検討したところアセチル化する前に MAPK 経路が活性化していた。MEK 阻害剤 (U0126) を併用すると、耐性株の IC50 は、HOS 耐性株 37.3nM、U2OS 耐性株 122nM とそれぞれ 8 倍、34 倍まで低下した。FACS 解析では時間依存性に SubG1 分画の増加を認め、Western blotting の結果では caspase-8 の活性化がみられアポトーシスが誘導されていた。耐性株のコロニー形成アッセイでは、MEK 阻害剤を併用することで長期間の細胞増殖を抑制することを確認した。親株は FK228 により FasL の発現が誘導されたが、耐性株では誘導されず、MEK 阻害剤の併用時には FasL が誘導された。さらに FLIP は親株では FK228 で分解されたが、耐性株では分解されず、併用時に分解されていた。また、併用時の薬剤排出能への影響をローダミン 123 排出能試験で検討したが、排出能は抑制されていなかった。 【考察】FK228 は、P 糖蛋白の発現を誘導し、薬剤耐性を獲得するが、これ以外にも MAPK 経路を活性化し薬剤耐性を獲得していた。MEK 阻害剤を併用した検討により、耐性株では FasL の発現と FLIP の分解が抑制されており、これが耐性化のメカニズムのひとつであると考えられた。			

（論文審査の結果の要旨） ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の FK228 に耐性のヒト骨肉腫株を2種類樹立した他の HDAC 阻害剤や抗癌剤への感受性、薬剤排出能、ならびにシグナル伝達阻害剤を併用した時の細胞死について検討し、耐性メカニズムについて解析した。 耐性株は親株と異なり P 糖蛋白を発現し、親株と比べそれぞれ 140 倍、380 倍の耐性を示した。他の HDAC 阻害剤には耐性を示さず、P 糖蛋白の基質となる抗癌剤には耐性を示した。しかし、耐性株は低濃度の FK228 でアセチル化が誘導されており、P 糖蛋白による薬剤排出以外の FK228 耐性メカニズムがあると考えられた。耐性株はアセチル化が誘導されるより前に ERK がリン酸化しており、MEK 阻害剤を併用することにより耐性が 8 倍から 34 倍まで低下した。また、長期培養系においても耐性株の増殖を抑制することができた。MEK 阻害剤の併用は P 糖蛋白の発現や機能には影響を与えず、親株と同様に mRNA レベル、蛋白レベルで FasL の発現が誘導され、FLIP の発現が低下し、その結果アポトーシスが誘導されていた。 以上の研究は、骨肉腫に対する FK228 耐性メカニズムは、既知の P 糖蛋白による耐性以外に MAPK 経路を介した増殖因子刺激による耐性であることを見出し、FK228 耐性腫瘍に対する治療法の解明に貢献し、今後の癌化学療法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 21 年 8 月 6 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための諮問を受け、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			