



Antitumor effects of a sirtuin inhibitor, tenovin-6, against gastric cancer cells via death receptor 5 up-regulation

著者	平井 祥子
発行年	2014
その他のタイトル	ヒト胃癌細胞に対するsirtuin阻害薬tenovin-6のdeath receptor 5の発現誘導を介した抗腫瘍効果に関する研究
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2014
報告番号	12102甲第7169号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00125670

氏名（本籍） 平井 祥子（東京都）
 学位の種類 博士（医学）
 学位記番号 博甲第 7169 号
 学位授与年月 平成26年11月30日
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
 審査研究科 人間総合科学研究科
 学位論文題目 Antitumor effects of a sirtuin inhibitor, tenovin-6, against gastric cancer cells via death receptor 5 up-regulation
 (ヒト胃癌細胞に対する sirtuin 阻害薬 tenovin-6 の death receptor 5 の発現誘導を介した抗腫瘍効果に関する研究)

主査	筑波大学教授	博士（医学）	武川 寛樹
副査	筑波大学講師	博士（医学）	横山 泰久
副査	筑波大学講師	博士（医学）	久倉 勝治
副査	筑波大学助教	博士（医学）	加藤 広介

論文の内容の要旨

(目的)

胃癌ではがん抑制遺伝子 *TP53* の変異が約 30%と報告されているが、残りの 70%の野生型 *TP53* においても翻訳後修飾により機能が抑制され、p53 依存性の細胞死から逃れ増殖することが知られている。野生型 *TP53* において p53 の up-regulation を介した細胞死誘導による腫瘍の制御が期待される。p53 の機能を抑制する分子の一つに、histone deacetylase (HDAC) があり、中でも classIIIに属する sirtuin 1 (SIRT1) は p53 の脱アセチル化を介して癌の増殖促進を促すと考えられている。p53 を活性化する小分子をスクリーニングした結果、SIRT1 と SIRT2 を阻害する tenovin-6 が同定された。今回、胃癌細胞に対する tenovin-6 の効果と作用機序を検討し、さらに既存の標準化学療法薬との併用での抗腫瘍効果を *in vitro* において研究した。

(対象と方法)

ヒト胃癌細胞株：*TP53* 野生株 (MKN-45, NUGC-4, STKM-2, SNU-1)、*TP53* 変異株 (NUGC-3, STKM-1)、*TP53* 欠失株 (KatoIII)、コントロールとして用いた細胞株：SIRT1, SIRT2 過剰発現細胞株 (HEK293)、*TP53* 野生株 (MCF-7)、ヒト線維芽細胞株 (MRC-5)

(1)ヒト胃癌細胞株7種類における SIRT1、p53 等の蛋白発現レベルを Western blotting 法にて解析し、これらの細胞株における *SIRT1* 及び *SIRT2* 遺伝子発現について Quantitative RT-PCR 法にて解析した。

(2)*TP53* 野生株4種類、*TP53* 変異株1種類 (NUGC-3)、*TP53* 欠失株 (KatoIII) を tenovin-6 と 72 時間共培養し、WST-8 assay にて評価した。(3)胃癌細胞株4種と 10 μ M tenovin-6 との共培養 0~24 時間後に

において、SIRT1、p53、Ac-p53 および apoptosis 関連蛋白発現レベルを Western blotting 法にて解析した。(4)胃癌細胞株 4 種を 10 μ M tenovin-6 で 72 時間共培養し、apoptosis の誘導について Flow cytometry にて解析した。(5)DR5 siRNA を用いて *TP53* 欠失株 KatoIII の DR5 発現を抑制し、tenovin-6 5 μ M 投与後に WST-8 assay および Flow cytometry にて解析した。(6)10 μ M tenovin-6 の共培養 0~24 時間後における ER stress 関連蛋白発現レベルを Western blotting 法にて解析した。(7)胃癌細胞株 4 種を tenovin-6 (2 or 5 μ M) と docetaxel、SN-38、cisplatin、5-FU と共培養し、薬剤の相互作用について CI-isobologram 法にて評価した。

(結果)

NUGC-4、STKM-1 を除く胃癌細胞株において SIRT1 蛋白の過剰発現を認め、SIRT2 蛋白は MKN-45 細胞を除く全ての胃癌細胞株において低発現であった。MKN-45 細胞では *SIRT1* および *SIRT2* 遺伝子ともに発現亢進を伴った。これらの胃癌細胞株に対し、tenovin-6 は *TP53* の変異の有無に拘らず顕著な抗腫瘍効果を示し apoptosis 誘導も確認された。またヒト線維芽細胞に対する増殖抑制効果は胃癌細胞株と比較して有意に低かった。tenovin-6 投与後、DR5、cleaved PARP の発現誘導が全ての細胞株に共通して認められた。*TP53* 欠失株 KatoIII の DR5 発現を抑制したうえで tenovin-6 を投与したところ、抗腫瘍効果は有意に減弱した。sirtuin 阻害薬による apoptosis 誘導機序の一つとして ER stress 経路の活性化が報告されているが、tenovin-6 投与後の ER stress 関連蛋白発現に有意な変化はなかった。化学療法薬との併用効果については、docetaxel、SN-38 との併用において軽度から中等度の相乗効果が認められた。

(考察)

sirtuin 阻害薬の抗腫瘍効果に関する報告の多くは *TP53* 野生型の細胞株に対するものであり、p53 依存的な経路の活性化を介するとされていたが、本研究は胃癌細胞株に対し、sirtuin 阻害薬 tenovin-6 が *TP53* の変異の有無に拘らず一様に高い抗腫瘍効果を有することを示した。さらに tenovin-6 投与後に全ての細胞株において DR5 の発現が誘導されていたこと、KatoIII 細胞において DR5 の発現抑制下で抗腫瘍効果の減弱が確認されたことから、DR5 が tenovin-6 の抗腫瘍効果において重要な役割を担っていることが示唆された。また今回の実験では tenovin-6 により ER stress 経路が活性化されることを示すことはできなかった。tenovin-6 の DR5 発現誘導効果については他の経路の存在が考えられ、今後の検討が必要であると考えられた。tenovin-6 と docetaxel または SN-38 との併用により軽度から中等度の相乗効果が得られ、臨床応用に向けたさらなる検討が期待された。sirtuin 阻害薬 tenovin-6 は胃癌細胞に対して優れた抗腫瘍効果を示し、今後の胃癌化学療法の開発において有望な薬剤になりうる可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

(批評)

ヒト胃癌細胞株において、sirtuin 阻害薬である tenovin-6 が *TP53* の変異の有無に拘らず抗腫瘍効果誘導し、それに DR5 が重要な役割を果たしていることを示した研究である。重要な所見であり、多くのデータからの解析は高く評価される。また機序として ER stress 経路の関連性は認められなかったが、今後は CHOP の転写活性評価や CHOP 非依存性の経路の検討も考えている。in vivo での tenovin-6 の抗腫瘍効果の検討など将来の発展も望まれる。

平成 26 年 10 月 1 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。よって、著者は博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。