

氏名 (生年月日) **みやもと けいすけ** 宮本 恵輔 (1990年11月28日)

学位の種類 博士 (薬学)

学位記番号 博薬第191号

学位授与の日付 2020年3月20日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 食道がん細胞における抗がん薬感受性に対するオラパリブによる増強効果に関する研究

論文審査委員 (主査) 教授 西口 工司

(副査) 教授 長澤 一樹

(副査) 教授 山本 昌

論文内容の要旨

序章

本邦において、食道がん患者の5年生存率は他の消化器がんと比較して低く、また多くの食道がん患者において診断時に既にがんの浸潤・転移が認められている。そのため、食道がんの治療には、全身的な治療が可能であるがん化学療法を欠かすことができない。食道がん化学療法の一次療法として、主に5-フルオロウラシル (5-FU) 及びシスプラチン (CDDP) を用いたFP療法が実施されており、奏効率は60%と比較的高い。しかしながら、一次療法に対して不応性を示す患者が一定数存在すること、さらには二次療法以降に有効な薬剤に乏しいことが、食道がんの治療における問題点である。

オラパリブは、DNA損傷応答を促進するポリADPリボースポリメラーゼ (PARP) 1を標的とした分子標的薬であり、乳がん感受性遺伝子1または2 (BRCA1/2) に変異を有する卵巣がん及び乳がんの治療に単剤での使用が認められている。食道がんの場合、*in vitro* では細胞増殖阻害作用が認められているものの、BRCA1/2に変異を有する患者の割合が数%とわずかであるため、PARP阻害薬単剤処置による治療への応用に向けた検討はほとんどなされていない。一方、オラパリブは、BRCA1/2変異を問わず卵巣がん患者の抗がん薬治療に追加されることで無増悪生存期間を有意に延長させることから、食道がんにおいても既存の抗がん薬との組み合わせにより治療効果を向上させる可能性が考えられる。しかしながら、食道がん細胞において、オラパリブが既存の抗がん薬による細胞増殖阻害作用に対してどのような影響を及ぼすのかは、未だ不明である。

そこで本研究では、食道がんの治療においてオラパリブと組み合わせるべき既存の抗がん薬に関する情報を得る目的で、食道がん細胞の抗がん薬感受性に及ぼすオラパリブの影響について基礎的検討を実施した。

第1章 食道がん細胞の抗がん薬感受性に及ぼすオラパリブの影響

食道がん細胞 KYSE70 (BRCA1/2 野生型) 及び KYSE140 細胞 (BRCA1 変異型) を用いて、抗がん薬の感受性に及ぼすオラパリブの影響を検討した。抗がん薬として、既存の代表的な抗がん薬である CDDP、イリノテカンの活性代謝物である SN-38、ドキシソルビシン、テモゾロミド、5-FU 及びドセタキセルを選択した。オラパリブは、2種類の食道がん細胞に対して、単剤の処置により細胞増殖阻害作用を示し、特に KYSE140 細胞において高い感受性が認められた。また、オラパリブは、使用した6

種類の抗がん薬の細胞増殖阻害曲線をそれぞれ低濃度側へシフトさせ、特に CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドの 50%増殖阻害濃度 (IC₅₀) 値を大きく低下させた。さらに、これら 4 種の抗がん薬による細胞増殖阻害作用は、BRCA1/2 野生型の KYSE70 細胞においてオラパリブにより相乗的に増強されることが認められた。一方、BRCA1 変異を有する KYSE140 細胞においては、オラパリブによる CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドに対する相乗的な感受性増強効果は認められなかった。次に、KYSE70 細胞において、抗がん薬によるコロニー形成阻害作用に及ぼすオラパリブの影響を検討した。オラパリブは、CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドのそれぞれによるコロニー形成阻害作用をいずれも顕著に増強させた。さらに、これら抗がん薬によるコロニー形成阻害作用は、オラパリブによって相乗的に増強されることが示された。なお、オラパリブは、5-FU 及びドセタキセルのコロニー形成阻害作用を増強したものの、その作用は相加的であった。したがって、オラパリブは、食道がん細胞において DNA 損傷を誘導する抗がん薬である CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドの感受性を増強し、その作用は BRCA1 変異型の KYSE140 細胞ではなく BRCA1/2 野生型の KYSE70 細胞において相乗的であることが明らかとなった。

第 2 章 BRCA1/2 野生型の食道がん細胞におけるオラパリブによる DNA 損傷応答を介した抗がん薬感受性の増強機序の解明

BRCA1/2 野生型である KYSE70 細胞において、オラパリブによる抗がん薬感受性増強効果に関する機序を明らかにする目的で、PARP1 が関連する DNA 損傷応答に着目した検討を実施した。BRCA1/2 野生型である KYSE70 細胞において、PARP1 活性化の指標となるタンパク質のポリ ADP リボース化 (PAR) が、抗がん薬 (CDDP、SN-38、ドキソルビシン、テモゾロミド、5-FU 及びドセタキセル) 処置の有無に関わらず認められた。また、オラパリブは、いずれの条件下においても PAR をほぼ完全に抑制した。次に、KYSE70 細胞において、CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドは、DNA 損傷が生じていることを示す指標となる核内リン酸化ヒストン H2AX (γ H2AX) の集積を誘導した。また、オラパリブは、これら 4 種類の抗がん薬が誘導する核内 γ H2AX の集積量を有意に増大させた。しかしながら、5-FU 及びドセタキセルの場合には、オラパリブの共存による核内 γ H2AX の集積量の増大は認められず、それはオラパリブ単独処置時とほぼ同等であった。これらの結果は、KYSE70 細胞における CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドに対する感受性の相乗的増強効果が、オラパリブによる PARP1 活性の阻害に基づいた DNA 損傷の増大に起因していることを示唆している。一方、オラパリブは、BRCA1/2 変異型のがん細胞において DNA 修復エラー頻度が高い古典的非相同末端結合を亢進させることで細胞における染色体異常を蓄積し、細胞毒性を誘導することが知られている。そこで、BRCA1/2 野生型である KYSE70 細胞におけるオラパリブによる抗がん薬に対する感受性の相乗的増強効果への古典的非相同末端結合の関与について確認することとした。古典的非相同末端結合の主要な因子である DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK) に対する阻害薬である NU7441 は、KYSE70 細胞におけるオラパリブと抗がん薬による細胞増殖阻害作用を減弱させなかった。この結果は、BRCA1/2 野生型の食道がん細胞におけるオラパリブによる抗がん薬感受性の相乗的増強効果に古典的非相同末端結合が寄与しない可能性を示している。

したがって、BRCA1/2 野生型の食道がん細胞において、オラパリブは PARP1 活性を阻害することで CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドに対して相乗的増強効果を誘導し、その機序は DNA 損傷の増大に起因する可能性を明らかとした。

総括

本研究では、*BRCA1/2* 野生型の食道がん細胞において、オラパリブが CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドに対する感受性を DNA 損傷の増大に起因して相乗的に増強する可能性を明らかにした。本知見は、食道がん細胞において、オラパリブが感受性を増強させる抗がん薬の特徴を明確にするものであり、オラパリブなどの PARP 阻害薬を用いた食道がん化学療法構築のための基礎的な知見になると考えられる。

審査の結果の要旨

現在、食道がん化学療法の一次療法として、5-フルオロウラシル (5-FU) 及びシスプラチン (CDDP) を用いた FP 療法が実施されている。しかしながら、不応性を示す患者が一定数存在しており、その二次療法以降に有効な薬剤に乏しいことが臨床的な問題となっている。オラパリブは、DNA 損傷応答を促進するポリ ADP リボースポリメラーゼ (PARP) 1 を標的とした分子標的薬であり、乳がん感受性遺伝子 1 または 2 (*BRCA1/2*) に変異を有する患者に単剤での使用が認められている。しかし、食道がんの場合、*BRCA1/2* に変異を有する患者が極めて少ないため、PARP 阻害薬の食道がん治療薬としての可能性について検討されてこなかった。一方で、*BRCA1/2* 変異の有無に関わらず、既存の抗がん薬治療へのオラパリブの追加が、患者の生命予後を有意に改善できると報告されている。しかしながら、食道がんの抗がん薬感受性に及ぼすオラパリブの影響は未だ不明である。そこで本研究では、食道がん細胞における既存の抗がん薬による細胞増殖阻害作用に及ぼすオラパリブの影響について検討した。

1. 食道がん細胞の抗がん薬感受性に及ぼすオラパリブの影響

食道がん細胞を用いて、CDDP、SN-38、ドキソルビシン、テモゾロミド、5-FU 及びドセタキセルの感受性に及ぼすオラパリブの影響について検討した。その結果、オラパリブが、食道がん細胞において DNA 損傷を誘導する抗がん薬である CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドの感受性を増強し、その増強作用は *BRCA1/2* 野生型の KYSE70 細胞において相乗的であることを見出した。

2. *BRCA1/2* 野生型の食道がん細胞におけるオラパリブによる DNA 損傷応答を介した抗がん薬感受性の増強機序の解明

KYSE70 細胞 (*BRCA1/2* 野生型) において、オラパリブによる抗がん薬感受性の増強機序を明らかにする目的で、DNA 損傷応答に着目した検討を実施した。その結果、KYSE70 細胞における CDDP、SN-38、ドキソルビシン及びテモゾロミドに対する感受性の相乗的な増強が、オラパリブによる PARP1 活性の阻害に基づく DNA 損傷の増大に起因することを明らかにした。また、同時に古典的非相同末端結合は寄与しないことも見出した。

本研究で得られた知見は、*BRCA1/2* 野生型の食道がん細胞において、オラパリブが感受性を増強させる抗がん薬の特徴を明確にするものであり、オラパリブなどの PARP 阻害薬を用いた新たな食道がん化学療法構築のために有用な基礎的情報を提供するものと考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。