

氏名 (生年月日) **みねがき てつや** 哲也 (1983年1月20日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 論博 第200号

学位授与の日付 2015年9月30日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 食道がん化学療法の個別化を考慮した新規治療戦略構築を目指した基礎的研究

論文審査委員 (主査) 教授 西口 工司

(副査) 教授 栄田 敏之

(副査) 教授 吉貴 達寛

(副査) 教授 山本 昌

## 論文内容の要旨

食道がんに対するがん化学療法は、術前・術後や再発時など幅広く用いられており、その有効性は治療成績に大きく影響する。しかしながら、同じ消化器がんである大腸がんでは、診断後の5年生存率が約70%と治療成績の向上が著しいのに対して、食道がんでは5年生存率が約35%であり、未だ十分とは言えない。

食道がん化学療法の治療成績が悪い要因として、薬剤の有効性や副作用の個人差が大きい上、使用できる薬剤も少ないことが挙げられる。食道がんに対するがん化学療法の有効性及び副作用のリスクを事前に予測するための研究が精力的に行われているものの、未だ臨床応用に至っているものは存在しない。また、食道がん化学療法には5-フルオロウラシル (5-FU) 及びシスプラチン (CDDP) を除き、コンセンサスが十分に得られている薬剤はほとんど存在しない。したがって、食道がんの治療成績向上のためには、食道がん化学療法における有効性及び安全性の個人差の要因を明らかにするとともに、食道がんに対して有効な新たな治療薬を見つける必要がある。

そこで本研究では、食道がん化学療法における個人差を考慮した治療戦略を構築することを目的として5-FU 及び CDDP を用いた食道がん化学療法による治療効果の事前予測に有用な指標を探索するとともに、食道がん化学療法の有効性向上を目指したビスホスホネート系薬物 (BPs) の有用性について検討した。

### 第1章 ヒト食道がん細胞株における5-FU 及びCDDP 感受性を規定する因子の探索

食道がん化学療法の個人差を引き起こす要因の一つとして、腫瘍組織中におけるがん細胞自身の抗がん剤感受性の相違が考えられる。本研究において、5-FU 及びCDDP に対する感受性は、5種類のヒト食道がん細胞株間で大きな相違が認められた。次に、これらヒト食道がん細胞株における5-FU 及びCDDP に対する感受性と、薬物トランスポーター、DNA 修復関連タンパク質及び代謝酵素を含む35種類の機能性タンパク質の mRNA 発現量との関連性について検討した。その結果、5-FU の感受性は、ABCC2 (排泄トランスポーター: MRP2)、MSH2 (DNA ミスマッチ修復遺伝子) 及びDPYD (5-FU の代謝酵素) の mRNA 発現量とそれぞれ強い正の相関性を示し ( $r > 0.7$ )、SLC22A2 (有機カチオントラン

スポンサー)、*SLC23A2* (ビタミンCトランスポンサー)、*ABCB1* (P糖タンパク質) 及び *RAD51* (DNA修復因子) の mRNA 量と負の相関性を示した ( $r > -0.7$ )。また CDDP の感受性は、*ABCC2*、*MSH2* 及び *DPYD* の mRNA 発現量と強い正の相関性を示した ( $r > 0.7$ )。以上のことから、5-FU 及び CDDP 両方の感受性と相関性を有した *ABCC2*、*MSH2* 及び *DPYD* mRNA が食道がん化学療法の有効性を予測するバイオマーカーの候補として考えられた。

*ABCC2* 阻害剤である MK571 の同時処置は、ヒト食道がん細胞株の 5-FU 及び CDDP 感受性を増強しなかったものの、*DPYD* 阻害剤であるギメラシルは *DPYD* mRNA の発現量が最も高値であった KYSE30 細胞の 5-FU 感受性を増強させた。以上の結果より、食道がん細胞における *DPYD* の mRNA 発現量が食道がん化学療法の有力な感受性予測因子の候補遺伝子であり、*SLC22A2*、*SLC23A2* 及び *MSH2* についてもその候補となり得ることが示唆された。

## 第2章 食道がん化学放射線療法施行患者における *SLC23A2* の遺伝子多型と治療効果の関連

ビタミンC (VC) の抗酸化能は、酸化ストレスにより誘導される腫瘍形成を阻害することが知られている。また、VC を細胞内に取り込むトランスポンサー-SVCT2 をコードする *SLC23A2* の SNPs は、種々のがん罹患率と関連することが報告されている。さらに *in vitro* において、VC が食道がん細胞株の 5-FU 及び CDDP 感受性を増強すること、5-FU 耐性大腸がん細胞の *SLC23A2* mRNA 発現量が親株と比較し低レベルであること、*in vivo* において酸化ストレスが 5-FU の骨髄抑制発現に関与することがそれぞれ報告されている。以上のことから、*SLC23A2* の SNPs は食道がん患者における 5-FU 及び CDDP によるがん化学療法の治療成績に影響している可能性が考えられる。そこで本検討では、5-FU 及び CDDP を含む化学放射線療法 (FP-RT 療法) を施行した 49 例の日本人の食道がん患者を対象として、5種類の *SLC23A2* の SNPs (rs2681116、rs13037458、rs1715364、rs4987219 及び rs1110277) と FP-RT 療法の完全奏効 (CR) 率、長期予後並びに重篤な副作用との関連性を検討した。FP-RT 療法施行後の CR 率及び長期予後は、統計学的に有意ではないものの rs2681116 並びに rs13037458 と相関する傾向が認められた。また、rs4987219 及び rs1110277 は、それぞれ重篤な白血球減少症 ( $p = 0.025$ ) 及び口内炎 ( $p = 0.019$ ) の発症と有意な関連性が認められた。したがって、これら SNPs が SVCT2 の VC の取り込み能に関与し FP-RT 療法の有効性や副作用に影響したことが推察される。以上より、食道がん FP-RT 療法の有効性予測に *SLC23A2* の rs2681116 及び rs13037458 が、安全性予測に rs4987219 及び rs1110277 が利用可能である可能性が示唆された。

## 第3章 ヒト食道がん細胞株に対するビスホスホネート系薬物の増殖抑制効果

近年、第二及び第三世代のビスホスホネート系薬物 (N-BPs) が、乳がんや肺がんなどを用いた基礎的検討において細胞増殖抑制作用を示すことが報告されている。したがって、食道がん細胞においても N-BPs が新規の抗がん活性を有する薬剤の候補として挙げられる。本検討では、ヒト食道がん細胞株に対する N-BPs の細胞増殖抑制作用並びにそのメカニズムを検討した。4種類の N-BPs (アレンドロン酸、パミドロン酸、リセドロン酸及びゾレドロン酸) は、3種類のヒト食道がん細胞株に対し濃度依存的な細胞増殖抑制作用を示した。また、これら N-BPs は、ヒト食道がん細胞株のカスパーゼ 3/7 活性を上昇させるとともに、アポトーシスの指標であるアネキシン V 陽性細胞の比率を増大させた。さらに、N-BPs は細胞周期制御因子である Cyclin D1 のタンパク質発現量を有意に減少させ、細胞周期を G0/G1 期で停止させた。よって、N-BPs の食道がん細胞に対する細胞増殖抑制作用に、アポトーシスの誘導及び細胞周期の停止が関与することが示唆された。次に、N-BPs の細胞増殖抑制作用メカニズムの解明を行った。N-BPs の細胞増殖抑制作用は、細胞内でメバロン酸経路の中間体であるセラ

ニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) に変換されるゲラニルゲラニオールを共存させることにより、ほぼ完全に抑制された。したがって、N-BPs の細胞増殖抑制作用は、細胞内 GGPP の枯渇に起因していることが示唆された。以上のことから、N-BPs は食道がん細胞に対し細胞増殖抑制作用を有し、そのメカニズムは、メバロン酸経路の阻害に基づく GGPP の枯渇に伴い生じる G0/G1 期での細胞周期停止、及びアポトーシスの誘導であるということが考えられた。

以上本研究の結果から、腫瘍組織の生検が可能な場合は腫瘍組織の *DPYD* mRNA の発現量により、不可能な場合は血球などを用いた *SLC23A2* の SNP 判定により食道がん化学療法の有効性及び安全性を予測できる可能性が示唆された。さらに、食道がん化学療法の有効性及び安全性が低いと予測された患者には N-BPs をがん化学療法に応用する食道がんに対する新規治療戦略の可能性が示唆された。これらの研究成果は、食道がん化学療法の個人差を考慮した、治療選択肢の拡大につながる重要な基礎的知見になるものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

食道がん化学療法は、薬剤の有効性や副作用の個人差が大きい上、コンセンサスが得られている薬剤については5-フルオロウラシル (5-FU) 及びシスプラチン (CDDP) を除いて、選択肢がほぼ存在しないという大きな問題を抱えている。そこで申請者は、食道がん化学療法における個人差を考慮した治療戦略の構築を目的として、*in vitro* 並びに臨床研究において5-FU 及びCDDP を用いた食道がん化学療法の治療効果の予測に有用な指標を探索するとともに、食道がんの薬物治療に対するビスホスホネート系薬物 (BPs) の応用可能性について検討した。

### 1. ヒト食道がん細胞株における5-FU 及びCDDP 感受性を規定する因子の探索

5種類のヒト食道がん細胞株における5-FU 及びCDDP に対する感受性と、薬物輸送、DNA 修復及び代謝に関与する全35種類の機能性タンパク質の mRNA 発現量との関連性について検討された。その結果、5-FU の代謝酵素 *DPYD* やビタミンC トランスポーターである *SLC23A2* を含む7種類の因子について、mRNA 発現量と5-FU の感受性との間に高い相関性が存在することを見出した。また、CDDP の感受性は、薬物排出トランスポーター *ABCC2* をはじめ3種類の因子の mRNA 発現量と高い相関性を示した。さらに、*DPYD* 阻害剤であるギメラシルにより5-FU の感受性は増強することが示された。以上のことから、*DPYD* mRNA の発現量が食道がん化学療法の有力な感受性予測因子となり得る可能性が明らかにされた。

### 2. 食道がん化学放射線療法施行患者における *SLC23A2* 遺伝子多型と治療効果の関係

5-FU 及びCDDP を含む化学放射線療法 (FP-RT 療法) が施行された食道がん患者における *SLC23A2* の SNPs 5種類と、FP-RT 療法施行後の完全奏効率、長期予後及び重篤な副作用の発症との関連性が検討された。その結果、統計学的に有意では無かったものの、完全奏効率及び長期予後と rs2681116 並びに rs13037458 との関連傾向が認められた。また、重篤な白血球減少症及び口内炎の発症は、それぞれ rs4987219 及び rs1110277 と有意に関連している可能性が明らかにされた。

### 3. ヒト食道がん細胞株に対する BPs の増殖抑制効果

ヒト食道がん細胞株に対する BPs の細胞増殖抑制効果並びにそのメカニズムについて検討された。その結果、第二及び第三世代の BPs (N-BPs) が食道がん細胞株に対して濃度依存的に細胞増殖抑制作用を示すことが見出された。また、そのメカニズムとして N-BPs によりアポトーシスが誘導されること、細胞周期制御因子である Cyclin D1 タンパク質の発現量を減少させることにより細胞周期を停止させることが示された。さらに、この細胞増殖抑制作用は、N-BPs によるメバロン酸経路の阻害により、細胞内のゲラニルゲラニルピロリン酸が枯渇することにより引き起こされることが明らかにされた。

以上の検討結果より、食道がん化学療法の有効性及び安全性の予測に *DPYD* mRNA の発現量並びに *SLC23A2* の SNPs 判定が有用であること、また N-BPs を食道がん化学療法に応用できる可能性が見出された。本研究成果は、食道がん化学療法の個人差を考慮した治療選択肢の拡大につながる重要な基礎的知見にな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。