

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 塚本 佳広
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 672 号
学位授与の日付 平成 28 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 薬剤スクリーニングから同定されたテモゾロミド耐性膠芽腫細胞増殖抑制薬, EUrd の解析と臨床応用への基礎研究

論文審査委員 主査 教授 柿田 明美
副査 教授 藤井 幸彦
副査 教授 竹林 浩秀

博士論文の要旨

【はじめに】 Glioblastoma (GBM) は WHO 分類で Grade IV に分類される予後不良の疾患で、平均生存期間は 15 ヶ月程度とされている。手術、temozolomide (TMZ) などの化学療法、放射線治療などの集学的治療にも関わらず再発し死に至るため、その新規治療薬の開発が急務とされている。現在までに様々な TMZ 耐性機序が報告されているが、臨床応用には至っていない。一方、GBM initiating cells (GICs) は TMZ などへの治療抵抗性と、強い腫瘍形成能を持つ細胞群で再発の原因と考えられている。申請者らは、human GBM-initiating cells (GIC) から TMZ 耐性 GIC 細胞 (GICR) を樹立し、薬剤ライブラリスクリーニングにより GICR に有効な新規治療候補薬の同定を試みた。その結果、GICR の増殖に強い抑制効果を示す化合物、1-(3-C-ethynyl- β -D-ribofuranosyl) uracil (EUrd) を同定し、その分子機序を解析したので報告する。

【材料と方法】 TMZ 含有培地で GIC を培養して GICR を樹立した。GICR の幹細胞マーカーを免疫染色を用いて、side population を FACS を用いて解析した。また腫瘍形成能をマウスの脳に移植することで確認した。樹立された GICR を用いて、北海道大学薬学研究院所有の 1,342 種の薬剤ライブラリで、GICR に増殖抑制/細胞死誘導効果を示す薬剤を同定する薬剤スクリーニングを行った。その際、正常細胞への毒性を検討するためマウス神経幹細胞を用いた。その結果、同定された EUrd の作用機序を解析した。更に、GICR を NOD/SCID マウスの皮下に移植した担がんマウスモデルを用いて、EUrd の治療効果を検討した。また EUrd の代謝に関わると思われるリン酸化酵素 (uridine cytidine kinase) と脱リン酸化酵素 (5'-nucleotidase cytosolic III) のノックアウト株と強制発現株を作製し、その分子機構を検討した。

【結果】 GIC を TMZ 含有培地で培養する事によって TMZ に耐性化した GIC を樹立する事が出来た。TMZ 耐性 GIC は TMZ に対して強い抵抗性を示した。また、幹細胞マーカーや腫瘍形成能は維持されており、また幹細胞に特徴的な side population 分画の上昇も認められた。TMZ 治療時の再発を引き起こす GIC の in vivo モデルとなり得ると考えられた。薬剤スクリーニングにより GICR に増殖抑制/細胞死誘導効果を持つ EUrd を同定した。EUrd は、U87MG 等の既存の GBM 細胞株に対しても増殖抑制/細胞死誘導効果を示すことを確認した。その作用機序は核酸合成阻害であり、EUrd 存在下で GICR は G0/G1 期に cell cycle arrest

する。更に、担がんマウスを用いて EUrd の抗腫瘍効果を確認した。EUrd は uridine の誘導体であり、uridine は uridine-cytidine kinase によってリン酸化され核酸合成に取り入れられる。遺伝子導入実験によって EUrd は uridine-cytidine kinase-like 1 (UCKL1) と 5'-nucleotidase cytosolic III (NT5C3) によってリン酸化の制御を受けることが示唆された。また、GICR は GIC と比較し、uck11 発現の上昇が認められた。このことは GICR がより EUrd への強い感受性を示す一因と考えられた。

【考察と結論】申請者らは、GICR に対する薬剤スクリーニングを遂行し、GICR に増殖阻害を引き起こす化合物 EUrd を同定した。EUrd は、GBM 以外の悪性腫瘍に対して抗腫瘍効果が報告されているが、未だ臨床応用されていない化合物である。今後、TMZ 維持療法中の再発性 GBM に対する新規治療薬として臨床応用が期待される。また、スクリーニングの過程で未知の化合物を見つけることにより新たな分子生物学的機構が解明された。薬剤スクリーニングは新しい作用機序を探る上でも非常に有用と考えられた。

審査結果の要旨

本論文は、悪性脳腫瘍である膠芽腫(GBM)の患者の腫瘍組織から、細胞培養法により腫瘍形成能を持つ細胞群 GBM initiating cell (GIC)を調整し、更に化学療法剤 Temozolomide (TMZ)耐性細胞(GICR)を分離し、その後、これら細胞の増殖抑制効果を示す薬剤を in vitro でスクリーニングした結果を示したものである。まず申請者は、TMZ を含有する培地で GIC を培養し、幹細胞性を維持しながら TMZ 耐性を示す GICR を樹立した。次に、1,342 種の薬剤ライブラリを用い、GICR の増殖抑制効果を示す薬剤をスクリーニングし、uridine の誘導体である 1-(3-C-ethynyl- β -D-ribofuranosyl) uracil (EUrd)を同定した。遺伝子導入実験によって EUrd は uridine-cytidine kinase-like 1 と 5'-nucleotidase cytosolic III によりリン酸化および脱リン酸化の代謝制御を受けることが示された。更にマウスの皮下に GICR を移植し EUrd を静脈投与したところ、腫瘍縮小効果が示された。

本論文は、新規治療薬候補の同定に培養細胞株を用いた薬剤スクリーニング法が有用であることを示し、GBM 治療薬候補として EUrd を見出したものであり、悪性脳腫瘍の治療に向けた新たな可能性を示したものである。この点に学位論文としての価値を認める。