

学位論文要約

Extended Summary in Lieu of the Full Text of a Doctoral Thesis

甲第 945 号

氏 名: 大野 智彦
Full Name Tomohiko Ohno

学位論文題目: 非環式レチノイドと FXR リガンド GW4064 併用による肝癌細胞の増殖抑制

Thesis Title Synergistic growth inhibition of human hepatocellular carcinoma cells by acyclic retinoid and GW4064, a farnesoid X receptor ligand

学位論文要約:
Summary of Thesis

肝細胞癌は、慢性肝炎・肝硬変を背景として発生する予後不良の悪性疾患である。従って、肝硬変や肝細胞癌治療後残存肝といった高発癌リスク状態の肝臓に多数存在する「癌の芽 (clone)」を、薬物療法等を用いて積極的に除去する (clonal deletion) ことで肝発癌を抑制する化学肝発癌予防は、肝細胞癌患者の予後改善において有用である。Clonal deletionを実践する非環式レチノイド (Acyclic retinoid; ACR)は、臨床介入試験において初発肝癌根治治療後の二次肝発癌を有意に抑制し生存率を改善することが確認されたため、「肝発癌抑制薬」としての臨床応用が期待されている。

ACRは、レチノイドX受容体RXR α に対しアゴニスト作用を持つ合成レチノイドである。RXR α は、他の核内受容体とヘテロ二量体を形成することで様々な生理活性作用を発揮する核内受容体superfamilyのmaster regulatorであるが、ヒト肝癌組織において、RXR α はリン酸化修飾を受け機能不全に陥っていることが明らかになっている。ACRはRas/MAPKを抑制し、肝癌組織におけるRXR α のリン酸化修飾を解除することでその機能を回復し、肝癌細胞の増殖を抑制する。また、ACRは異なる作用機序を持つ薬剤と併用することで、肝発癌や肝癌細胞の増殖に対し相乗的な抑制効果を発揮する「併用化学肝発癌予防」のkey drugとしても注目されている。

胆汁酸をリガンドとする核内受容体ファルネソイドX受容体FXRは、RXR α とヘテロ二量体を形成することで標的遺伝子の発現を制御し、胆汁酸の腸肝循環やコレステロール代謝において重要な役割を果たしている。さらに、FXRの発現・機能異常が肝発癌に深く関与していることが、近年明らかになってきている。今回我々は、有効な新規併用化学肝発癌予防法を開発すべく、RXR α を分子標的とするACRとFXRの合成リガンドであるGW4064の併用処理による、ヒト肝癌細胞に対する増殖抑制効果について検討を行った。

【対象と方法】

ヒト肝癌細胞株 (HLE, HLF, HuH7)と正常肝細胞株Hcを、ACRとGW4064でそれぞれ単独あるいは併用処理し、細胞増殖抑制の相乗効果をMTS assayとcombination index (CI)を用いて検討した。また、HLE細胞をACRとGW4064で併用処理し、RXR α , ERK, Stat3蛋白のリン酸化とcPARPの発現をwestern blot法にて検討した。また、同条件下におけるp21CIP1, c-myc, cyclin D1およびsmall heterodimer partner (SHP)の発現をreal-time reverse transcription PCR (RT-PCR)で、細胞周期への影響をFACSで、apoptosisの誘導をTUNEL法とAnnexin-V assayで、FXR element (FXRE)の転写活性をluciferase reporter assayでそれぞれ検討した。

【結果】

まず始めに、ヒト肝癌細胞株HLE, HLFおよびHuH7とヒト正常肝細胞株Hcを、ACR, GW4064でそれぞれ単独あるいは併用処理し、細胞増殖抑制に及ぼす影響を検討したところ、ACRおよびGW4064単独処理は、Hc細胞と比較し肝癌細胞株の増殖を有意に抑制すること、またこの抑制効果は、両剤の併用処理によって相乗的に増強することが明らかになった。次にHLE細胞を用いて、ACRとGW4064の併用による細胞増殖抑制の機序に関する詳細な検討を行ったところ、両剤の併用処理によって、相乗的なアポトーシスの誘導とG0-G1期における細胞周期停止が認められた。またHLE細胞において、ACRとGW4064の併用処理は、RXR α , ERK, Stat3蛋白のリン酸化を抑制し、FXRE promoterの転写活性を上昇させ、p21CIP1およびSHP mRNAの発現増強とc-mycおよびcyclin D1 mRNAの発現を低下させた。

【考察】

ACRとGW4064の相乗的肝癌細胞増殖抑制の機序として、以下の仮説が考えられる。まずGW406

4は、FXRのリガンドとしてその標的遺伝子の発現を制御するとともに、ERKとStat3のリン酸化シグナルを抑制することでRXR α のリン酸化を阻害し、その機能(二量体形成能)を回復する。ACRも、ERKによるRXR α のリン酸化を抑制することで、FXRとヘテロ二量体を形成する非リン酸化RXR α の増加を促すとともに、それ自体がRXR α のリガンドとして作用することで、FXRの標的遺伝子の発現をさらに制御する。これらの結果、アポトーシスの誘導や細胞周期の制御が相乗的に起こり、最終的には肝癌細胞に対し増殖抑制効果が誘導されるものと考えられた。また本研究結果は、ACRを用いた併用化学肝発癌予防において、リン酸化RXR α が重要な標的分子である可能性をあらためて示唆するものである。

【結論】

ACRとGW4064の併用は、共同的にRXR α のリン酸化を阻害し、FXRの標的遺伝子の発現を調節することで、肝癌細胞にapoptosisと細胞周期停止(G0-G1 arrest)を誘導し、相乗的な増殖抑制効果を示した。肝細胞癌の予防・治療として有効と考えられる2薬剤(ACRおよびGW4064)の併用処理による、相乗的な肝癌細胞増殖抑制効果を明らかにした本研究結果は、本レジメン(ACRとGW4064の併用)による化学肝発癌予防の有効性(臨床応用の可能性)を強く期待させるものであり、今後、新たな肝発癌予防法あるいは治療法の可能性を切り開いていく上で、非常に意義深い研究結果であると考えられた。

Cancer Letters 323, 215–222 (2012).