

氏名 (本籍)	山 田 敦 子 (愛知県)		
学位の種類	博 士 (医学)		
学位授与番号	甲第	1001	号
学位授与日付	平成	27	年 12 月 16 日
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	Novel therapy for locally advanced triple-negative breast cancer		
審査委員	(主査) 教授	清 島 真理子	
	(副査) 教授	長 岡 仁	教授 原 明

論文内容の要旨

日本での女性癌の原発臓器は乳腺が圧倒的に多く、その罹患率は2位の胃を大きく引き離し、12人中1人と言われている。一方でその死亡者数が4位である理由は、癌種の生物学的特徴のみならず治療手段が多様（手術療法、薬物療法、放射線治療）であることによる。特に薬物療法は抗癌剤に加え、human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) 拮抗剤、およびホルモン受容体（エストロゲンレセプター；ER, プロゲステロンレセプター；PgR）を標的とした内分泌療法など、選択肢が豊富である。しかし、上記受容体陰性のサブタイプである triple negative breast cancer (TNBC)は、全体の15-20%に存在し、その増殖活性の高さと、HER2 受容体拮抗剤や内分泌療法を行えない点から、治療選択に難渋し新戦略の早急な確立が期待されている。

これまでに Vitamin K3 (VK3)はその細胞増殖抑制効果が注目され、乳癌を含む13種類の培養ヒト癌細胞に対する影響が報告されてきた (J Mol Biol, 314:765-772, 2001 など)。そのメカニズムとして、増殖活性関連シグナルである mitogen activated protein kinase (MAPK)経路における extracellular signal-regulated kinase (ERK)を“不完全リン酸化する”ことで効果を発揮することが既に報告されている (J Hepatol, 2001)が、不明な点も多い。ERK は癌組織において高発現しているため、ERK を標的とした治療の有用性が期待される。しかし、VK3 の全身投与は副作用が強く、臨床応用には種々の問題点がある (Anticancer Agents Med Chem, 2009)。TNBC における新規治療選択肢として、VK3 の“局所投与治療”を目標として、その有用性と効果発現を予測する因子を検討するために本研究を計画した。

【対象と方法】

4種類のヒト乳癌細胞株、すなわち MCF-7 (ER, PgR 陽性)、SK-BR3 (HER2 陽性)、BT474 (HER2, ER, PgR 陽性) および MDA-MB-231 (TNBC) を使用し、培養は 37°C, 5%CO₂/95%air 下で 10%FBS+DMEM 培地を用いて行った。VK3 の増殖抑制効果は MTT assay, 細胞内シグナル活性および蛋白発現は Western Blotting (WB), 細胞死に関わる oxidative stress の指標である活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) は total ROS detection kit[®]を用いて蛍光顕微鏡下で評価した。

in vivo 実験では、5週齢の BALB/c nu/nu 雌マウス皮下に乳癌細胞 (MDA-MB-231) を移植することで腫瘍モデルを作成した。21日後に PBS (control), エタノール (VK3 の溶解剤), あるいは VK3 を腫瘍部に注射し、腫瘍径および腫瘍体積を経時的に測定した。また同時に、MAPK 経路において重要な因子であるリン酸化 ERK の組織内での発現を WB を用いて検討した。

【結果】

- ① VK3によるIC₅₀ (μM) を測定したところ、MCF-7, SK-BR3, BT474およびMDA-MB-231においてそれぞれ25.1±0.2, 11.3±0.3, 22.0±0.7および17.0±2.7であり、VK3の効果は4種類の培養細胞株で差異はなかった。そこでTNBCであるMDA-MB-231について以下の検討を行った。

- ② VK3 (20 μ M) を培地に添加5分後に、リン酸化チロシンおよびリン酸化EGF受容体の発現が増加し、少なくとも2時間持続した。一方、cMet 発現は変化しなかった。リン酸化ERKは5分後から2時間後まで時間依存性に発現が増加した。c-jun N-terminal kinase (JNK)やmammalian target of rapamycin (mTOR)のリン酸化は5分後にピークとなり、その後減少した。リン酸化Aktは5分後に増加し2時間後まで発現は変わらなかった。また、epidermal growth factor (EGF) 受容体阻害剤の併用によりリン酸化EGF受容体の発現は抑制されたが、リン酸化ERK、リン酸化JNKの発現は変化がみられなかった。
- ③ VK3添加によりcyclin D1は12時間後に増大し、一方cyclin B1は減少した。6時間後には不活性型 caspase-3の減少と活性型PARPの増加が観察された。
- ④ VK3添加により腫瘍細胞内でROSが著明に増加した。Non-thiol系anti-oxidantであるカタラーゼの併用により、VK3による細胞増殖制御およびリン酸化ERKの発現は影響を受けなかった。一方、thiol系anti-oxidantであるL-システインは、濃度依存性にVK3による細胞増殖抑制およびリン酸化ERK発現を抑制した。
- ⑤ ノードマウスに移植した腫瘍にVK3 (20mMと50mM) を局所注射すると、腫瘍体積(mm³)はそれぞれ1日目で170.8 \pm 96.1 と161.3 \pm 25.0, 3日目には93.3 \pm 45.3 と81.7 \pm 34.0 であり、時間依存性に有意に縮小を認めた。またVK3局注後の腫瘍内では、リン酸化ERKの発現が増加した。

【考察】

VK3の腫瘍細胞増殖抑制は、G1期での細胞増殖周期の停止が推察された。また、ROSの関与に加え、ERK脱リン酸化の阻害を介する可能性が推察され、ERKの活性化を中心としたMAPK経路が重要と考えられた。さらにERKは治療効果の予測因子として有用である可能性が考えられた。

【結論】

VK3はTNBCヒト乳癌細胞に対しても細胞増殖抑制効果を示し、その機序としてはROSの発現とERKの活性化を中心としたMAPK経路が重要と考えられた。VK3の局所投与による治療は、今後TNBCを含めた新たな乳癌治療として期待できる。

論文審査の結果の要旨

申請者 山田 敦子は、triple negative breast cancerに対する新規治療としてのvitamin K3の可能性に着目し、VK3の腫瘍増殖抑制効果を*in vitro*および*in vivo*で解析した。その結果、VK3はERKの活性化を介して細胞増殖抑制効果を示し、細胞周期の停止とアポトーシスの誘導に関わることを見出した。また*in vivo*においてもVK3は有意に腫瘍を縮小させ、そのメカニズムはERKの活性化を介することを示した。これらの知見からVK3の臨床治療応用の可能性が期待され、本研究は乳腺外科学ならびに臨床腫瘍学の発展に少なからず寄与するものと認められる。

[主論文公表誌]

Atsuko Yamada, Shinji Osada, Toshiyuki Tanahashi, Satoshi Matsui, Yoshiyuki Sasaki, Yoshihiro Tanaka, Naoki Okumura, Nobuhisa Matsushashi, Takao Takahashi, Kazuya Yamaguchi, Kazuhiro Yoshida :Novel therapy for locally advanced triple-negative breast cancer

International Journal of Oncology 47, 1266-1272(2015).