

氏名（本籍）	八幡 和憲（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）
学位授与番号	甲第 1032 号
学位授与日付	平成 28 年 12 月 21 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	The Significant Role of Cyclin D1 in the Synergistic Growth-inhibitory Effect of Combined Therapy of Vandetanib with 5-Fluorouracil for Gastric Cancer
審査委員	（主査）教授 柴田 敏之 （副査）教授 清水 雅仁 教授 伊藤 善規

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

胃癌は国際的には東アジアや南米での罹患率が高く、本邦では 40 歳代以降に急激にその患者数を増やし、全がんな中の死亡率では男性で 2 位、女性で 3 位とその治療成績の向上が望まれる疾患である。その薬物療法は 5-fluorouracil (5-FU)系抗がん剤が中心であり、最近は分子標的薬を含む多剤併用にも期待が寄せられているが、未だ十分に満足のできる効果は得られていない状況である。一方、がんが増殖・進展するに際し重要な因子の一つである血管新生因子(vascular endothelial growth factor)の受容体に対するチロシンキナーゼ阻害薬である vandetanib (Vnib)は、新生細胞の増殖を促進する上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor)をも併せて block することが知られ、近年特に注目される分子標的薬である。今回我々は、胃癌に対する新たな治療戦略の構築を目的に、Vnib と 5-FU の併用効果につき検討し、さらにそのメカニズムの解明を試みた。

### 【対象と方法】

当科が保有しているヒト胃癌細胞株(MKN1, MKN7, MKN45, MKN74, TMK1)を対象とし、5-FU, Vnib の増殖抑制効果は3-(4,5-dimethyl-2-tetrazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT) assayにて、細胞内シグナルのタンパク発現についてはwestern blot, 細胞周期はflow cytometryによる各手技にて評価した。必要な細胞内シグナルのblockは、siRNAを用いて遺伝子レベルで発現を抑制した。また、in vivoにおける効果を確認するため、ヌードマウスによる研究も行った。

### 【結果】

1. Vnib は今回検討に供した胃癌細胞株全てにおいて増殖抑制効果を示した。5-FU との併用に関しては、MKN1, MKN45, TMK1 細胞株では相加的抑制を認めるのみであったが、MKN7 と MKN74 においては combination index 上相乗効果を認めた。また、ヌードマウス皮下に移植した MKN74 の腫瘍塊に対し、Vnib は単剤でも腫瘍径の縮小を示したが、5-FU との併用により腫瘍径縮小効果はさらに顕著であった。
2. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) の中心的役割を担う extracellular signal-regulated kinase (ERK)の活性化は、Vnib にて抑制されたが、上記 1 での細胞間では程度に差はなかった。
3. 細胞周期に関しては、Vnib 投与により G0/G1 期が、5-FU により S 期がそれぞれ時間依存的に増加したが、両薬の併用では相乗効果のみられた細胞株のみにて S 期が早期に増加することで

G1 期が 2 峰性となる現象が確認され、メカニズムの一端と推察された。

4. 細胞周期に応じて変動する蛋白(cyclin)は各チェックポイントでその制御に関する区割りを担うが、中でも G1 期から S 期への移行に関与する cyclin D1 は、MKN74 (相乗系) では Vnib 添加により明らかに発現を低下し、その下流である E2F1 を介して DNA 合成酵素である thymidylate synthase (TYMS) も濃度依存的に低下した。一方、相加的効果の細胞においては、このような現象は確認されず、この相乗効果に対する cyclin D1 の関与が示唆された。
5. Cyclin D1 の通常状態での発現状況を確認すると、相乗効果を示した細胞では相加効果群に比較して明らかに高いことが判明した。そこで、siRNA にて cyclin D1 の発現を低下させると、MKN7 と MKN74 のいずれにおいても相乗効果が消失した。

#### 【考察】

Cyclin D1 は細胞外増殖シグナルにより細胞周期 G1 期の早期に出現し、retinoblastoma protein と乖離させることで E2F1 を活性化させる。また E2F1 は DNA 合成に必須である葉酸の供給に関わる TYMS の上流に位置する転写制御因子であることから、細胞増殖に深く関与していることが知られている。一方 TYMS は 5-FU による DNA 合成阻害の標的酵素とされている。この度の研究にて Vnib は、5-FU との相乗効果を示した細胞株において選択的に cyclin D1 を低下させ、さらにその下流の E2F1 の活性化と TYMS を減少させることを証明した。すなわち、Vnib による cyclin D1 を契機とした影響は、E2F1 を介して TYMS を減少させることで 5-FU の DNA 合成阻害作用を増強させ、相乗効果が誘発されることが推察された。加えてこの効果は、cyclin D1 の発現を knock down することで速やかに消失したことから、Vnib と 5-FU の相互作用における cyclin D1 の重要性が示唆された。

今後の実地臨床において、悪性腫瘍と病理診断された生検組織での cyclin D1 の発現状況を確認することで、Vnib と 5-FU 系抗がん剤との併用療法に対する有効性が予測可能と思われる、新たな治療戦略に関わる極めて簡便かつ有意義な biomarker となり得ると考えられた。

#### 【結論】

Vnib との併用により、5-FU は一層強力な抗がん作用をもたらすことが明らかとなったが、そのメカニズムにおいて細胞内 cyclin D1 の発現状況は極めて重要な因子であり、期待しうる効果を予測する biomarker となる可能性が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

申請者 八幡 和憲は、胃癌細胞株に対する Vnib と 5-FU の相乗効果には cyclin D1 の高発現が関与し、Vnib による EGFR のシグナル伝達の抑制と G0/G1 期での細胞周期の停止、cyclin D1 の減少による E2F1, TYMS の低下から 5-FU の DNA 合成阻害作用の増強を証明し、Vnib と 5-FU の相乗効果における cyclin D1 の重要性を明らかにした。本研究の成果は、臨床腫瘍学ならびに消化器外科学の進歩に少なからず貢献するものと認められる。

---

#### [主論文公表誌]

Kazunori Yawata, Shinji Osada, Toshiyuki Tanahashi, Satoshi Matsui, Yoshiyuki Sasaki, Yoshihiro Tanaka, Naoki Okumura, Nobuhisa Matsuhashi, Takao Takahashi, Kazuya Yamaguchi, Kazuhiro Yoshida: The Significant Role of Cyclin D1 in the Synergistic Growth-inhibitory Effect of Combined Therapy of Vandetanib with 5-Fluorouracil for Gastric Cancer

Anticancer Research 36, 5215-5226 (2016). doi:10.21873/anticancer.11092