

氏名（本籍）	高橋 智子	（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第 1099 号	
学位授与日付	平成 31 年 3 月 25 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	Synergistic effects of vemurafenib and fingolimod (FTY720) in vemurafenib-resistant melanoma cell lines	
審査委員	（主査）教授	柴田 敏之
	（副査）教授	竹内 保
		教授 小澤 修

論文内容の要旨

悪性黒色腫は、切除および加療を行わなければ、早期に転移を生じ、治療が困難となる悪性度の高い腫瘍である。従来、転移を生じた場合、有効な化学療法は存在しなかったが、近年、免疫チェックポイント阻害薬や分子標的薬といった画期的な治療法が開発され、悪性黒色腫に対する治療は大きく変化している。皮膚原発の悪性黒色腫では約 50%に BRAF 遺伝子変異があり、そのキナーゼ活性が亢進されることにより、その細胞増殖が促進されている。BRAF 遺伝子変異を標的とした分子標的薬がベムラフェニブであり、現在、その変異を有する転移性悪性黒色腫患者に対して投与され、飛躍的な治療効果が得られている。しかし、この治療における大きな問題点は薬剤耐性の発生であり、その問題を解決するために様々な試みがなされている。

一方、フィンゴリモド (FTY720) は、癌細胞の生存や増殖に密接に関与するスフィンゴ脂質代謝経路で産生されるリゾリン脂質性メディエーターの 1 つであるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) の阻害作用を有する薬剤である。様々な癌腫において、種々の抗癌剤と FTY720 との併用効果について既に報告がある。また、申請者らは先行研究にて、抗癌剤シスプラチンと FTY720 の併用による抗癌剤抵抗性メラノーマ細胞のアポトーシスの増強効果を報告している。本研究においては、ベムラフェニブとの併用療法が細胞死誘導に及ぼす影響を調べるとともに、ベムラフェニブに耐性を有するメラノーマ細胞株の分子メカニズムの解明を試みた。

【対象と方法】

BRAF 遺伝子変異を有する 4 種のメラノーマ細胞株 (SK-Mel-28, A375, A2058, WM-115) を用いて実験を行った。

1. それぞれの細胞株にベムラフェニブを添加し、MTT assays を用いて薬剤感受性を検討した。
2. さらに、1 の実験により薬剤感受性が最も低かった株を用い、ベムラフェニブと FTY720 を併用、もしくは非併用時における細胞生存率の検討を MTT assays にて行い、さらにアポトーシス関連タンパク質である cleaved PARP のレベル、シグナル伝達系タンパク質のリン酸化量やその発現量を検討した。
3. 次に 1 の実験により薬剤感受性が最も高かった株を用い、高濃度 (10 μ M) のベムラフェニブを 10 カ月間添加し、ベムラフェニブに感受性の低い耐性株を作成した。
4. 3 により作成した耐性株におけるシグナル伝達系タンパク質のリン酸化量やその発現量を検討し、それらについて非耐性株と比較した。

【結果】

1. BRAF 遺伝子変異を有する 4 種のメラノーマ細胞株にベムラフェニブを添加した結果、最も薬剤感受性の高い株は SK-Me1-28 で、最も感受性の低い株は WM-115 であった。
2. ベムラフェニブに対する薬剤感受性の最も低かった株、WM-115 を用い、ベムラフェニブと FTY720 の併用、非併用時における細胞生存率の検討を行ったところ、非併用時と比較して併用時において、細胞生存率が低下していた。さらにアポトーシス関連タンパク質である cleaved PARP のレベルを検討したところ、非併用時と比較して併用時にそのレベルは有意に上昇していた。
3. MAP キナーゼ経路、PI3 キナーゼ経路、および、スフィンゴ脂質代謝経路に関わるタンパク質のリン酸化量と発現量を検討した。ERK に関して非併用時と比較したところ、FTY720 併用時にリン酸化量が有意に減少していたが、MEK に関しては有意な変化はみられなかった。
4. ベムラフェニブに対する薬剤感受性が最も高かった株、SK-Me1-28 で作製したベムラフェニブ耐性株を用い実験を行ったところ、ベムラフェニブと FTY720 併用時において、ベムラフェニブ単独使用時と比較し、cleaved PARP のレベルは有意に増加していた。また、ERK と Akt のリン酸化量は、併用時において有意に低下していた。

【考察】

本研究により、ベムラフェニブと FTY720 の併用は、細胞の増殖や生存シグナルにかかわる経路に影響して、ベムラフェニブに耐性を有するメラノーマ細胞の生存率を有意に低下させる可能性が示された。また、特に、FTY720 は、MAP キナーゼ経路における ERK を抑制したが、その経路の上流に存在する MEK のリン酸化には有意な変化はみられなかった。BRAF 遺伝子変異を有するメラノーマ細胞において、MEK を介さず、Ab1 と Arg を介して ERK に直接作用する経路の存在する可能性が報告されている。さらに、Ab1 と Arg は協同し、PTEN の機能を低下させ、Akt を活性化し、メラノーマ細胞の増殖、生存に働く可能性も示されている。以上の結果から、FTY720 がこれらの経路に影響を及ぼし、細胞の増殖および生存を抑制させる可能性が示唆された。

【結論】

ベムラフェニブと FTY720 の併用により、細胞の増殖と生存に関わるシグナル伝達経路を介し、細胞死を誘導する可能性が考えられた。この結果は、FTY720 が抗腫瘍作用を有し、さらに、細胞のアポトーシスを増強させることにより、ベムラフェニブに対する薬剤耐性を減少させる有効な薬剤になり得ることを示唆するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者 高橋 智子は、BRAF 遺伝子変異を有するメラノーマ細胞株において、ベムラフェニブとフィンゴリモドを併用することで、細胞増殖と生存に関わるシグナル伝達経路を介し、悪性黒色腫の細胞死を誘導する可能性を示した。本研究の成果は、抗腫瘍効果の増強とベムラフェニブに対する薬剤耐性を減少させる可能性が期待され、悪性黒色腫に対する治療の発展に、少なからず寄与するものと認められる。

[主論文公表誌]

Tomoko Takahashi, Naoko Abe, Hiroyuki Kanoh, Yoshiko Banno, Mariko Seishima: Synergistic effects of vemurafenib and fingolimod (FTY720) in vemurafenib-resistant melanoma cell lines.

Mol Med Rep 18: 5151-5158, doi: 10.3892/mmr.2018.9537. (2018)