

氏名・(本籍)	島津 和弘 (千葉県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第994号
学位授与の日付	平成31年3月21日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Curcumin analog, GO - Y078, overcomes resistance to tumor angiogenesis inhibitors (ディアリルペンタノイド型クルクミンアナログ GO-Y078 を用いた血管新生阻害剤に対する耐性の克服)
論文審査委員	(主査) 後藤 明輝 教授 (副査) 南谷 佳弘 教授 寺田 幸弘 教授

学位論文内容要旨

Curcumin analog, GO - Y078, overcomes resistance to tumor angiogenesis inhibitors

ディアリルペンタノイド型クルクミンアナログ GO -Y078 を用いた
血管新生阻害剤に対する耐性の克服

申請者氏名 島津 和弘

研究目的

血管新生阻害療法はがん薬物療法の有力な戦略の1つである。Bevacizumabなどのモノクローナル抗体薬やマルチキナーゼ阻害薬 Sunitinib や Sorafenib などの小分子化合物が VEGF 受容体(VEGFR)を標的として腫瘍血管新生を阻害する。しかし、VEGF シグナルの阻害のみでは腫瘍血管の完全な制御はできず、また、耐性も報告されている。我々は新たに合成されたディアリルペンタノイド型クルクミンアナログ (DCA) GO -Y078 に血管新生阻害活性を見出した。その作用は VEGF シグナルの抑制とは異なる。本研究では GO -Y078 の血管新生阻害活性の詳細を明らかにし、新たな血管新生阻害療法の確立を目指した。

研究方法

GO -Y078 はライセンスを譲渡した日本カーバイト工業(株)が合成した。血管新生阻害剤耐性のヒト臍帯静脈管内皮細胞(HUVEC-R(Ki2, 4, 5))は近畿大学西尾和人氏より供与された。fibroblast growth factor basic、VEGF、R3 - insulin - like growth factor を添加し、GO -Y078 存在下で HUVEC-R 細胞の増殖動態を調べ、Sunitinib、Sorafenib、VEGFR2 インヒビター Ki8751 と比較した。Wound healing assay で GO -Y078 による血管内皮細胞の移動抑制能を評価した。アクチンストレスファイバーに対する GO -Y078 の効果を Actin-stain 488 ファロイジンを用いて解析した。HUVEC を GO -Y078 (0.5 μ M) で処理し、CodeLink Human Whole Genome Bioarray を用いて total RNA の網羅的発現解析を行った。得られた GO -Y078 の標的候補遺伝子に対し LightCycler480 を用いた定量的 RT-PCR (qPCR) を行った。ファイブロンネクチン 1(FN1)の蛋白質発現を ELISA を用いて解析した。さらに *FN1* をノックダウンし、HUVEC-R の増殖動態を調べた。また、血管新生のモデルである *Xenopus* の受精卵を用いて GO -Y078 の血管新生阻害活性を評価した。さらに皮膚 T 細胞性リンパ腫 (CTCL) 細胞株 HH をヌードマウスに皮下移植し GO -Y078 をワセリンと混合し腫瘍に連日塗布した。2 週間後に腫瘍を摘出し、血管内皮細胞マーカー CD34 に対する抗体を用いて解析した。統計学的検定は Stat Mate III を用いて行った。

研究成果

GO -Y078 の HUVECKi2 に対する 50%増殖抑制濃度 (IC₅₀) は 1 μ M 未満であったが、Ki8751 の IC₅₀ は 10 μ M で、GO -Y078 は Ki8751、Sunitinib、Sorafenib に対して、それ

ぞれ 17.0、16.7、6.4 倍の増殖抑制効果を示した。Wound healing assay ではコントロール群の 12 時間後の平均移動距離 505 \pm 18 nm であったが、0.5 および 1.0 μ M GO -Y078 処理では、それぞれ 62.0 \pm 18 および 64.1 \pm 9 nm であった。また、24 時間後では処理群で内皮細胞が死滅した。ファロイジン染色では 1.0 μ M GO -Y078 処理でアクチンストレスファイバーの形成は抑制された。マイクロアレイ解析の結果、GO -Y078 処理で ACY1、FN1、GNPTG の発現量は対照群のそれぞれ 0.00001 - , 0.025 - , 0.025 倍と抑制され、逆に TIMM10B、ARP1、ACTR1B の発現量はそれぞれ 124 000 - , 10 200 - , 90 100 倍と上昇していた。しかし、qPCR 解析ではベースラインの ACY1、GNPTG、PCSK7、TIMM 10B および ACTR1B の GAPDH に対する相対的発現量はそれぞれ 0.00056, 0.000049, 0.0022, 0.0044, 0.011 と僅かだったが、FN1 は 1.39 と発現が確認された。また、GO -Y078 処理では TIMM 10B を除く 5 遺伝子で発現が低下した。FN1 の相対的発現量は 0.5 および 1.0 μ M GO -Y078 存在下で、それぞれ 0.39 \pm 0.02 および 0.31 \pm 0.03 となり、FN1 の発現は対照群の 69%に抑制された。さらに未処理群の培地中の可溶性 FN1 の発現量は細胞を播き込み後 24 時間で 2.5 時間後の 1.7 倍に達した。1.0 μ M GO -Y078 処理では可溶性 FN1 は 0.8 から 1.0 と抑制されたままであった。1.0 μ M の Sunitinib や Sorafenib では可溶性 FN1 の発現量は抑制されなかった。si-FN1B が FN1 mRNA の発現量を 50%に減少させたが、接着状態の HUVECKi2 は FN1 を既に発現しているため、増殖抑制効果はわずかであった。一方、浮遊状態の HUVECKi2 では si-FN1B が 24 時間後に発現量を非処理群の 20%まで抑制し、HUVECKi2 の増殖は対照群の 50%まで抑制されたが、si-FN1B の効果は 48 時間持続しなかった。一方、1.0 μ M GO -Y078 の培地中濃度は 48 時間に投与直後の 65.5%に減少したが、増殖抑制効果も持続した。*Xenopus* の受精卵の血管の発達異常は対照群で 18.7%に認められたが、1.0 μ M GO -Y078 では 50%に異常を認めた。CTCL の腫瘍皮下移植モデルでは GO -Y078 の軟膏療法で皮膚腫瘍のアポトーシスが観察され、腫瘍周囲の微小血管密度は対照群では 1.7 \pm 0.6 /mm² であったのに対し GO -Y078 処置群では 0.7 \pm 0.3 /mm² (P = 0.0002) と腫瘍血管新生を阻害した。また、可溶性を高めた DCA である GO -Y136 も GO -Y078 と同様に HUVEC-R の増殖やアクチンストレスファイバー形成を阻害した。

結論

本研究では、GO -Y078 が Ki8751、Sunitinib、Sorafenib などの VEGF 阻害剤に不応となった血管内皮細胞の耐性を解除できることを示した。さらに GO -Y078 の血管新生阻害メカニズムは VEGF シグナルの抑制ではなく、アクチンストレスファイバー形成阻害であることを見出した。血管内皮細胞の増殖シグナルは複数存在し、一つのシグナル系を抑制してもリダンダンシーによって回避されてしまう。一方、血管内皮細胞の移動の効果器であるアクチンストレスファイバーの形成を阻害すれば確実に腫瘍血管新生の制御が可能である。この可能性を本研究では明らかにし、GO -Y078 などの DCA にそれらの活性があることを示した。そして一つの標的分子が FN1 であることも示された。DCA はマイケル付加で様々な蛋白質と結合する。特定の状態にある細胞内で過剰に発現している蛋白質と結合し、それらを分解し、過剰発現している蛋白質のブレーキとして働く可能性が示唆されている。可溶性 DCA である GO -Y136 にも血管新生阻害活性があり、血液投与が可能であり、DCA によるがん薬物治療の可能性が示唆された。

学位(博士一甲) 論文審査結果の要旨

主査： 後藤 明輝

申請者： 島津 和弘

論文題名： Curcumin analog, GO-Y078, overcomes resistance to tumor angiogenesis inhibitors ディアリルペンタノイド型クルクミンアナログGO-Y078を用いた 血管新生阻害剤に対する耐性の克服

要旨

血管新生阻害療法はがん薬物療法の有力な戦略の1つであり、Bevacizumabなどのモノクローナル抗体薬やマルチキナーゼ阻害薬 Sunitinib や Sorafenib などの小分子化合物が VEGF 受容体(VEGFR)を標的として腫瘍血管新生を阻害する。しかし、VEGF シグナルの阻害のみでは腫瘍血管の完全な制御はできず、また、耐性も報告されている。申請者らは新たに合成されたディアリルペンタノイド型クルクミンアナログ(DCA) GO-Y078 に血管新生阻害活性を見出した。その作用は VEGF シグナルの抑制とは異なり、GO-Y078 が Ki8751、Sunitinib、Sorafenib などの VEGF 阻害剤に不応となった血管内皮細胞の耐性を解除できることを示した。さらに GO-Y078 の血管新生阻害メカニズムは VEGF シグナルの抑制ではなく、アクチンストレスファイバー形成阻害であることを見出すことや、標的分子のひとつが FN1 であることが示された。

1) 斬新さ

新たに合成されたディアリルペンタノイド型クルクミンアナログ(DCA) GO-Y078の血管新生抑制作用機序を明らかとした研究である。そもそも新規合成化合物を用いている点で前例が無く、斬新であることは言うまでもないが、血管新生阻害メカニズムの側面から考えた時も、VEGF経路以外に着目した点で本研究は斬新なものである。

2) 重要性

血管新生阻害療法はがん薬物療法の有力な戦略の1つであり VEGF 受容体(VEGFR)を標的とした腫瘍血管新生が現在のところ主力となっている。しかし、VEGF シグナルの阻害のみでは腫瘍血管の完全な制御はできず、また、耐性も報告されている。本研究の成果は VEGF シグナルの阻害を介さない血管新生阻害療法の開発によって現在の血管新生阻害療法の限界の克服につながりうるものであり、その重要性はきわめて高い。

3) 実験方法の正確性

ディアリルペンタノイド型クルクミンアナログ(DCA) GO-Y078の血管新生阻害機序解明のために用いられた細胞生物学的検討、薬効学的検討、遺伝子発現網羅的解析、免疫組織化学的検討、動物実験の手法などは、十分に確立した方法論にもとづいておこなわれたものと判断される。また、解析に用いられた統計手法も適切なものである。したがって、本研究の実験方法の正確性には疑問の余地がない。また、本研究の主体をなす細胞生物学的検討のために選択された血管新生阻害剤耐性のヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC-R(Ki2, 4, 5))も種々の実験に使用され、実績のあるものである。したがって、本研究の結果はより信頼性の高いものとなっている。

4) 表現の明瞭さ

本研究の研究目的、方法、実験結果、考察が簡潔、明瞭に記載されている。また、図表も質の高いものであり、その意味するところは明瞭である。

以上から、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。