

## 【13】

氏 名	田 <sup>た</sup> 中 <sup>なか</sup> 元 <sup>げん</sup> 樹 <sup>き</sup>
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第692号
学位授与の日付	平成29年3月7日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (消化器外科学)
学位論文題目	Dual pharmacological inhibition of glutathione and thioredoxin systems synergizes to kill colorectal carcinoma stem cells (グルタチオン、チオレドキシンの二重薬理阻害が大腸癌幹細胞にもたらす殺細胞作用の相乗効果)
論文審査委員	(主査) 教授 平 石 秀 幸 (副査) 教授 加 藤 広 行 教授 藤 田 朋 恵

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背 景】

癌の転移、再発、化学療法耐性の原因と言われている癌幹細胞（Cancer Stem Cells：CSCs）の治療戦略として、細胞障害性のある活性酸素種（Reactive Oxygen Species：ROS）の濃度を上昇させることが注目されている。BasalレベルのROSを処理するチオレドキシニン（TXN）システムと、急激なROSの上昇を緩衝する役割を担うグルタチオン（GSH）システムが存在し、両者はNADPHで駆動される。上記2系統に加え、NADPHのもととなるG6PDを産生するペントースリン酸回路（PPP）を含めた3系統で薬理阻害を行うことの抗癌効果について検討した。

#### 【目 的】

G6PDの阻害薬（CB83）、GSHシステムの構成酵素GSTP1阻害薬（piperlongumine）、TXNシステムの構成酵素TXNRD1阻害薬（auranofin）を使用し、大腸癌手術検体にて転写因子NRF2の活性化を調べた。またauranofin、piperlongumineを用いて二重薬理阻害を行い、指摘濃度の決定、相乗効果の有無、幹細胞マーカーの変化、腫瘍形成能を調べた。

#### 【対象と方法】

本研究は生命倫理委員会から承諾された研究であり、獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て指針に従って行った。

当科にて大腸癌と診断された患者の手術検体をヌードマウス皮下で継代・増殖させるモデルを確立し、72検体中3回以上繰り返し継代できる7検体（Cancer Tissue Originated Spheroids：CTOS）を

実験に使用した。正常組織のモデルとして、ヒト線維芽細胞をJCRB Cell Bankから購入して使用した。

まずGSHシステムの阻害薬を決定するためにRT-PCRを用いてGSTの17個あるアイソフォームをCTOSとヒト線維芽細胞で比べた。その結果CTOSで優位に上昇していた5つのアイソフォームのうちGSTP1を選択し、その阻害薬であるpiperlongumineをGSHシステム阻害薬として決定した。またTXNシステムの阻害薬はリウマチの治療薬としても知られるTXNRD1阻害薬のauranofinを、G6PDの阻害薬としてCB83を使用した。

3剤を各々使用し、各系統阻害時のNRF2の活性化を調べるためCTOSとヒト線維芽細胞においてNRF2の標的遺伝子をRT-PCRを用いて定量した。

次にauranofinとpiperlongumineの各薬剤阻害5日後の生存数をトリパンブルー染色して計算し半数阻害濃度 (half maximal (50%) inhibitory concentration : IC50) を算出した。また二重薬理阻害時の薬効をコンビネーションインデックス (combination index : CI) として計算し、CI<0.90を相乗 (synergy) 効果あり、0.9<CI<1.1を加算 (additive) 効果、CI>1.1を拮抗 (antagonistic) 効果とそれぞれ判定した。IC50とCIの算出にはCompuSynソフトを使用した。最後に二重薬理阻害7日後のCTOSと薬理阻害していないCTOSをそれぞれ同じマウスの左右に皮下注射し、腫瘍の形成の有無、腫瘍径、腫瘍内の幹細胞マーカーの変化を観察した。

統計はSPSSを用いてP<0.05を有意差ありとした。ROSはCellROX Deep Redを用いてフローサイトメトリーで計測した。

## 【結 果】

上記阻害薬3剤をそれぞれ単剤投与後24時間、48時間で上記遺伝子を観察し、auranofinとpiperlongumineがNRF2の標的遺伝子を誘導することを確認した。次にauranofinとpiperlongumineのIC50を調べ、2剤併用での指摘濃度を決定した。auranofinのIC50はCTOSより線維芽細胞の方が低かったが、piperlongumineの線維芽細胞でのIC50は、CTOSのそれより高く癌特異的殺細胞を示した。2剤併用によるTXNとGSHの二重阻害はCTOSで単剤に比べ強い殺細胞作用を示し、相乗効果を示した。これらから、線維芽細胞の半数以上が生存しCTOSの過半数を殺す至適濃度レンジ (auranofin : piperlongumine=0.25-0.5 : 2.5  $\mu$ M) を決定した。しかしながら、両薬剤を高濃度にしてもCTOSの少数の細胞集団は薬剤耐性を示した。耐性を示した細胞集団のhistone H2Aは薬剤濃度依存的にリン酸化を受けており、ROSの上昇によるゲノム損傷を受けていることが示唆された。

また二重薬理阻害を受けたCTOSは二重薬理阻害を受けていないCTOSと比べてCSCsの表面抗原マーカーであるCD44vの陽性率が低下していた。また、薬理阻害していないCTOSと二重薬理阻害したCTOSをそれぞれネズミに皮下注射し腫瘍生成したところ、二重薬理阻害後の方が腫瘍径が小さく、発生を遅らせることができた。

## 【考 察】

CSCsは細胞内のROSが上昇するとNRF2を活性化させGSH・TXNシステムを介してROSを中和させていると言われている。我々の実験でもTXN・GSHシステムの薬理阻害でROSが誘導され、NRF2

が活性化されていることを確認できた。また両システムを特定の濃度レンジで二重薬理阻害することにより癌特異的な殺細胞作用を示した。既にHarrisらはGSH阻害薬としてBSOを、TXN阻害薬としてauranofinを使用し二重薬理阻害した実験を報告している。しかしこの報告では正常細胞との比較がないこと、そして二重阻害による相乗効果は認められたものの、副作用が強く癌特異的殺細胞性が低いことが問題であった。そこで本実験ではヒト線維芽細胞を対照におき、癌特異的殺細胞性をより高くすることを目的とした。CTOSとヒト線維芽細胞で17種類あるGSTアイソフォームを調べ、CTOSで有意に上昇しているGSTP1を標的とし、より選択的にGSHシステムを阻害することによって副作用を減らせると考えた。そしてGSTP1阻害薬であるpiperlongumineを選択し実験を行った結果、癌特異的殺細胞性を高くすることができ、CSCsの陽性率を下げることもできた。

しかしながら、一定数の細胞集団はゲノム損傷を受けているにも関わらず生存した。

それらの細胞はCSCsの陽性率も低下しており、腫瘍形成能も低下していたが、ゲノム損傷以降の細胞死回避システムが起動する可能性があると考えられた。

## 【結 論】

GSTP1とTXNRDの二重薬理阻害により癌特異的殺細胞の相乗効果が得られた。

しかし生き残るある一定の細胞集団を認めた。これらは細胞障害をうけており、幹細胞の比率も低下しているが、再発する可能性を秘めている。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

### 【論文概要】

癌の転移、再発、抗癌剤耐性に関係があると言われている癌幹細胞 (cancer stem cells : CSCs) の治療戦略として、細胞障害性のある活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) の濃度を上昇させることが注目されている。ROSを制御する回路としてチオレドキシシン (TXN) システム、グルタチオン (GSH) システム、ペントースリン酸回路 (PPP) の3系統が相互作用している。まずGSHシステムの阻害薬を決定するためにGSTの17個のアイソフォームを、大腸癌手術検体幹細胞継代モデル (cancer tissue originated spheroids : CTOS) とヒト線維芽細胞とで比べた。その結果CTOSで優位に上昇していた5つのアイソフォームのうちGSTP1を選択し、その阻害薬であるpiperlongumineをGSHシステム阻害薬として決定した。PPPの阻害薬にCB83を、TXNシステムの阻害薬にauranofinを使用したところ、各経路を各々の薬剤で単独阻害した時のNRF2の活性化をCTOSにおいて確認した。TP53の標的遺伝子は活性化していなかった。次にauranofin、piperlongumineを用いて二重薬理阻害を行った。各薬剤の半数阻害濃度 (half maximal (50%) inhibitory concentration : IC50) を算出し、二重薬理阻害時の薬効をコンビネーションインデックス (combination index : CI) として計算し、相乗 (synergy) 効果を確認した。しかしながら、両薬剤を高濃度にしてもCTOSの少数の細胞集団は薬剤耐性を示した。それらのhistone H2Aは薬剤濃度依存的にリン酸化を受けており、ROSの上昇によるゲノム損傷を受けていることが示唆された。二重阻害後のCTOSのCSCsマーカーであるCD44v9を調べると、陽性率は下がっていた。最後に二重薬理阻害後のCTOSと薬理阻害していない

CTOSをそれぞれ同じマウスの左右に皮下注射し増殖を検討したところ、二重阻害後の方が、腫瘍重量、腫瘍径共に有意に抑制された。以上よりauranofinとpiperlongumineの二重阻害は大腸癌CTOSにおいて相乗効果を認めたが、ある一定数の細胞は二重阻害後も生存し、ゲノム損傷以降の細胞死回避システムが起動する可能性があることが示唆された。

#### **【研究方法の妥当性】**

本研究は生命倫理委員会から承諾された研究であり、獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て指針に従って行った。獨協医科大学第二外科にて大腸癌と診断された患者の手術検体をヌードマウス皮下で継代・増殖させるモデルを確立し、72検体中3回以上繰り返し継代できる7検体のCTOSを実験に使用した。また適切な対象群の設定と十分な例数を確保することによって、客観的な統計解析を行った。

#### **【研究結果の新奇性・独創性】**

大腸癌継代移植モデルを確立させて実験に用いることで、細胞株に比べてより実臨床に近いデータが得られる。TXN・GSHの協調作用は最近海外より報告があった(Harris et al., Cancer Cell, 2015)。背景の機序としてNRF2の関与が推定されるものの、証明はなされていない。また正常組織への毒性評価がないため、実臨床への応用可能性は不明である。本研究は正常組織への影響の少ない薬理戦略を組み、NRF2への関与を示し、CIを用いることによって相乗効果を定量的に評価した。以上より、以前著書らの研究グループにより提唱された治療戦略の、大腸がんへの応用可能性を実証した点において評価される。

#### **【結論の妥当性】**

申請論文では、適切な対象群の設定の下、確立された実験手法と統計解析を用いて、auranofinとpiperlongumineによる二重阻害の評価を行っている。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、また、生化学、薬理学、腫瘍免疫学など関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

#### **【当該分野における位置付け】**

申請論文では大腸癌CTOSを用いてauranofin、piperlongumineによる二重阻害を行うことによって相乗効果が得られることが証明できた。実際に二重阻害後のCTOSをマウスに植え、増殖させた場合、腫瘍重量と腫瘍径を抑制することができ、実臨床に応用した際には転移・再発を遅らせることが予想される。

#### **【申請者の研究能力】**

申請者は、臨床外科学や腫瘍免疫学の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌に掲載されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

#### **【学位授与の可否】**

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Cancer Medicine

5 : 2544-2557, 2016