

氏名 澤 田 誠 司

授与した学位 博士
専攻分野の名称 歯学

学位授与の番号 博 乙 第 号

学位授与の日付 平成 1 6 年 3 月 2 5 日

学位授与の要件 博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)

学位論文題名 Combination chemotherapy of paclitaxel and cisplatin induces apoptosis with Bcl-2 phosphorylation in a cisplatin-resistant human epidermoid carcinoma cell line(シスプラチン耐性扁平上皮癌細胞株における、パクリタキセル-シスプラチン併用化学療法が及ぼすBcl-2のリン酸化をともしアポトーシス誘導)

論文審査委員 教授 北山 滋雄 教授 菅原 利夫 教授 佐々木 朗

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

シスプラチン(CDDP)は、その優れた抗腫瘍効果から固形癌化学療法における重要な抗癌剤であり、口腔悪性腫瘍においても頻用されている。しかし、腫瘍のCDDPに対する耐性獲得により臨床的に得られる効果には限界がある。Taxane誘導体であるPaclitaxel (TXL)は、チューブリン重合を促進し、微小管を安定化させる微小管重合阻害剤として殺細胞効果を有し、G₂/M期に細胞周期を停止させ抗腫瘍効果を示す。子宮癌、非小細胞癌、乳癌などに有効性が示され、癌化学療法の中心となる抗癌剤として注目されている。また頭頸部癌においても、TXLの有効性が近年報告されてきている。しかしながら、癌化学療法の重要課題であるCDDP耐性の克服は、卵巢癌細胞株などにおいてCDDP耐性に対するCDDP-TXL併用療法が検討され、その相乗的、または拮抗的效果が報告されているが、その相互関係のメカニズムは明らかになっていないのが現状である。本研究では、CDDP耐性扁平上皮癌細胞株におけるCDDP-TXLの併用療法の有効性、及び相互関係のメカニズムよりCDDP耐性解除の可能性を検討することを目的とした。

【実験材料および方法】

本研究では、ヒト扁平上皮癌細胞株であるA431細胞株(A431/P)および、A431/Pより突然変異誘発法にて樹立したCDDP耐性を有するA431/CDDP2細胞株(A431/CDDP2)を用いた。

1. CDDP-TXL併用投与における殺細胞効果の検討

1) CDDP、TXLに対する用量依存曲線を各細胞株で作成し(CDDP 5時間、TXL24時間投与)、IC₅₀を算出した。

2) IC₅₀値をもとにCDDP-TXL併用投与スケジュールを作成、各細胞株を処理し、生細胞率₅₀を算出した。生細胞率の算出には、Cell Titer96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assayを使用した。

2. 併用投与による各細胞株の細胞周期の経時的検討

各細胞株に対し、抗癌剤(CDDP, TXL)を1.2)にて作成したCDDP-TXL併用投与スケジュールに沿って処理し、抗癌剤最終投与ののち、0, 12, 24時間培養し細胞を回収

する。回収した各細胞に対し、Propidium iodide (PI) 染色を行い、Flow Cytometry (EPICS®XL, Beckman CoulterTM)にて細胞周期を測定し、MALTI CYCLE Programme (Phenix Flow Systems, San Diego, Ca)を用いて解析した。

3. 併用投与による各細胞株に対するアポトーシス誘導の検討

1) 断片化DNAのELISAによる定量

1.2)にて作成したCDDP-TXL併用投与スケジュールに従って、抗癌剤を各細胞株に対して処理し、72時間培養後細胞を回収し、DNA Fragmentation Kit (Boehringer社)を用いて、ELISA法でアポトーシスによるDNA断片化量を定量した。

2) ウエスタンブロット法による活性化Caspase-3,リン酸化Bcl-2蛋白の検出

各細胞株に対して、CDDP-TXL併用投与スケジュールに沿って処理したのち24時間培養後、

蛋白を抽出した。15%のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行ないPVDF膜(Immobilon-P)に転写後、Caspase-3抗体(BD Biosciences x1000)、Bcl-2抗体(BD Biosciences x1000)、phospho-Bcl-2抗体(Cell Signaling Technology x1000)を反応させ、ECL System(Amersham Inc.)で化学発光させた。

【結果】

- 1 用量依存曲線より、A431/Pの IC_{50} は、CDDP 11.6 μ M, TXL 3.3nMであった。
これに対し、A431/CDDP2の IC_{50} は、CDDP 34.8 μ M, TXL 3.8nMであった。
- 2 1,の結果に基づいて各抗癌剤投与濃度、およびCDDP-TXL併用投与スケジュールを作成し、各細胞株を処理したところA431/PにおいてはCDDP先行投与で殺細胞効果が増強したが、CDDP耐性細胞株であるA431/CDDP2においては、TXL先行投与において殺細胞効果が増強した。
- 3 A431/Pでは、CDDP先行投与で G_1 , G_2 /M期の減少、TXL先行投与で G_2 /M期ブロックが認められた。一方A431/CDDP2においては、CDDP投与、CDDP先行投与では、24時間後細胞周期の大きな変化は認められず、TXL先行投与において強い G_2 /M期ブロックが認められた。
- 4 アポトーシスによるDNA断片化の定量では、A431/PではCDDP先行において断片化が増加する傾向がみられるのに対し、A431/CDDP2ではTXL先行で断片化が増加する傾向がみられた。
5. アポトーシス関連因子である活性化Caspase-3の発現は、A431/PにおいてはCDDP先行投与の方が強く認められ、A431/CDDP2においてはCDDP先行投与、TXL先行投与どちらも同様に発現した。アポトーシス抑制因子Bcl-2蛋白の発現は、A431/CDDP2のみに認められた。Bcl-2蛋白のリン酸化は、アポトーシス抑制機能を不活化するとされているが、A431/CDDP2においては、TXL投与時においてBcl-2のリン酸化が認められた。

【考察および結論】

CDDP耐性扁平上皮癌細胞株A431/CDDP2に対するTXL先行投与によるCDDP-TXL併用療法の有効性が認められた。この理由として、細胞周期の G_2 /M期ブロックによるアポトーシスの増強、またTXL投与によるアポトーシス抑制蛋白 Bcl-2のリン酸化がアポトーシス抑制機能を不活化し、その後のCDDP投与が、CDDP耐性株に対し有効に作用したことが推察された。以上のことより、Bcl-2発現が認められるCDDP耐性扁平上皮癌においては、TXL先行投与によるCDDP-TXL併用療法が、CDDP耐性解除に有効な投与方法となり得ることが示唆された。

論文審査結果の要旨

Cisplatin (以下CDDP) はその優れた抗腫瘍効果から固形癌化学療法における重要な抗癌剤の一つであり、口腔悪性腫瘍においても頻用されているが、腫瘍のCDDP に対する耐性獲得によりその効果には臨床的に限界がある。本研究はこのCDDP 耐性獲得扁平上皮癌に対し、新規抗癌剤であるPaclitaxel (以下TXL) との併用投与の抗腫瘍効果とそのメカニズムを、投与順序を考慮して検討したものである。扁平上皮癌細胞株A431 親株(A431/P) およびそのCDDP 耐性細胞株(A431/CDDP2) を用いてCDDP-TXL 併用効果を検討したところ、A431/P ではCDDP 先行投与で殺細胞効果が増強されたのに対し、A431/CDDP2 ではTXL 先行投与で殺細胞効果が増強された。耐性株におけるこの効果の機序について検討した結果、TXL 先行投与により (1) G_2/M 期ブロック、(2) アポトーシスによるDNA の断片化、(3) 活性化Caspase-3 発現の増強、(4) 耐性細胞株にのみ発現が認められるアポトーシス抑制因子Bcl-2 のリン酸化が認められた。以上の結果からTXL 先行投与によるBcl-2 のリン酸化がアポトーシス抑制機能を不活化し、その後のCDDP 投与がA431/CDDP2 に対し有効に作用したことが示唆された。これらの知見は、口腔腫瘍の化学療法に対し一つの方向性を示すとともに、CDDP 耐性扁平上皮癌の耐性解除機構の解明に重要な手がかりを与えるものであると考える。よって本申請論文は学位論文として価値があるものと認めた。