

氏名	竜門 省二
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第6157号
学位授与の日付	令和2年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Ammonium tetrathiomolybdate enhances the antitumor effect of cisplatin via the suppression of ATPase copper transporting beta in head and neck squamous cell carcinoma (テトラチオモリブデン酸アンモニウムは頭頸部扁平上皮癌において銅輸送体である ATP7B の抑制を介してシスプラチンの抗悪性腫瘍効果を高める)
論文審査委員	長塚 仁 教授      小橋 基 准教授      河津 俊幸 准教授

## 学位論文内容の要旨

### ・緒言

Cis-diamminedichloro-platinum (シスプラチン: CDDP) は頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) 治療に頻用される抗悪性腫瘍薬である。HNSCC 患者は通常、CDDP による化学療法治療に対して良好な反応を示すが、進行例では CDDP に対して耐性を示す症例が増加する。CDDP 耐性のメカニズムの一つに、CDDP の細胞内濃度の減少が関与するとされている。これは、CDDP の細胞内への取込み抑制や細胞外への排出増加によって誘導されると考えられている。銅トランスポーターである ATPase copper transporting beta (ATP7B) は癌細胞からの CDDP 排出に関連していることが明らかにされている。銅トランスポーターの発現は血清銅濃度と密接に関係するため、銅キレート剤であるテトラチオモリブデン酸アンモニウム (Ammonium tetrathiomolybdate: TM) を使用し、血清銅のキレート作用が HNSCC の ATP7B 発現抑制を介して CDDP の抗悪性腫瘍効果を増強することを明らかにした。

### ・方法と結果

Tissue microarray を使用し、HNSCC 組織の ATP7B 発現を評価した。HNSCC 組織では正常組織と比較して ATP7B が高発現していた。また、HNSCC 細胞株である HSC-2, HSC-3 および HSC-4 での ATP7B 発現を WB 法にて評価し、高発現を認めた。HSC-3 における ATP7B の発現に対する TM の効果を WB 法、蛍光免疫細胞染色により評価した。TM で処理をした HSC-3 では ATP7B の発現が減少した。TM が HSC-3 内の CDDP 濃度に与える影響を検討したところ、TM での処理により HSC-3 内の CDDP 濃度が有意に増加した。TM および CDDP の in vitro での HSC-3 の増殖抑制効果に関して検討を行った。TM は HSC-3 の増殖抑制効果を示さなかったが、CDDP 処理前に TM を添加することにより CDDP 単独投与と比較し HSC-3 の増殖能を有意に抑制した。さらに TM が CDDP のアポトーシス誘導能に与える影響を WB 法による caspase-3 の断片化、TUNEL 染色による DNA の断片化、および Annexin V-PI 染色によるフローサイトメトリーにより評価した。WB 法より、TM は Cleaved Caspase-3 を直接誘導しなかったが、CDDP による Cleaved Caspase-3 の誘導を増強した。また TUNEL 染色において、TM は CDDP が誘導する DNA 断片化を増強した。フローサイトメトリーより、TM は HSC-3 の初期アポトーシスを直接誘導しなかったが、CDDP が誘導す

る初期アポトーシスの効果を増強した。

CDDP と TM の併用効果を *in vivo* で検討するために HNSCC 骨破壊マウスモデルを作製した。5 週齢のオス BALB/c ノードマウスの右脛骨に HSC-3 ( $1 \times 10^5$  個) を移植し、腫瘍移植後 7 日後から TM (1 mg/kg) を週 5 回投与、低用量 CDDP (5 mg/kg) を単回投与した。腫瘍移植後 35 日後に屠殺し、脛骨標本作製した。HSC-3 によって誘導される癌骨破壊に対する CDDP と TM の併用効果は、軟 X 線写真およびマイクロ CT 画像で評価した。TM 単独投与は癌骨破壊の抑制傾向を認めたが、CDDP 単独投与と比較して CDDP と TM の併用投与は癌骨破壊を有意に抑制することが示された。作製した切片標本を Cleaved Caspase-3, Ki-67 および ATP7B にて免疫組織染色を行った。TM 単独投与は Cleaved Caspase-3 の発現を示さなかったが、CDDP と TM の併用投与は CDDP の単独投与と比較して Cleaved Caspase-3 の発現を増強させた。細胞増殖の指標である Ki-67 にて染色したところ、TM は Ki-67 の発現に影響を与えなかったが、CDDP と TM 併用投与は CDDP 単独投与と比較し Ki-67 の発現を有意に減少させた。ATP7B 発現に対する TM の効果を調べるために ATP7B 抗体で染色したところ、TM 投与は HSC-3 の ATP7B 発現を減少させた。

CDDP 耐性のヒト類上皮癌細胞株 (A431/CDDP-R) を使用して、CDDP 耐性細胞株に対する TM の効果を評価した。WB 法より、A431/CDDP-R 細胞は親株である A431 と比較して ATP7B を強く発現していた。さらに A431/CDDP-R 細胞において、CDDP 単独処理では Cleaved Caspase-3 の発現を誘導しなかったが、CDDP と TM を併用することで Cleaved Caspase-3 発現を誘導した。

#### ・考察

本研究は TM が HNSCC における ATP7B の発現抑制を介して CDDP の抗悪性腫瘍効果を増強する可能性を示した。また、CDDP 耐性は ATP7B を介した CDDP の細胞外排出に起因することを示し、TM の投与がそれを抑制する可能性を示した。これは CDDP 耐性を持つがん腫への新たなアプローチになることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

Cis-diamminedichloro-platinum (シスプラチン: CDDP) は頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) 治療に頻用される抗悪性腫瘍薬である。HNSCC 患者は通常, CDDP による化学療法治療に対して良好な反応を示すが, 進行例では CDDP に対して耐性を示す症例が増加する。CDDP 耐性のメカニズムの一つに, CDDP の細胞内濃度の減少が関与するとされている。これは, CDDP の細胞内への取込み抑制や細胞外への排出増加によって誘導されると考えられている。銅トランスポーターである ATPase copper transporting beta(ATP7B) は癌細胞からの CDDP 排出に関連していることが明らかにされている。銅トランスポーターの発現は血清銅濃度と密接に関係するため, 銅キレート剤であるテトラチオモリブデン酸アンモニウム(Ammonium tetrathiomolybdate : TM) を使用し, 血清銅のキレート作用が HNSCC の ATP7B 発現抑制を介して CDDP の抗悪性腫瘍効果を増強することを明らかにした。

Tissue microarray を使用し, HNSCC 組織の ATP7B 発現を評価した。HNSCC 組織では正常組織と比較して ATP7B が高発現していた。HSC-3 における ATP7B の発現に対する TM の効果を WB 法, 蛍光免疫細胞染色により評価し, TM 投与により ATP7B 発現の減少を確認した。また TM での前処理は, HSC-3 内の CDDP 濃度を有意に増加させ, CDDP と TM の併用投与は CDDP 単独投与と比較し HSC-3 の増殖能を有意に抑制した。TM が CDDP のアポトーシス誘導能に与える影響を WB 法による caspase-3 の断片化, TUNEL 染色による DNA の断片化, および Anexine V-PI 染色によるフローサイトメトリーにより評価を行った。CDDP と TM の併用投与は CDDP 単独投与と比較してアポトーシスの誘導を促進させた。CDDP と TM の併用効果を *in vivo* で検討するために HNSCC 骨破壊マウスモデルを作製した。5 週齢のオス BALB/c ヌードマウスの右脛骨に HSC-3 を移植し, 腫瘍移植後 7 日後から TM を週 5 回投与, CDDP を単回投与した。腫瘍移植後 35 日後に屠殺し, 脛骨標本を作製した。HSC-3 によって誘導される癌骨破壊に対する CDDP と TM の併用効果は X 線画像にて評価した。軟 X 線写真の癌骨破壊領域の範囲から, CDDP 単独投与と比較して CDDP と TM の併用投与は癌骨破壊を有意に抑制することが示された。作製した切片標本を Cleaved Caspase-3, Ki-67 および ATP7B にて免疫組織染色を行い, TM 投与による ATP7B 発現の減少, CDDP と TM の併用投与による Cleaved Caspase-3 発現の増加, Ki-67 発現の現象を確認した。CDDP 耐性のヒト類上皮癌細胞株 (A431/CDDP-R) を使用して, CDDP 耐性細胞株に対する TM の効果を評価した。WB 法より, A431 / CDDP-R 細胞は親株である A431 と比較して ATP7B を強く発現していた。さらに A431 / CDDP-R 細胞において, CDDP 単独処理では Cleaved Caspase-3 の発現を誘導しなかったが, CDDP と TM を併用することで Cleaved Caspase-3 発現を誘導した。

本研究は TM が HNSCC における ATP7B の発現抑制を介して CDDP の抗悪性腫瘍効果を増強する可能性を示した。また, CDDP 耐性は ATP7B を介した CDDP の細胞外排出に起因することを示し, TM の投与がそれを抑制する可能性を示した。これは CDDP 耐性を持つがん腫への新たなアプローチになることが示唆された。本論文はすでに *Oncology Reports* に受理 (掲載) されており, 国際的にも評価されている。

よって, 審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。