HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	シスプラチン耐性肺癌の治療標的としての免疫プロテアソーム解析［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	庄司, 哲明
Description	配架番号：2537
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14072号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78021
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Tetsuaki_Shoji_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　庄司哲明

学 位 論 文 題 名

シスプラチン耐性肺癌の治療標的としての免疫プロテアソーム解析

(Evaluating the immunoproteasome as a potential therapeutic target in cisplatin-resistant small and non-small cell lung cancer)

【背景と目的】　肺癌は癌関連死亡原因の第一位を占め、今後も世界的に増加が予想される未だ予後不良な疾患であり、より効果的な治療法の開発が求められる。

今日、肺癌に対し分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤などの新たな治療薬が実用化されてきたが有効な症例は限られる。分子標的治療や免疫チェックポイント阻害治療の対象とならない場合の一次治療、分子標的治療や免役チェックポイント阻害治療に抵抗性を示した場合の二次治療、あるいは分子標的薬や免役チェックポイント阻害薬との併用療法として、殺細胞性抗癌剤は今日でも幅広く使用される。プラチナ製剤は殺細胞性抗癌剤のキードラッグとされるが、数ヶ月程度の使用で耐性が誘導される。したがってプラチナ製剤への耐性の克服は重要な課題である。

シスプラチンは代表的なプラチナ製剤である。作用機序は DNA 傷害、酸化ストレス、小胞体ストレスを介したアポトーシス誘導などとされる。シスプラチン耐性機序は細胞内のグルタチオンなど抗酸化物質の発現亢進によるシスプラチンの無毒化や DNA 修復機構の活性化などがある。一方、シスプラチン耐性癌細胞は通常の癌細胞と異なり好気性代謝が優位となっており、抗酸化物質の発現亢進は好気性代謝による活性酸素種量の増加から細胞を保護するのにも役立っている。

ユビキチン・プロテアソーム系は真核細胞の代表的なタンパク質分解機構である。プロテアソームは多数のサブユニットからなる酵素複合体であり、ユビキチンにより標識されたタンパク質を分解する。構成型プロテアソームはプロテアーゼ活性を有する構成型サブユニット PSMB5/PSMB6/PSMB7 を持ち、細胞内のタンパク質の恒常性を維持している。インターフェロンγなどの炎症性サイトカインの刺激により構成型サブユニットが免疫プロテアソームサブユニット PSMB8/PSMB9/PSMB10 に変化した免疫プロテアソームが発現する。免疫プロテアソームは免疫反応を活性化し、ウイルス感染への応答や自己免疫性疾患の発症に関与する。一方で酸化ストレスや細胞増殖、代謝などによるストレスも免疫プロテアソームを誘導し、その際免疫プロテアソームは構成型プロテアソームと同様に細胞内の不要なタンパク質分解を行い恒常性維持に寄与する。

プロテアソーム阻害剤はプロテアソームのプロテアーゼ活性を阻害し、小胞体ストレス誘導や細胞周期停止を通じて抗腫瘍効果を発揮する。免疫プロテアソームサブユニットに選択性が高いカーフィルゾミブ（CFZ）や PR957 は免疫プロテアソーム阻害剤と呼ばれる。プロテアソーム阻害剤は多発性骨髄腫では既に臨床使用されているが、固形癌での臨床応用は進んでいない。肺癌に対する臨床試験では奏効割合は低いものの、プロテアソーム阻害剤が効果を示す症例が存在すること、プラチナ製剤への耐性獲得がプロテアソーム阻害剤への感受性に影響を与える可能性を示唆している。

そこで我々は、シスプラチン耐性肺癌細胞におけるプロテアソームサブユニット発現を評価し、

CFZ および PR957 の有効性を検討した。また、免疫プロテアソーム阻害剤の有効性を予測する因子を探索した。

【材料と方法】　3 種類の非小細胞肺癌細胞株（A549、H1299、H1975）および 2 種類の小細胞肺癌細胞株（SBC3、SBC5）を使用した。培養液に低濃度のシスプラチンを添加し 3 ヶ月間継代培養を続けシスプラチン耐性細胞を作成した。各細胞のシスプラチン、CFZ、PR957 への感受性を MTT 法を用いて評価した。細胞内活性酸素種量を 2’,7’-dichlorodihydrofluorescein diacetate を用いて評価した。プロテアソームサブユニットの発現を定量的逆転写 PCR 法、ウエスタンブロット法を用いて評価した。プロテアソームのキモトリプシン様プロテアーゼ活性を蛍光基質 Suc-LLVY-AMC を用いて評価した。CFZ のアポトーシス誘導および細胞周期に対する効果をフローサイトメトリー法で評価した。CFZ が分裂期細胞死（mitotic catastrophe）を誘導するかどうかを蛍光免疫染色法を用いて評価した。

【結果】　作成した 5 種類のシスプラチン耐性細胞は親細胞に対しシスプラチンの感受性が低下し、細胞内活性酸素種量が高く、また 5 種類中 4 種類で免疫プロテアソームサブユニット PSMB8、PSMB9 の発現が亢進していた。

H1299 および SBC3 ではシスプラチン耐性細胞は親細胞に比べ有意に CFZ および PR957 への感受性が亢進していたが、その他の細胞株ではシスプラチン耐性株で CFZ および PR957 への感受性が低下する傾向にあった。H1299、SBC3 ではシスプラチン耐性細胞は親細胞に対してキモトリプシン様活性が 2.9-3.5 倍に亢進していた。その他の細胞株ではシスプラチン耐性細胞は親細胞に対してキモトリプシン様活性が約 1.4 倍に亢進していた。

H1299 および SBC3 のシスプラチン耐性細胞では CFZ 投与によりアポトーシスが誘導された。H1299 および SBC3 では親細胞、シスプラチン耐性細胞ともに細胞周期の G2/M 期の割合が上昇した。その他のシスプラチン耐性細胞では CFZ による G2 期および M 期の増加は親細胞と比較して減弱したか変化がみられなかった。また H1299 のシスプラチン耐性株では CFZ 投与により分裂期細胞死が誘導された。

【考察】肺癌細胞株 5 株中 2 株においてシスプラチン耐性獲得後に免疫プロテアソーム阻害剤への感受性が亢進することを示した。これはプロテアソーム阻害剤が効果を示す肺癌症例が少数ではあるものの存在すること、プロテアソーム阻害剤が効果を示す肺癌症例がプラチナ製剤耐性例にみられることを示す臨床試験の結果を支持する結果と考える。

シスプラチン耐性肺癌細胞に対する免疫プロテアソーム阻害剤の抗腫瘍効果は、G2/M 期の増加および細胞分裂死を介したアポトーシス誘導によると考えられた。免疫プロテアソーム阻害剤の感受性が亢進した細胞株ではキモトリプシン様活性が大きく上昇しており、シスプラチン耐性獲得後にキモトリプシン様活性が大きく亢進することが免疫プロテアソーム阻害剤の有効性を予測するマーカーとなりうると考えられた。

【結論】非小細胞および小細胞肺癌において、シスプラチン耐性化に伴い免疫プロテアソームに対する感受性が亢進する細胞株が存在する。シスプラチン耐性獲得後にキモトリプシン様活性が大きく亢進している肺癌では免疫プロテアソーム阻害剤が効果を示す可能性があるため、症例を適切に選択できれば免疫プロテアソーム阻害剤はシスプラチン耐性肺癌に対する治療選択肢の一つとなりうる。