



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 [全文の要約]
Author(s)	庄司, 哲明
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2537 他
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/2115/78022
Type	doctoral thesis
File Information	Tetsuaki_Shoji_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

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 cell
and non-small cell lung cancer)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

庄 司 哲 明

学 位 論 文 (要約)

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)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

庄 司 哲 明

【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、分子標的治療や免疫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疫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り、その作用機序は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。癌細胞がシスプラチン耐性をおこす機序として、細胞内への移行の低下、細胞外への排出の増加、核酸の修復機構の強化、細胞内でのシスプラチンの無毒化、の4つが主に考えられている。また、シスプラチン耐性癌細胞は好気呼吸が活性化しており細胞内活性酸素種量が上昇しているが、細胞内抗酸化物質を増加させることより活性酸素種による酸化ストレスから細胞を保護している。

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共に細胞内外からのストレスで誘導された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免疫プロテアソーム阻害剤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化により免疫プロテアソームへの感受性が低下する傾向にあった。免疫プロテアソーム阻害剤への感受性が亢進した 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 ないし 3.5 倍に亢進していたが、その他の細胞株ではシスプラチン耐性細胞のキモトリプシン様活性の亢進は親細胞の約 1.4 程度の上昇にとどまった。

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。

今回作成したシスプラチン耐性肺癌細胞は親細胞に比較して免疫プロテアソームサブユニットの発現が高発現する傾向にあった。シスプラチン長期暴露にともなう細胞

へのストレスやシスプラチン耐性化に伴う細胞内活性酸素種量の増加による酸化ストレスが免疫プロテアソームサブユニット高発現の原因と推測する。シスプラチン耐性化後に免疫プロテアソーム阻害剤への感受性が亢進した細胞は親細胞株と比較して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。また、シスプラチン耐性化後に免疫プロテアソーム阻害剤への感受性が亢進した細胞株は細胞内の恒常性維持を発現亢進した免疫プロテアソームに強く依存する状態になっていると推測された。

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。

本知見の臨床応用を目指す上で、*In vivo* で作成したシスプラチン耐性細胞あるいはプラチナ製剤を含む化学療法に抵抗性の患者から採取された癌細胞においても免疫プロテアソームサブユニット PSMB8、PSMB9 の高発現、キモトリプシン様活性の亢進、免疫プロテアソーム阻害剤の感受性亢進が起こるかどうかの検討や、細胞株を増やしシスプラチン耐性化後の免疫プロテアソーム阻害剤の感受性亢進を予測するためのキモトリプシン様活性亢進のカットオフ値の検討が必要である。

【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。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。