

論文内容要旨

【研究背景・目的】膵臓癌は5年生存率が5%以下の極めて予後不良な癌である。その原因の一つとして膵臓癌は進行癌で発見される割合が多い事が指摘されているが、現状では早期発見が困難であるため、手術や化学療法による治療効果の改善は生存率の向上に必要不可欠である。癌切除が不能な患者が8割を超える膵臓癌において化学療法の重要性は大きいですが、第一選択薬として広く用いられてきた Gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine, dFdC) の膵臓癌における治療効果は他の癌に比べて小さく、dFdC 単剤投与を大きく上回る他の化学療法もない。従って、dFdC 治療効果の改善は膵臓癌治療全体の重要な課題の一つである。

核酸アナログである dFdC は、複数の核酸トランスポーターによって癌細胞内に取り込まれ、多段階でリン酸化を受け、三リン酸化体 (dFdCTP) となり、DNA 合成阻害を通じて薬効を示す。dFdC やその代謝物は複数の酵素によって不活化され、細胞外に排出されるため、それらの酵素やトランスポーターも細胞内の dFdCTP の量に影響を与える。また、内因性のヌクレオチド deoxycytidine triphosphate (dCTP) は、DNA への取り込み過程で dFdCTP と拮抗する。従って、dFdC や dCTP を含めた内因性核酸の代謝や輸送に関わる幾つもの酵素やトランスポーターの発現量や活性が dFdC 感受性に影響を与え、dFdC 感受性の低下 (dFdC 耐性) に関与する事が示唆されている。しかし、主要な核酸取り込みトランスポーターの一つである equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) のように、その発現量と dFdC 感受性が正の相関性を有する、負の相関性を有する、相関性は無いといった複数の矛盾した報告が存在する分子もある。この事から、dFdC の感受性決定因子を明らかにするためには、dFdC 感受性に影響を与え得る候補分子を1分子ずつ解析するのではなく、複数分子の発現や活性を一斉に解析する必要がある事が示唆された。

近年、液体クロマトグラフィー接続型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いたタンパク質定量法の確立によって、膵臓癌細胞における複数のタンパク質の一斉発現量解析が可能になった。さらに、dFdC 関連の核酸代謝物及び内因性の核酸化合物の一斉定量技術の確立によって、癌細胞内外の各核酸化合物量の変化から、複数の細胞における各酵素やトランスポーターのおおよその活性変化を予測する事が可能になった。これらの定量的標的プロテオミクス及びメタボロミクスの技術を駆使する事で、複雑な代謝・輸送系の中から、dFdC 感受性決定因子を効率良く特定する事が可能であると考えられた。また、複数の膵臓癌サンプルにおいて共通の dFdC 感受性決定因子が存在すれば、dFdC の治療効果を判定する良好な dFdC 感受性予測マーカーになると考えられた。従って、本研究では、これら2つの手法をベースにして、膵臓癌細胞あるいは膵臓癌患者における複数のタンパク質の発現や活性を解析し、dFdC 感受性決定因子を明らかにする事を目的とし、さらには dFdC 感受性の低下を改善する方法を見出す事を目標とした。

【方法】dFdC 獲得耐性モデル細胞としては、膵臓癌細胞株 PK9 に対して 10,000 倍以上の耐性を獲得した RPK9 細胞を用いた。膵臓癌細胞株及び癌組織における dFdC 関連酵素・トランスポータータンパク質の発現量解析及び膵臓癌細胞株における dFdC 関連核酸化合物の定量解析は液体クロマトグラフィー接

続型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて行った。

【結果・考察】

Gemcitabine (dFdC) 獲得耐性モデルにおける感受性決定因子の解明

膵臓癌細胞株 PK9 及び dFdC 獲得耐性モデル細胞 RPK9 に dFdC を 10min から 24hr 曝露させ、細胞内外の dFdC 及び内因性核酸代謝物の経時的な変化を解析した。その結果、RPK9 細胞内の活性化体である dFdCTP は、PK9 細胞よりも 300 倍以上低下し、培地中の不活化代謝物 dFdU の量が有意に増加していた。従って、RPK9 細胞における dFdC の不活化代謝の亢進が dFdC 活性化の減少をもたらしている事が示唆された事から、dFdC から dFdU への代謝に関わる cytidine deaminase (CDA) の特異的阻害剤である tetrahydrouridine (THU) を添加した。THU の添加で RPK9 細胞内外の dFdU はほぼ消失したが、細胞内の dFdCTP 及び dFdC 感受性に変化は認められなかった。培地中からの dFdC の消失速度に 2 細胞間で有意差は無かった。dFdC の薬効の妨げとなる細胞内の dCTP は、RPK9 細胞の方が PK9 細胞よりも 2.1 倍有意に高かった。一方、2 細胞間で 25 種の酵素及びトランスポータータンパク質の発現量を比較したところ、dFdC の取り込み、リン酸化、不活化及び dCTP の合成に関わる計 7 種のタンパク質について、有意な変動が認められた。しかし、その中でも RPK9 細胞において、dFdC の一リン酸化酵素 deoxycytidine kinase (dCK) の発現量が 48 倍以上低下し、酵素活性は 18 倍以上低下していた。さらに、PK9 細胞における dCK の定量値をもとにして、RPK9 の細胞抽出液に PK9 細胞に発現する dCK と等量の dCK の精製タンパク質を添加したところ、dFdC のリン酸化が PK9 の 81.6% まで回復した。これらの結果から、dCK のタンパク質発現量と活性の低下に伴う細胞内の dFdCTP 量の低下が、RPK9 細胞における dFdC 感受性低下の主な原因である事が示唆された。また、本アプローチは、複数のタンパク質発現量と活性の数値化によって、薬剤感受性に決定的な影響を与える分子・プロセスをより効率良く解明する事を可能にした。

初発性膵臓癌患者及び膵臓癌細胞株における Gemcitabine (dFdC) 感受性予測指標の解明

異なる膵臓癌患者から樹立された 5 つの膵臓癌細胞株 PK9, CFPac-1, PK1, SUIT-2, AsPC-1 における dFdC 関連酵素及びトランスポーターのタンパク質発現量解析を行った。定量した 25 分子のうち 15 種のタンパク質が何れかのサンプルで検出され、全てのサンプルで定量値が得られた 9 分子について、各分子のタンパク質発現量と dFdC 感受性の指標である IC_{50} との相関性を調べた。結果、dFdC 取り込みトランスポーターの ENT1, dFdC のリン酸化に関わる dCK 及び UMP-CMP kinase, dFdC の一リン酸化体 (dFdCMP) の脱リン酸化に関与する cN-III の 4 分子について、そのタンパク質発現量と $1/IC_{50}$ の間に有意な相関性が認められた。

さらに、10 人の初発性膵臓癌患者の癌組織における酵素・トランスポーターのタンパク質発現量解析を行い、術後生存期間との相関性を調べた。全ての患者が術前には dFdC を投与されておらず、術後の化学療法は dFdC のみで行われている。膵臓癌細胞株で、タンパク質発現量と dFdC 感受性指標との間に有意な相関が認められた 4 分子を含めて、9 種の酵素及びトランスポータータンパク質の発現が認めら

れた。さらに、dFdC 感受性指標との相関性を解析したところ、dCK 及び dCTP の合成に関与している cytidine triphosphate synthetase 1 (CTPS1) の 2 分子について、タンパク質発現量と術後生存期間との間に有意な相関性が認められた。dCK の相関係数は、細胞株と組織の両方で、ともに最も高い値を示していた。このことから、dCK はより多くのサンプルにおいて dFdC 感受性を予測するための最も有効な指標になる可能性が示された。また、dCK は dFdC 活性化の律速酵素であり、その発現量の変化が dFdC 感受性に影響を与える事が知られていることから、dCK は、より多くの膵臓癌サンプルに共通した dFdC 感受性決定因子である可能性がある。

Gemcitabine (dFdC) 感受性増強化合物の探索

dCK の発現量や活性の増加は、より多くの膵臓癌患者における dFdC 感受性の増大に繋がる可能性があった。しかし、これまでの報告から、既存の DNA 障害を介した dCK の発現や活性の誘導機構では、膵臓癌組織において期待された程の dFdC 感受性増強効果が得られない可能性が考えられたため、DNA 障害を介さないと考えられる新たな経路を介した dCK 誘導剤の探索に取り組んだ。Multidrug resistance protein 1 (MDR1) あるいは multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) の高発現細胞において、dCK の発現誘導が確認されたという報告から、MDR1 あるいは MRP1 の誘導剤の中から dCK のタンパク質発現量と dFdC 感受性の増加を引き起こす化合物をスクリーニングしたところ、副腎皮質ホルモンの一種である cortisone を添加した膵臓癌細胞株 AsPC-1 細胞では、control と比較して、dCK のタンパク質発現量が 2.0 倍有意に増加し、dFdC による細胞毒性が 27.1% 増大した。本化合物の臨床応用にはさらなる研究が必要であるが、dCK 誘導機構の解明によって、より多くの膵臓癌患者における dFdC 治療効果の増大につながる可能性がある。

【結論及び展望】本研究から、一部の dFdC 獲得耐性モデル細胞において dCK のタンパク質発現量の変化が dFdC 感受性の決定要因になっている事が示唆された。また、dFdC 感受性が異なる複数の膵臓癌細胞株あるいは膵臓癌患者組織における dCK のタンパク質発現量が dFdC 感受性を予測する有用なマーカーになり、dFdC 感受性の決定要因になっている可能性が示された。本結論を導くために用いた定量的プロテオミクスやメタボロミクスの手法は他の抗癌剤やサンプルにも応用可能な技術である。従って、dFdC だけでなく、他の抗癌剤で治療を行う膵臓癌患者の術後生存期間も正確に予測できれば、適切な抗癌剤の選択を通して、より効果的な膵臓癌化学療法の実現に繋がる事が期待される。

審査結果の要旨

早期発見が困難で進行癌として発見される率が高い膵臓癌では、抗癌剤治療効果の改善が生存率の向上に必要不可欠である。第一選択薬である Gemcitabine (dFdC) の治療効果を低下させる要因として、dFdC や内因性核酸の代謝や輸送に関わる多数の分子の寄与が示唆されているが、その機構の複雑さ故に感受性決定因子を特定する事は困難であった。従って本研究は、高速液体クロマトグラフィー接続型タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて複数の膵臓癌細胞株や癌組織中の複数のタンパク質や核酸代謝物の量的変動を解析する事で、dFdC 感受性決定因子を明らかにすることを目的とした。

膵臓癌細胞株 PK9 よりも dFdC に対して 10,000 倍以上耐性を獲得した RPK9 細胞では、dFdC 取り込み 24 hr 後、活性本体である細胞内リン酸化 dFdC 量が 300 倍以上低下していた。また、2 細胞間で dFdC 感受性に影響し得る 7 種のタンパク質の有意な発現変動が認められたが、中でも dFdC ーリン酸化酵素 deoxycytidine kinase (dCK) が RPK9 細胞で 48 倍以上低下していた。RPK9 細胞では dFdC 不活化の亢進も認められたが、阻害剤によって dFdC 不活化を抑制しても、細胞内のリン酸化 dFdC 量や dFdC 感受性に変化は認められなかった。細胞抽出液を用いた酵素活性測定でも、RPK9 では dCK 活性が PK9 よりも 18 分の 1 以下に低下しており、そこに PK9 細胞に発現する dCK と等量の dCK 精製タンパク質を添加すると dFdC のリン酸化が PK9 の 81.6% まで回復した事から、dCK 発現量の低下に伴うリン酸化の減少が RPK9 における dFdC 感受性低下の決定要因になっている事が明らかになった。次に、PK9 を含む 5 種の膵臓癌細胞株及び dFdC のみで治療を行った 10 人の膵臓癌患者癌組織における複数の酵素・トランスポータータンパク質の発現量解析を行ったところ、dCK のタンパク質発現量は、細胞株における dFdC 感受性の指標である IC_{50} 及び癌患者の術後生存率の両方と有意に相関する事が示された。また、dCK 発現量と術後生存期間との相関性は、他の分子に比べて著しく高く ($r = 0.899$)、dCK は膵臓癌患者における dFdC 感受性の決定因子になっていることが示唆され、dFdC 感受性予測の有用な指標になることが示された。さらに、dCK の発現量増加を介して dFdC 感受性を増大させる化合物のスクリーニングを行ったところ、ステロイドホルモンの一種であるコルチゾンが膵臓癌細胞株の一種 AsPC-1 における dCK のタンパク質発現量を有意に増加させ、dFdC 感受性を増加させる事が示された。

以上、定量的プロテオミクスとメタボロミクスの手法に基づき、膵臓癌における dFdC のリン酸化酵素 dCK のタンパク質発現量の違いが Gemcitabine 感受性の個人差の主な原因であることを明らかにした本研究成果は、高く評価できる。

よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。