

学位論文審査の結果の要旨

平成 28 年 1 月 7 日

審査委員	主査	上野 正樹 印		
	副主査	田宮 隆 印		
	副主査	星川 広史 印		
願出者	専攻	機能構築医学	部門	医用工学
	学籍番号	12D708	氏名	堀江 亮佑
論文題目	Apoptosis and anti-tumor effects induced by the combination of an mTOR inhibitor and an autophagy inhibitor in human osteosarcoma MG63 cells			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格 (該当するものを○で囲むこと。)			

(論文要旨)

【緒言】
 オートファジーが悪性腫瘍細胞の self defense mechanism としてその進展に働くのか、それとも細胞死のメカニズムとしてその抑制に働くのかという議論には未だ決着がつかない。しかし最近では mTOR 抑制剤によるオートファジーの誘導は、腫瘍細胞の防御反応として細胞自ら誘導しており、このオートファジーを抑制することで、アポトーシスが誘導され、強い抗腫瘍効果を発揮するとの報告が散見されている。本研究では抗癌剤などへの暴露に対する防御反応としてオートファジーが誘導され、オートファジー誘導阻害により抗腫瘍効果を増強できるのではないかと考え、ヒト骨肉腫細胞株において検討した。

【方法】
 使用細胞株は骨肉腫細胞株として MG63 細胞を用いた。使用薬剤としては、選択的 mTOR 抑制薬として Rapamycin を、オートファジー抑制薬として Spautin-1 (Specific and potent autophagy inhibitor-1) を使用し、選択的 mTOR 抑制薬単独とオートファジー抑制薬併用による抗腫瘍効果の評価を MTS assay にて行った。次いで Western blot により、mTOR 経路の蛋白発現と、リン酸化の抑制を評価した。オートファジー及びアポトーシスは Western blot 及び形態学的にも評価した。in vivo ではマウスの背部皮下に MG63 細胞を植え、2 週間後に腫瘍形成を確認後、Rapamycin を 8mg/kg、Spautin-1 を 40mg/kg、週 5 回 4 週間にわたり腹腔内投与し、1 週間ごとに腫瘍の体積を測定した。

【結果】
 MTS assay では mTOR 抑制薬単独による抗腫瘍効果が確認され、オートファジー抑制薬を併用することで、抗腫瘍効果が増強した。Western blot では、Rapamycin の投与により用量依存性に mTOR 経路のリン酸化抑制と、オートファジーを示す LC-3 II の発現増加および p62/SQSTM1 の発現低下を認めた。また、Rapamycin および Spautin-1 の併用によりアポトーシスを示す cleaved PARP の発現の増強を認めた。形態学的評価でも Rapamycin によるオートファジーと Spautin-1 併用によるアポトーシスの増強を確認した。in vivo では control 群・Spautin-1 単独投

与群と比較して、Rapamycin 単独投与群・Rapamycin+Spautin-1 投与群では腫瘍体積は有意に小さく、著明な抗腫瘍効果を認めた。

【考察】

本研究では、ヒト骨肉腫細胞株において、RapamycinがmTOR経路のリン酸化を抑制することでオートファジーを誘導し、さらにラパマイシンによるアポトーシスがSpautin-1により増強されることを確認した。この結果から、mTOR経路が、細胞の生存・増殖に重要な役割を果たしており、そのmTOR経路を抑制することで、腫瘍細胞の防御反応としてオートファジーが誘導され、これを抑制することでアポトーシスが誘導される結果、強い抗腫瘍効果が得られると考えられた。骨肉腫の化学療法において、今後はオートファジーの抑制を追加することで抗腫瘍効果が高まり、これによる治療成績の向上が期待される。オートファジーの抑制が新たな治療戦略の一手となる可能性がある。

本研究に関する学位論文審査委員会は平成28年1月7日に行われた。

本研究は骨肉腫細胞株に対してmTOR阻害薬とオートファジー阻害薬との併用による抗腫瘍効果の有効性を示唆したもので、結果に対する十分な考察もなされている。本研究で得られた成果は骨肉腫に対する新たな分子標的薬の確立に関して意義があり、学術的価値が高い。委員会の合議により、本論文は博士（医学）の学位論文に十分値するものと判定した。

審査においては、

1. Rapamycin単独とSpautin-1との併用でMTSassayと形態学的評価に差が生じた理由。
2. Autophagyを阻害することが正常細胞へ与える影響。
3. Spautin-1単独で抗腫瘍効果が認められなかった理由。
4. 細胞株によって結果が違ふことがあるが、他のcell lineでも検討を行ったかどうか。
5. 2剤併用によりapoptosisが生じたがその経路について。
6. Rapamycinの濃度を上げることでapoptosisは増強するかどうか。
7. 今後臨床応用するためにどういった展開を考えているか。
8. Annexin VとPI染色で染色される細胞に生じている現象は何か。
9. in vivoにおいてbody weightだけでside effectがないと言い切れるかどうか。
10. HE染色などの組織学的検討を行ったか。
11. in vivoにおける生存曲線はどうか。
12. 本研究に使用した薬剤は骨肉腫以外にどのような疾患に有効と考えられるか。

などについて多数の質問が行われた。申請者はいずれにも明確に応答し、医学博士の学位授与に値する十分な見識と能力を有することが認められた。

掲 載 誌 名	International Journal of Oncology		第48巻, 第1号
(公表予定) 掲 載 年 月	2015年11月	出版社(等)名	Spandidos Publications

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。