

氏名（本籍）	鈴木健之（茨城県）			
学位の種類	博士（医学）			
学位記番号	博甲第 6665 号			
学位授与年月	平成 25 年 6 月 30 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	Celecoxib enhances the radiosensitivity of hypoxic glioblastoma cells through endoplasmic reticulum stress (セレコキシブは、小胞体ストレスを負荷して低酸素下の膠芽腫細胞の放射線感受性を上げる)			
主査	筑波大学教授	医学博士	松村 明	
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	奥村敏之	
副査	筑波大学講師	博士（医学）	山本哲哉	
副査	筑波大学助教	博士（理学）	水野智亮	

論文の内容の要旨

目的: 膠芽腫は中枢神経系に生ずる最も悪性な腫瘍である。手術、放射線療法＋とテモゾロマイドによる標準的治療でも生存期間中央値は約 1 年と短い。膠芽腫の放射線抵抗性と腫瘍組織中の低酸素領域の関与が知られており、低酸素領域の腫瘍細胞に対する治療効果を上げる事は治療予後改善にとって極めて重要な課題である。

最近、テモゾロマイドと選択的 COX-2 阻害剤セレコキシブ（以下 CCB）を併用した化学放射線療法が膠芽腫患者に有効であるという報告がされた。COX-2 は膠芽腫で高発現しており、予後不良に関わることも知られている分子である。しかし、CCB が膠芽腫細胞の放射線感受性を増感する可能性が示唆されるものの、そのメカニズムは明らかでない。また、CCB は COX-2 阻害とは異なるメカニズムで小胞体（ER）ストレスを惹起することも報告されている。そこで本研究では常酸素状態と低酸素状態で CCB の放射線増感作用を *in vitro* 実験で解析することを目的とした。

対象と方法: 対象として膠芽腫培養細胞株 U87MG、U251MG、GL261 を用いた。CCB は、CCK-8 による毒性試験にて添加する濃度を決定した。ガンマ線照射には ¹³⁷Cs ガンマセルを使用した。低酸素条件は、アネロパックを用いて酸素濃度 0.1%以下に維持した。これらの膠芽腫細胞を常酸素状態あるいは低酸素状態で培養し、CCB 単剤投与群、ガンマ線照射単独群、併用投与群を比較した。

放射線増感効果の確認として、コロニー生存分析、細胞増殖分析を行い、CCB の有無で、2Gy の単回照射での線量生存率（SF2）、10%の生存率を生じる線量（D10）にて評価した。続いて、フロー

サイトメトリーで Annexin V によるアポトーシスとアクリジンオレンジ染色によるオートファジーの検出、PI 染色による細胞周期分析を行い、細胞死関連タンパクである Caspase-3 と LC3, ER ストレス関連タンパクの GRP78 と CHOP の発現をウェスタンブロット法により解析した。さらに、オートファジーについては蛍光試薬 Premo™ または CytoID™ を用いてオートファゴソームの検出を行った。

結果: D10 にて評価したところ U87MG、U251MG、GL261 の細胞株で、CCB は、常酸素状態および低酸素状態で放射線感受性を有意に上げた。また、細胞周期分析では、すべての細胞株で酸素の有無に依らず、併用処理により有意な増殖遅延が確認された。そして、細胞死解析では、アポトーシスよりもオートファジーの有意な増加を確認した。ウェスタンブロットの解析からは、今回用いた CCB 濃度 (30-50 \cdot M) では COX-2 阻害は起きず、ER ストレスの指標である GRP78、CHOP の発現亢進に伴い、オートファジーの指標である LC3 の発現が上昇したので、ER ストレスによりオートファジーが誘導される可能性が示唆された。また、この現象は低酸素下の膠芽腫細胞で強く見られた。

考察: 金子らは抗癌剤 CPT-11 と CCB の併用により、マウス移植神経芽細胞腫の成長を有意に抑制できることを示したが、そのメカニズムは COX-2 阻害よりも ER ストレスを負荷させた可能性が高い事を報告した。膠芽腫に対する今回の放射線や低酸素環境負荷の実験結果からも、CCB は ER ストレスを介して腫瘍細胞の放射線感受性を上げることが示唆され、先行研究の結果と矛盾がないことが示された。今回の結果では、CCB とガンマ線の併用によって CHOP の発現亢進が認められたにもかかわらず、Caspase-3 の発現とアポトーシスの増加は認められなかった。その代わりに、LC3 の発現亢進とオートファジーが誘導されることが明らかとなった。また、ER ストレスの誘導は細胞周期を停止させ、膠芽腫細胞の放射線感受性を上げている可能性も示唆された。

結論: 本研究では、CCB とガンマ線の併用が、常酸素下と低酸素下の膠芽腫細胞に対し増殖抑制効果を示し、オートファジーを引き起こすことを明らかにした。また、そのメカニズムは膠芽腫細胞に対する強い ER ストレスの負荷である可能性が示唆された。これらの結果は、膠芽腫患者の治療予後の改善に今後貢献できる可能性が高い。

審査の結果の要旨

批評

今回の研究において選択的 COX-2 阻害剤セレコキシブが膠芽腫細胞の常酸素、低酸素状態の放射線照射におよぼすメカニズムについて詳細に検討し、これまで言われていたアポトーシスではなく、ER ストレス負荷によるオートファジーを引き起こすことを明らかにした。これは、今後の放射線治療成績の改善に貢献する可能性のある新知見であり、その学術的意義は高い。

平成 25 年 5 月 1 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。