【296】

氏　名（本籍）	本　間　晋　介（茨 城 県） （ほん　ま　しん　すけ）
学 位 の 種 類	博　　士（医　　学）
学 位 記 番 号	博　甲　第　5110　号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 25 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	**Transcription factor Nrf2 enhances proliferation and resistance to anti-cancer cisplatin in human lung cancer cells** （転写因子 Nrf2 はヒト肺癌細胞の増殖と抗癌剤シスプラチンへの耐性を促進する）

主　査	筑波大学教授	医学博士	浦　山　　修
副　査	筑波大学准教授	医学博士	鬼　塚　正　孝
副　査	筑波大学准教授	博士（医学）	森　下　由紀雄
副　査	筑波大学講師	博士（医学）	酒　井　光　昭

論 文 の 内 容 の 要 旨

（目的）

転写因子 Nrf2 の発現が肺癌細胞の高増殖能および抗癌剤耐性の原因の一つと考えられた。そこで Nrf2 が肺癌治療の分子標的になりうるとの仮説のもとに，肺癌細胞株を用いて Nrf2 の発現量と癌細胞の増殖能および抗癌剤のシスプラチン耐性との関係について分子細胞生物学的検討を行った。

（対象と方法）

非小細胞癌の 3 種類の肺癌細胞株（A-549，LC-AI，NCI-H292，それぞれ Nrf2 の発現量が異なる）を対象に，RNA Interference（Nrf2-siRNA 使用，対照として NC-siRNA）の手法により Nrf2 の発現が選択的に抑制されることを確認後，その抑制がシスプラチン感受性や増殖能に与える影響を Cell Counting Kit-8 を用いてモニタリング解析を行った。次に，A-549 細胞（Nrf2 の抑制によりシスプラチン感受性が改善，また増殖が最も抑制された株）について，シスプラチン耐性関連遺伝子の発現量の変化をリアルタイム PCR で解析した。また，Nrf2 の抑制による細胞内グルタチオン濃度変化を調べ，シスプラチン投与後の DNA クロスリンク形成率を Ethidium bromide による蛍光法，アポトーシス変化を Annexin V-FITC と Propidium iodide（PI）の二重染色法，細胞周期を PI 単染色とフローサイトメトリで解析した。Nrf2 の抑制により，G0/G1 期にとどまる細胞の比率が増加したことから，G1 期制御タンパクであるリン酸化 Rb と p21 タシパクについてそれぞれの特異抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。

（結果）

RNA Interference の手法を用いて，Nrf2 の発現を選択的に抑制したところ，A-549，LC-AI，NCI-H292 のいずれの細胞でも増殖の抑制が見られ，Nrf2 を高発現する腺癌由来の A-549 細胞ではシスプラチン感受性の改善が認められた。Nrf2 抑制の A-549 細胞において，グルタチオン代謝関連酵素，薬剤排推ポンプ，II 型解毒酵素などの遺伝子発現の低下，一方メタロチオネインの遺伝子発現の増加が認められた。また，Nrf2 の抑制により，細胞内総グルタチオン濃度の低下，シスプラチン投与後に形成される Interstrand DNA クロスリンクの有意な増加とアポトーシスに陥った細胞の比率の増加が見られた。さらに，Nrf2 による細胞増

殖抑制に関する細胞周期の検討では，G0/G1 期への集積が認められたが，リン酸化 Rb の減少と p21 の増加が伴っていた。

（考察）

臨床検体においても，Nrf2-Keap1 システムに関して Keap1 の変異や低発現に伴う Nrf2 の過剰発現の見られることが報告されている。A-549 細胞は Nrf2 抑制タンパクである Keap1 が変異によって失活した結果 Nrf2 が過剰発現した細胞であるが，その Nrf2 の選択的抑制によって，シスプラチン耐性の低下および増殖能の低下が認められた。このことより Nrf2-Keap1 システムの制御により一部の肺癌で抗癌剤への感受性の改善が期待されると考えられた。Nrf2 の抑制により，シスプラチンの排除や解毒に関与する遺伝子の発現が低下したが，一方，メタロチオネインのように発現増加した遺伝子では Nrf2 の抑制に対する代償機転が働いたものと考えられた。Nrf2 の抑制による細胞増殖の抑制には G0/G1 期における細胞周期の停止が関与している可能性が示されたが，その詳細な機序については今後の検討が必要である。

（結論）

転写因子 Nrf2 は，肺癌細胞の増殖能および抗癌剤耐性に関与していて，肺癌治療における分子標的として有用である可能性が示された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は，肺癌特にその進行癌の予後不良の原因の一つとなっている抗癌剤に対する耐性を克服することを目標に，肺癌細胞の Nrf2-Keap1 システムの異常に注目し，行われた。著者は，肺癌由来の細胞に過剰発現している Nrf2 を選択的に抑制すると，細胞増殖能が低下しシスプラチン耐性が改善されることを分子細胞生物学的に示した。それらのメカニズムについても，実験的に証拠立てて，考察している。学問的にも高いレベルにあり，よく計画・準備された実験内容で，当初の研究目的を達成していると考えられる。特に腺癌細胞において Nrf2 が治療の具体的な標的分子になりうることを示唆した点は高く評価できる。審査委員会では，各審査委員の質問にもよく答え，著者が本研究分野にかなり精通しているとの印象を受けた。

よって，著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。