

氏名(本籍)	えん どう しん じ 遠 藤 慎 治 (東京都)			
学位の種類	博 士 (医 学)			
学位記番号	博 甲 第 5823 号			
学位授与年月日	平成 23 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	Potent <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> antitumor effects of MDM2 inhibitor nutlin-3 in gastric cancer cells (ヒト胃癌細胞に対する MDM2 阻害剤 nutlin-3 の抗腫瘍効果に関する研究)			
主査	筑波大学教授	医学博士	川 上 康	
副査	筑波大学准教授	医学博士	内 田 和 彦	
副査	筑波大学講師	博士(医学)	小 田 竜 也	
副査	筑波大学講師	博士(医学)	佐 藤 豊 実	

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

本邦における胃癌罹患率及び進行期での死亡率は高く、既存化学療法の治療成績は悪いため、新規治療薬の開発が必要である。胃癌組織における *p53* 変異率は約 30% であるが、残りの 70% においては *p53* の down-regulation による機能低下が提唱されており、野生型 *p53* の up-regulation を介した cell cycle arrest や apoptosis が効率良く誘導されれば、抗腫瘍効果の増強となる。*p53* の機能抑制癌蛋白として、murine double minute 2 (MDM2) や MDM4 が知られており、MDM2 は *p53* と複合体を形成後、ユビキチン化を介した分解を誘導する。MDM2 の選択的阻害作用を有する分子標的治療薬 nutlin-3 は、造血器腫瘍などに対する有効性が報告されているが、胃癌に対する有効性を示した報告はない。本研究は、胃癌細胞に対する nutlin-3 の抗腫瘍効果を *in vitro* 及び *in vivo* にて検証する目的で行われた。

(対象と方法)

ヒト胃癌細胞： *p53* 野生株 4 種類 (MKN-45, NUGC-4, STKM-2, SNU-1)

p53 変異株 3 種類 (NUGC-3, NUGC-2, STKM-1)

コントロールとして用いた細胞株：

MDM2 過剰発現細胞株 (SJS-A-1：osteosarcoma)

MDM4 過剰発現細胞株 (Weri-1：retinoblastoma)

MDM2・MDM4 過剰発現細胞株 (MCF-7：乳癌細胞株)

- 1) ヒト胃癌細胞株における *p53*, MDM2, MDM4, p14^{ARF} の発現レベルを Western blotting 法にて解析し、MDM2, MDM4 癌遺伝子増幅について Quantitative RT-PCR 法にて解析した。
- 2) *p53* 野生株 4 種類及び *p53* 変異株 1 種類 (NUGC-3) を nutlin-3 と 72 時間共培養し、抗腫瘍効果について WST-8 assay にて評価した。
- 3) 同様に、10 μ M nutlin-3 との共培養 0, 4, 8, 24 時間後における、*p53* シグナル下流蛋白 (p21, Noxa, Cleaved PARP) の発現レベルについて、Western blotting 法にて解析した。

4) *p53* 野生株 3 種類 (MKN-45, NUGC-4, SNU-1) 及び *p53* 変異株 1 種類 (NUGC-3) を 10 μ M nutlin-3 と共培養し、cell cycle arrest や apoptosis 誘導について、Flow cytometry にて解析した。

5) *p53* 野生株 4 種類を nutlin-3 (1, 2, 5 μ M) と 5-FU (0.25, 1 μ M) あるいは cisplatin (1 μ M) と共培養し、薬剤相互作用について、Combination Index-isobologram 法にて評価した。

6) *in vivo* における nutlin-3 の抗腫瘍効果について、MKN-45 皮下移植マウスを用い評価した。

p53 野生株 MKN-45 細胞浮遊液を 5~6 週齢のヌードマウス右大腿部皮下へ移植し、腫瘍体積平均値が約 100mm³ に達した時点で、コントロール群と治療群とに割り付けした。治療群として、nutlin-3 40mg/kg 投与群、5-FU 40mg/kg 投与群、nutlin-3 40mg/kg 及び 5-FU 40mg/kg 併用投与群を各々設け (n=6)、隔日にて 6 回腹腔内投与し、各群の腫瘍容積の評価を行った。コントロール群には同量の DMSO の投与を行った。

(結果)

p53 野生株 4 種類のうち、MKN-45 では、*MDM2* 遺伝子増幅を伴った *MDM2* 蛋白の過剰発現が認められ、SNU-1 では *MDM4* 蛋白の過剰発現が認められたが、*MDM4* 遺伝子増幅は認められなかった。NUGC-4, STKM-2 については、*MDM2* 及び *MDM4* 何れの遺伝子増幅も蛋白の過剰発現も認められなかった。各 *p53* 野生株に対し、nutlin-3 は *MDM2/MDM4* 遺伝子増幅あるいは *MDM2/MDM4* 蛋白の過剰発現の有無に関わらず、WST-8 assay にて、顕著な抗腫瘍効果を示した。また、nutlin-3 投与後の *p53* シグナル下流蛋白 (p21, Noxa, Cleaved PARP) 発現レベルの変化について、Western blotting 法にて解析したところ、24 時間までに何れの下流蛋白も強発現していた。Flow cytometry では、コントロール群に比し、10 μ M nutlin-3 投与群では有意に cell cycle arrest 及び apoptosis の誘導が認められた。一方、ヒト胃癌細胞 *p53* 変異株 NUGC-3 において、nutlin-3 の抗腫瘍効果は認められなかった。

既存の化学療法薬との併用効果について、5-FU と cisplatin との相互作用に関して検討を行ったところ、5-FU とは主に相加効果が、cisplatin とは相乗効果が認められた。

MKN-45 皮下移植ヌードマウスを用いた動物実験において、nutlin-3 治療群では有意な抗腫瘍効果が認められ、5-FU と nutlin-3 との併用群では、5-FU 単独治療群及び nutlin-3 単独治療群との比較にても有意な抗腫瘍効果が認められた。

(考察)

ヒト胃癌細胞の *MDM2* 及び *MDM4* 蛋白発現レベルは様々であったが、全ての *p53* 野生株において、nutlin-3 は *p53* の up-regulation を介した cell cycle arrest や apoptosis を誘導し、抗腫瘍効果を示した。一方、*p53* 変異株において、抗腫瘍効果は全く認められず、その作用は *p53* 遺伝子 status に依存することが示唆された。*MDM4* 過剰発現細胞株 SNU-1 では、nutlin-3 は有意な抗腫瘍効果を示した。MG132 を前投与した SNU-1 では、nutlin-3 投与後の *MDM4* 発現抑制が認められなかったことから、nutlin-3 の投与後に発現誘導された *MDM2* が proteasome 系での *MDM4* 分解を促進したとも考えた。

MKN-45 皮下移植ヌードマウスを用いた動物実験では nutlin-3 治療群で有意な抗腫瘍効果が認められた。消化器癌に対する化学療法で最も中心的な薬剤である 5-FU との併用で、有意な抗腫瘍効果の増強を示し、その耐容性も確認されたことから、今後の臨床応用が期待された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

MDM2 阻害剤 nutlin-3 は、野生型 *p53* 遺伝子を有する胃癌細胞に対して抗腫瘍効果を示し、今後、胃癌に対する有望な治療薬となりうる可能性を示唆した。胃癌の化学療法の新規併用薬剤としての実用化に向けた基礎的論文として価値ある論文である。

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。