

氏名	木村 剛之		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 8699 号		
学位授与年月	平成 30年 3月 23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	ヒートショックプロテイン90阻害剤による抗がん剤誘発心筋細胞毒性の緩和機構の解析		
主査	筑波大学教授	医学博士	兵頭 一之介
副査	筑波大学教授	医学博士	宮内 卓
副査	筑波大学准教授	博士（薬学）	大林 典彦
副査	筑波大学助教	博士（農学）	須田 恭之

## 論文の内容の要旨

木村剛之氏の博士学位論文は、ヒートショックプロテイン90（Hsp90）阻害剤の抗がん剤起因性心筋毒性緩和作用を解析したものである。その要旨は、以下の通りである。

### （目的）

マルチキナーゼ阻害剤スニチニブは消化管間質腫瘍、腎細胞癌、膵神経内分泌腫瘍に対して優れた薬効と共に心臓毒性リスクが高いことが知られている。腫瘍組織に対する強力な作用を保持しつつ、かつ毒性リスクを軽減できる治療法の開発は、臨床においてより効率的ながんのマネジメントに繋がることが期待される。著者は、ユニークな作用機序を持つことで知られる Hsp90 阻害剤（特にゲルダナマイシン）のスニチニブ誘発心筋細胞毒性への影響を評価するとともに、そのメカニズムを解析した。

### （対象と方法）

本研究はラット心臓横紋筋細胞株 H9c2 およびヒト iPS 細胞由来心筋細胞 iCell Cardiomyocytes を心筋細胞のモデルとし *in vitro* の系にて行われている。細胞毒性は細胞内総 ATP 量より算出した細胞生存率（cell viability (%)）あるいは細胞質内酵素である乳酸脱水素酵素の培地中濃度より算出した細胞膜障害度（Loss of membrane integrity (%)）により評価された。著者は、H9c2 細胞あるいはヒト iPS 細胞由来心筋細胞に Hsp90 阻害剤（特にゲルダナマイシン）を前処理し、その後スニチニブ処理を行った後に細胞毒性を検討した。オートファジーの評価は抗 LC3B 抗体を用いたウェスタンブロッティング法と抗

LC3 抗体を用いた免疫細胞化学法により行った。またオートファジー阻害剤、およびオートファジー誘導制御因子に対する siRNA ノックダウンを用い、メカニズムの解析を実施した。

ゲルダナマイシンの H9c2 への影響を評価するために DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を実施した。また Hsp70 のスニチニブ細胞毒性緩和作用への寄与をヒートショック処理、また Hsp70 安定過剰発現 H9c2 細胞を樹立し評価した。

#### (結果)

H9c2 細胞、またヒト iPS 細胞由来心筋細胞において、スニチニブ誘発心筋細胞毒性はゲルダナマイシンの前処理あるいは併用処理により有意に緩和されることが示された。またゲルダナマイシンだけでなく、他の Hsp90 阻害剤でも同様の毒性緩和作用が観察された。オートファジーフラックス解析の結果、スニチニブ処理により顕著にオートファジーが誘導されることが示唆されたが、ゲルダナマイシン前処理によりオートファジー誘導は有意に阻害された。ゲルダナマイシン処理した H9c2 細胞において、オートファジー誘導の主な制御因子である Atg7、Beclin-1、ULK1 のタンパク質レベルが有意に減少することが示された。スニチニブ誘発心筋細胞毒性はオートファジー阻害剤処理、あるいは ULK1 のノックダウンによるオートファジー阻害により有意に減弱した。

DNA マイクロアレイの結果、ゲルダナマイシン処理により H9c2 細胞では顕著に Hsp70 の遺伝子発現が誘導され、またタンパク質レベルでの発現誘導も観察された。著者は、さらにヒートショック処理あるいは Hsp70 安定過剰発現細胞株を用いた検証実験を実施したが、Hsp70 の発現誘導によりスニチニブ誘発心筋細胞毒性は緩和されなかった。

#### (考察)

著者は、H9c2 細胞/ヒト iPS 細胞由来心筋細胞において、ゲルダナマイシンを始めとする複数の Hsp90 阻害剤の前処理によりスニチニブの心筋細胞毒性が緩和されたことより、この毒性緩和作用は Hsp90 阻害剤のクラスエフェクトであるとしている。その機序として Hsp90 阻害剤のオートファジー関連因子への作用を評価し、主な制御因子として複数のタンパク質の減少を観察したが、複数のオートファジー阻害剤を用いた検証実験および ULK1 のノックダウン実験から、オートファジー誘導初期段階を阻害することが、より効率的にスニチニブ誘発心筋細胞毒性の緩和につながると示唆している。

著者は、さらにゲルダナマイシン処理により細胞保護作用を有する Hsp70 が顕著に発現誘導されることを確認した。しかし、ヒートショック処理あるいは Hsp70 安定過剰発現細胞株を用いた実験において、スニチニブ細胞毒性に対する緩和作用が観察されなかったことから、ゲルダナマイシンのスニチニブ細胞毒性緩和作用に寄与していないと判断している。これは Hsp70 の細胞保護作用は主に活性酸素種の産生軽減（酸化ストレス軽減）、分子シャペロン作用によるものであり、心筋細胞において、スニチニブのもたらず細胞毒性がオートファジー誘導など別のメカニズムに起因するためと考察している。

### 審査の結果の要旨

#### (批評)

著者は、本研究において、Hsp90 阻害剤がオートファジー関連タンパク質の分解を通じてスニチニブが誘導するオートファジーを阻害し、その結果、スニチニブ誘発心筋細胞毒性が緩和されることを示し

た。スニチニブ薬物療法のデメリットとなる心臓への悪影響を緩和することにより、がんのより良いマネジメントあるいは有効な併用療法の開発へとつながる可能性を示唆した貴重な論文である。

平成 29 年 12 月 22 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。