

学位論文審査の結果の要旨

令和元年5月20日

審査委員	主査	辻 晃仁		
	副主査	門脇 則光		
	副主査	上野 正樹		
願出者	専攻	機能構築医学	部門	医用工学
	学籍番号	15D704	氏名	石橋 洋一
論文題目	Chloroquine Enhances Rapamycin-induced Apoptosis in 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。)			
〔要旨〕				
【目的】				
<p>オートファジーは饑餓などのストレス暴露下で生存促進機構として働くことはよく知られている。最近の多くの報告では、癌細胞は抗腫瘍薬に暴露されるとオートファジーにより細胞障害に抵抗し、自らの増殖を促進することが明らかになってきている。クロロキンはオートファジー阻害剤として抗腫瘍薬と併用することで、その効果が促進されることが期待されている。本研究では骨肉腫株において、クロロキンのオートファジー抑制効果により抗腫瘍効果が増強されるかについて検証を行った。</p>				
【方法】				
<p>骨肉腫細胞株としてMG63細胞を用いた。抗腫瘍薬としてmTOR阻害薬であるRapamycinを、オートファジー阻害薬としてクロロキンを使用した。ラパマイシン単独とクロロキンとの併用による抗腫瘍効果についてWST-1 assayを用い評価を行った。Western blot法によりmTOR経路、オートファジー、アポトーシスのタンパク発現を評価した。アポトーシスはさらにフローサイトメトリーを用い評価した。また、LC3抗体を用いた免疫染色によりオートファジーを、Annexin V/PI/Hoechst三重染色によりアポトーシスを形態学的に評価した。</p>				
【結果】				
<p>WST-1 assayではラパマイシンは用量、時間依存性にMG63細胞に対し抗腫瘍効果を示した。また、ラパマイシン単独群に比し、クロロキン併用群は有意に抗腫瘍効果の増強を示した。Western blot法ではラパマイシンによりmTOR経路の抑制(4E-BP1、p70S6kのリン酸化抑制)、オートファジーの亢進(LC3-IIの発現増強、p62/SQSTM1の抑制)を示唆するタンパク発現を認めた。また、ラパマイシン単独群とクロロキン併用群との比較を検討したところ、クロロキン併用群ではオートファジーは抑制(LC3-IIの発現増強、p62/SQSTM1の抑制)され、アポトーシスは増強(caspase-3、caspase-9、PARP</p>				

の発現増強)していた。フローサイトメトリーでは、ラパマイシン単独群に比し、クロロキン併用群ではアポトーシス細胞の増加を認めた。LC3免疫染色試験ではクロロキンによるオートファジーのlate phase抑制効果を示唆するautophagosomeの増加を認めた。また、Annexin-V/Hoechst染色ではクロロキン併用群は、ラパマイシン単独群よりアポトーシス細胞の増加を認めた。

【考察】

抗腫瘍薬とオートファジー阻害薬の併用療法が癌治療にとって有効性あることが明らかにされてきているが、骨肉腫に対するラパマイシンとクロロキンの併用療法の効果についての報告はない。本研究では、MG63骨肉腫細胞において、ラパマイシンによる抗腫瘍効果が、クロロキンによる併用により増強されることが明らかとなった。ラパマイシンは、mTOR経路阻害により抗腫瘍効果を発揮するが、同時にオートファジーが誘導されるため、癌細胞の防御反応が増強されていることが推測される。クロロキンの併用により、オートファジーが抑制され、ラパマイシンによる抗腫瘍効果の増強、アポトーシスが誘導されたと考えられた。本研究の結果から、ラパマイシンとクロロキンの併用療法は骨肉腫に対する有効な化学療法となり得る可能性が示唆された。

本研究に関する学位論文審査委員会は令和1年5月13日に行われ、以下に示す様々な質疑応答が行われたが、それぞれに対して適切な回答が得られた。

1. ラパマイシン、クロロキンの濃度はどのように決めたか。
2. 先行研究では使用した抗癌剤は何か。
3. クロロキンを選択した理由は。
4. 他のオートファジーインヒビターではどうか。
5. なぜラパマイシンを使用したのか。
6. 臨床で使用できる濃度なのか。
7. Vivoでのデータはないのか。
8. 他の抗癌剤ではどうなのか。
9. 臨床で使用する際の課題は何か。
10. この実験が臨床ではどのようにいかせられると思うか。
11. 免疫を抑制していることで問題は起こるか。
12. 免疫を抑制していることで抗腫瘍作用が発現しているのか。
13. 今後の実験の方向性はどうか。

本論文はクロロキンがラパマイシンのオートファジーを抑制することで、アポトーシスを増強し抗腫瘍効果を増強することを明らかにした。骨肉腫に対する新たな治療の可能性を示した点で意義があり、本審査委員会では審査員全員一致して博士(医学)論文に相応しいものと判断し、合格とした。

掲載誌名	ANTICANCER RESEARCH			第 39 巻, 第 2 号
(公表予定) 掲載年月	2019 年 2 月	出版社(等)名	Highwire Press	

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。