

論 文 内 容 要 旨

題目 Down-regulation of MDR1 by Ad-DKK3 via Akt/NFκB pathways
augments the anti-tumor effect of temozolomide in glioblastoma cells
and a murine xenograft model

(膠芽腫細胞およびマウス背部皮下モデルにおいて、アデノウイルスベクターを用いた DKK3 の導入は Akt/NFκB 経路を介して MDR1 の発現を抑制し、テモゾロミドによる抗腫瘍効果を増強する)

著者 Toshitaka Fujihara, Yoshifumi Mizobuchi, Kohei Nakajima,
Teruyoshi Kageji, Kazuhito Matsuzaki, Keiko T. Kitazato,
Ryotaro Otsuka, Keijiro Hara, Hideo Mure, Toshiyuki Okazaki,
Kazuyuki Kuwayama, Shinji Nagahiro, Yasushi Takagi
平成 30 年 5 月 19 日発行 Journal of Neuro-Oncology, 2018
Online first で発表済

内容要旨

背景：膠芽腫は最も悪性度の高い脳腫瘍であり、摘出術、temozolomide(TMZ)による化学療法および放射線治療の組み合わせによる現在の標準治療を行っても、生存期間中央値は 15 ヶ月未満である。薬剤抵抗性が治療困難の原因の一つと考えられている。細胞膜上に存在し、細胞毒性を有する化合物などの細胞外排出を行う ATP 結合カセット輸送体 (ABC ファミリー) の一つである multidrug resistance protein 1 (MDR1) は、膠芽腫細胞をはじめ、各種の癌細胞において発現の増加が認められている。MDR1 は c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)/c-Jun または Akt 経路を介した Y-box binding protein 1 (YB-1)、および Akt 経路を介した nuclear factor (NF)κB による制御を受ける。申請者らは Dickkopf (DKK) ファミリーである DKK3 の発現増加による JNK/c-Jun 経路の活性化と関連した抗腫瘍効果を見出している。そこで DKK3 の過剰発現による MDR1 の発現抑制を介した TMZ の治療効果増強の可能性および作用機序を検討することにした。

方法：DKK3 のアデノウイルスベクター (adenovirus vector carrying DKK3; Ad-DKK3) を用いて遺伝子を導入し、膠芽腫細胞系および背部皮下腫瘍モデルマウスにおいて、DKK3 発現増加における TMZ 併用による抗腫瘍効果を検討した。siRNA による標的分子減少による影響を生存細胞数、免疫染色、ウエスタンブ

様式(8)

ロットや RT-PCR 法などで解析した。

結果：

1. ヒト正常および神経膠腫組織において腫瘍の悪性度に応じて DKK3 発現の低下がみられ、逆に MDR1 の発現の増加を認めた。
2. 膠芽腫細胞の背部皮下腫瘍モデルでは Ad-DKK3 と TMZ の併用により、単独治療に較べて腫瘍サイズの縮小や生存期間の延長を認めた。腫瘍組織においては DKK3 の発現増加に反し、MDR1 の発現減少が観察された。
3. 膠芽腫細胞系の U87MG, U251MG および初代培養細胞の TG105 においても Ad-DKK3 による DKK3 の発現増加は MDR1 発現低下と関連性がみられ、TMZ との併用により、有意な細胞増殖抑制を示した。
4. Ad-DKK3 を導入した U87MG 細胞において、phospho YB-1 および NF κ B の発現が低下しており、MDR1 発現抑制との関連が示唆された。
5. siMDR1 は TMZ との併用で U87MG 細胞の増殖を有意に抑制したが、siYB-1 は逆に U87MG 細胞を増殖し、YB-1 を介した MDR1 制御経路は否定的であった。
6. Akt 阻害剤 LY249002 およびプロテアソーム阻害剤 MG132 は Ad-DKK3 と同様に MDR1 および NF κ B 発現を抑制し、TMZ との併用により有意に細胞増殖抑制効果を示した。

以上の結果から、MDR1 の発現制御には Akt/NF κ B 経路が関与していることが示唆された。

結論：Ad-DKK3 は Akt/NF κ B 経路を介して MDR1 の発現を抑制し、TMZ の治療効果を増強した。MDR1 の発現抑制と TMZ の併用は膠芽腫に対する新たな治療法となる可能性が示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

報告番号	甲医第 1388 号	氏 名	藤原 敏孝
審査委員	主査 島田 光生 副査 高山 哲治 副査 常山 幸一		

題目 Down-regulation of MDR1 by Ad-DKK3 via Akt/NFκB pathways augments the anti-tumor effect of temozolomide in glioblastoma cells and a murine xenograft model

(膠芽腫細胞およびマウス背部皮下モデルにおいて、アデノウイルスベクターを用いた DKK3 の導入は Akt/NFκB 経路を介して MDR1 の発現を抑制し、テモゾロミドによる抗腫瘍効果を増強する)

著者 Toshitaka Fujihara, Yoshifumi Mizobuchi, Kohei Nakajima, Teruyoshi Kageji, Kazuhito Matsuzaki, Keiko T. Kitazato, Ryotaro Otsuka, Keijiro Hara, Hideo Mure, Toshiyuki Okazaki, Kazuyuki Kuwayama, Shinji Nagahiro, Yasushi Takagi

平成 30 年 5 月 19 日発行 Journal of Neuro-Oncology に
online first で発表済

(主任教授 高木 康志)

要旨 膠芽腫は最も悪性度の高い脳腫瘍であり、治療抵抗性が高く生存期間中央値は 15 ヶ月未満である。治療抵抗性に関与する薬剤排泄ポンプの multi-drug resistance gene (MDR) 1 の発現増加が膠芽腫細胞をはじめ各種の癌細胞において認められている。MDR1 は、c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)/c-Jun、または Akt 経路を介した Y-box binding protein 1 (YB-1) および nuclear factor (NF) κB による制御を受ける。

そこで申請者らは、DKK3 により MDR1 の発現を抑制すると

temozolomide (TMZ)の排泄が抑制され、抗腫瘍効果の増強に寄与すると考え本研究を行った。膠芽腫細胞系および背部皮下腫瘍モデルマウスを用い、DKK3のアデノウイルスベクター(Ad-DKK3)で遺伝子導入し、DKK3発現増加におけるTMZ併用による抗腫瘍効果とMDR1発現制御メカニズムを検討した。

得られた結果は以下のごとくである。

- 1) 神経膠腫組織において、腫瘍の悪性度に応じてDKK3の発現低下とは逆にMDR1の発現増加がみられた。
- 2) 膠芽腫皮下移植モデルおよび膠芽腫細胞系において、Ad-DKK3により、DKK3の発現増加と関連して、MDR1の発現減少が観察され、TMZとAd-DKK3の併用は抗腫瘍効果の増強を示した。
- 3) siMDR1によりMDR1の発現が低下した膠芽腫細胞にTMZを併用すると細胞増殖抑制作用の増強が認められた。一方、JNK/c-JunやYB-1を介したMDR1制御経路は否定的であった。
- 4) AKT阻害剤およびプロテアソーム阻害剤によるNFκB活性化阻害によってもMDR1の発現が低下し、各阻害剤とTMZの併用により、細胞増殖抑制作用の増強が見られたことから、MDR1の発現制御にAkt/NFκB経路が関与すると考えられた。

以上から、Ad-DKK3によるDKK3の過剰発現はAkt/NFκB経路を介してMDR1の発現を抑制しTMZの効果を増強することが示唆された。

本研究は膠芽腫に対する薬剤耐性機序解明と新たな治療法の開発に寄与すると考えられ、その臨床的意義は高く学位授与に値すると判定した。