

氏名	たまき りえ 玉木 理衣
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博薬第31号
学位授与の日付	平成29年3月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項
学位論文題目	Human scirrhus gastric cancer; chemotherapeutic trials from clinical and basic approaches. ヒトスキルス胃がんの治療確立に向けた基盤的研究
論文審査委員	(主査) 教授 大野 行弘 (副査) 教授 天野 富美夫 (副査) 教授 福永 理己郎

論文内容の要旨

がんは本邦の死因の第一位を占めており、中でも胃がんは日本人に特に多く、2010年の胃がん罹患数は12万人を超えている。近年胃がん全体の治療成績が向上しているにも関わらず、スキルス胃がんの予後は極めて不良である。スキルス胃がんは低分化型進行がんで、発見時には治療困難な場合が多く、現時点でスキルス胃がんの特化した治療法はない。スキルス胃がんは肉眼所見による疾患名で、病理組織学的にはがん細胞が粘膜下層の胃壁をびまん性に浸潤し著明な線維化増生を示す、Borrmann4型胃がんと臨床的には同義とされることが多い。4型胃がんの5年生存率は4-16%と予後不良である。漿膜浸潤、腹膜浸潤、腹膜播種、リンパ節転移を有し、発見時に既に切除不能と判断される場合が多い。40-60%に腹膜転移を認め、根治切除が出来た場合でも、切除後の再発部位は約50%が腹膜転移である。

2000年代から、5-FUに対するS-1の非劣性、S-1に対するS-1+Cisplatin療法(以下SP療法)の優越性が示されたことから、現在、標準治療はSP療法である。これは、S-1の内服が可能でCisplatinによる腎毒性予防のための大量輸液が可能な全身状態がよい患者であれば、SP療法が標準治療となる。しかし、スキルス胃がんの多くは腹

膜転移を伴うために SP 療法は選択しにくく、臨床開発の対象から外されてきたため、現時点で SP 療法を行うことが難しい腹膜転移を有する患者に対する標準治療は確立されていない。本研究では、臨床研究においてスキルス胃がんの治療成績に関する調査を行い、それを踏まえて、スキルス胃がん細胞株を用いた抗癌剤の作用機序に関する基礎研究を実施し、より良い治療法の確立に向けた検討を行った。

(1) スキルス胃がん患者に対する化学療法のレジメンや治療効果に関するレトロスペクティブな調査研究

神戸市立医療センター中央市民病院における 2011-2015 年に治療を受けたスキルス胃がん患者 42 例について、治療方法と経過に関する調査を行った。その結果、① locally advanced などの早期段階に治療介入を行う方が予後が良い傾向があること、②これまで一般的に腹膜播種症例が多い為、経口抗がん剤が使用しにくいことや PS (Performance status) 不良であることが多い為に予後不良もしくは治療効果不良と考えられてきたが、今回の検討により、腹膜播種の有無による予後の差はなかったこと、③本邦での標準治療である SP 療法は他の治療と比較して有効性は認められるものの、予後改善効果は十分ではないこと、が示唆され、より良い治療レジメンや新規薬剤の開発が必要であることが明らかになった。

(2) ヒトスキルス胃がん細胞株を用いた抗がん剤の耐性に関する研究

未治療のスキルス胃がん患者の組織から分離・樹立した細胞株である HSC-39, HSC-44PE, HSC-58, HSC-60 細胞株を用い、5-FU 及び Cisplatin に対する薬剤耐性を調べた結果、両薬剤に対し高い耐性を示す細胞株 (HSC-58, HSC-60 細胞) と中程度の耐性を示す細胞株 (HSC-44PE 細胞)、および低い耐性を示す細胞株 (HSC-39 細胞) に分かれた。この結果は、がん患者の体内には、未治療の段階において異なる薬剤耐性を示すスキルス胃がん細胞が存在すること、及び、高濃度の 100 μ M 5-FU 存在下で増殖する細胞 (HSC-58, HSC-60 細胞) が存在することを示し、スキルス胃がんの特性に合った薬剤選択が重要であることを示す。

次に、スキルス胃がん細胞の薬剤耐性獲得機構を研究するため、調べた細胞株の中で最も薬剤耐性の低かった HSC-39 細胞株を用いて、その中で薬剤耐性が最も低い亜株、clone #3 を親株とした。その親株から、体細胞変異の手法により 5-FU および Cisplatin 耐性変異株を樹立した。実験方法は、親株を変異剤 (EMS) 処理し、高濃度の 5-FU あるいは Cisplatin 存在下で培養して生残した細胞を継代・分離して耐性株を得た。その

結果、5-FU 耐性株は親株に対して IC₅₀ 値が 3.3 倍、Cisplatin 耐性株は IC₅₀ 値が 4.3 倍とそれぞれ高い値を示した。細胞周期の解析から、親株、5-FU 耐性変異株共に 5-FU 添加により細胞周期に大きな変化は見られなかった。一方、Cisplatin 添加により親株は G2/M 期で停止したのに対し、Cisplatin 耐性株は細胞周期が完全に停止しなかった。また、HSC-39 細胞を用いて、抗がん剤及び活性酸素分子種(ROS)を添加して誘導される細胞死の機構を解析した。その結果、5-FU 添加により濃度依存的に LDH release が確認され、低濃度においても細胞増殖活性が低下していた。Adriamycin あるいは CPT-11 添加においても高濃度のみ LDH release が見られた。またアポトーシス誘導については Caspase3/7 の関与が示唆された。加えて ROS 添加によりアポトーシスを誘導し、細胞障害を引き起こすことが分かった。以上より 5-FU による細胞死が、酸化ストレスを伴うアポトーシスを介することが示唆された。本研究により、5-FU は低濃度でエネルギー代謝を阻害し、高濃度で細胞膜のバリアを崩すことが示唆された。

以上、本研究により、標準治療として行われている SP 療法は、スキルス胃がんにおいて必ずしも十分な有効性を示しているとは言えないが、患者背景並びに他のレジメンとの比較からは、一定の治療成績を挙げていることが示唆された。スキルス胃がん細胞株を用いた研究の結果から、作用機序の異なる 5-FU と Cisplatin の併用は、各薬剤による細胞死からの回避を阻害する可能性があり、薬剤耐性の制御という点から重要であることが示唆された。今後、本研究で樹立した耐性株の遺伝子発現の変化等を検討することにより、スキルス胃がん細胞の薬剤耐性機構を明らかにし、より効果的な薬剤を提案することができると期待される。最後に、本研究の成果がスキルス胃がんの臨床現場における治療成績から基礎研究である細胞株を用いた検討へ橋渡しをすることで、難治性がんの病態解明と早期診断、有効な治療法の確立を目指す一助となることが期待される。

論文審査の結果の要旨

がんは本邦の死因の第一位を占めており、中でも胃がんは日本人に特に多く、2010年の胃がん罹患数は12万人を超えている。近年胃がん全体の治療成績が向上しているにも関わらず、スキルス胃がんの予後は極めて不良である。スキルス胃がんは低分化型進行がんで、発見時には治療困難な場合が多く、現時点でスキルス胃がんの特化した治療法はない。スキルス胃がんは肉眼所見による疾患名で、病理組織学的にはがん細胞が粘膜下層の胃壁をびまん性に浸潤し著明な線維化増生を示す、Borrmann4型胃がんと臨床的には同義とされることが多い。4型胃がんの5年生存率は4-16%と予後不良である。漿膜浸潤、腹膜浸潤、腹膜播種、リンパ節転移を有し、発見時に既に切除不能と判断される場合が多い。40-60%に腹膜転移を認め、根治切除が出来た場合でも、切除後の再発部位は約50%が腹膜転移である。

2000年代から、5-FUに対するS-1の非劣性、S-1に対するS-1+Cisplatin療法(以下SP療法)の優越性が示されたことから、現在、標準治療はSP療法である。これは、S-1の内服が可能でCisplatinによる腎毒性予防のための大量輸液が可能な全身状態がよい患者であれば、SP療法が標準治療となる。しかし、スキルス胃がんの多くは腹膜転移を伴うためにSP療法は選択しにくく、臨床開発の対象から外されてきたため、現時点でSP療法を行うことが難しい腹膜転移を有する患者に対する標準治療は確立されていない。本研究では、臨床研究においてスキルス胃がんの治療成績に関する調査を行い、それを踏まえて、スキルス胃がん細胞株を用いた抗癌剤の作用機序に関する基礎研究を実施し、より良い治療法の確立に向けた検討を行った。

主な成果は以下の通りである。

(1)スキルス胃がん患者に対する化学療法のレジメンや治療効果に関するレトロスペクティブな調査研究

神戸市立医療センター中央市民病院における2011-2015年に治療を受けたスキルス胃がん患者42例について、治療方法と経過に関する調査を行った。その結果、①locally advancedなどの早期段階に治療介入を行う方が予後が良い傾向があること、②これまで一般的に腹膜播種症例が多い為、経口抗がん剤が使用しにくいことやPS(Performance status)不良であることが多い為に予後不良もしくは治療効果不良と考えられてきたが、今回の検討により、腹膜播種の有無による予後の差はなかったこと、③本邦での標準治療であるSP療法は他の治療と比較して有効性は認められるものの、

予後改善効果は十分ではないこと、が示唆され、より良い治療レジメンや新規薬剤の開発が必要であることが明らかになった。

(2) ヒトスキルス胃癌細胞株を用いた抗がん剤の耐性に関する研究

未治療のスキルス胃癌患者の組織から分離・樹立した細胞株である HSC-39, HSC-44PE, HSC-58, HSC-60 細胞株を用い、5-FU 及び Cisplatin に対する薬剤耐性を調べた結果、両薬剤に対し高い耐性を示す細胞株(HSC-58, HSC-60 細胞)と中程度の耐性を示す細胞株(HSC-44PE 細胞)、および低い耐性を示す細胞株(HSC-39 細胞)に分かれた。この結果は、がん患者の体内には、未治療の段階において異なる薬剤耐性を示すスキルス胃癌細胞が存在すること、及び、高濃度の 100 μ M 5-FU 存在下で増殖する細胞(HSC-58, HSC-60 細胞)が存在することを示し、スキルス胃癌の特性に合った薬剤選択が重要であることを示す。

次に、スキルス胃癌細胞の薬剤耐性獲得機構を研究するため、調べた細胞株の中で最も薬剤耐性の低かった HSC-39 細胞株を用いて、その中で薬剤耐性が最も低い亜株、clone #3 を親株とした。その親株から、体細胞変異の手法により 5-FU および Cisplatin 耐性変異株を樹立した。実験方法は、親株を変異剤(EMS)処理し、高濃度の 5-FU あるいは Cisplatin 存在下で培養して生存した細胞を継代・分離して耐性株を得た。その結果、5-FU 耐性株は親株に対して IC₅₀ 値が 3.3 倍、Cisplatin 耐性株は IC₅₀ 値が 4.3 倍とそれぞれ高い値を示した。細胞周期の解析から、親株、5-FU 耐性変異株共に 5-FU 添加により細胞周期に大きな変化は見られなかった。一方、Cisplatin 添加により親株は G2/M 期で停止したのに対し、Cisplatin 耐性株は細胞周期が完全に停止しなかった。また、HSC-39 細胞を用いて、抗がん剤及び活性酸素分子種(ROS)を添加して誘導される細胞死の機構を解析した。その結果、5-FU 添加により濃度依存的に LDH release が確認され、低濃度においても細胞増殖活性が低下していた。Adriamycin あるいは CPT-11 添加においても高濃度のみ LDH release が見られた。またアポトーシス誘導については Caspase3/7 の関与が示唆された。加えて ROS 添加によりアポトーシスを誘導し、細胞障害を引き起こすことが分かった。以上より 5-FU による細胞死が、酸化ストレスを伴うアポトーシスを介することが示唆された。本研究により、5-FU は低濃度でエネルギー代謝を阻害し、高濃度で細胞膜のバリアを崩すことが示唆された。

以上、本研究により、標準治療として行われている SP 療法は、スキルス胃癌において必ずしも十分な有効性を示しているとは言えないが、患者背景並びに他のレジメンとの比較からは、一定の治療成績を挙げていることが示唆された。また、スキルス

胃癌細胞株を用いた研究の結果から、作用機序の異なる5-FUとCisplatinの併用は、各薬剤による細胞死からの回避を阻害する可能性があり、薬剤耐性の制御という点から重要であることが示唆された。今後、本研究で樹立した耐性株の遺伝子発現の変化等を検討することにより、スキルス胃癌細胞の薬剤耐性機構を明らかにし、より効果的な薬剤を提案することができると期待される。本研究の成果は、スキルス胃癌の臨床現場における治療成績から基礎研究である細胞株を用いた検討へ橋渡しをすることで、難治性がんの病態解明と早期診断、有効な治療法の確立を目指す一助となることが期待される。

よって、上記の論文は、博士(薬学)論文として適当と判断する。