

論文審査の結果の要旨

報告番号	乙 第 1254 号	氏 名	渡邊 隆之
論文審査担当者	主 査 山田充彦 副 査 平塚佐千枝 ・ 小泉知展 ・ 石川 孝		

(論文審査の結果の要旨)

エストロゲン受容体(ER)陽性再発乳癌の治療では、内分泌療法または化学療法による逐次治療が行われる。しかし、ER陽性乳癌に対する長期間の内分泌療法が、その後に用いられる化学療法剤に対する感受性にどの様に影響するかを調べた研究は少ない。先行して行なった内分泌療法が化学療法剤に対する感受性を変化させるかを解析し、内分泌療法抵抗性乳癌の個別化治療に有用なバイオマーカーを探索するために、3種類のER陽性乳癌細胞株(T47D、MCF7、BT474)でタモキシフェン(TAM)耐性株(T47D/T、MCF7/T、BT474/T)を樹立し、化学療法剤に対する感受性を *in vitro* および *in vivo* で解析した。

その結果、渡邊は次の結論を得た。

1. WST法での解析で、親株に比べMCF7/Tでは5-FU感受性の15倍の増加を認めた。
2. Cell Death Detection ELISA plusを用いてアポトーシスの定量的解析を行い、親株に比べMCF7/Tでアポトーシスの増加を認めた。
3. 5-FUの代謝酵素のmRNA発現をRT-PCR法で解析し、各細胞株のTAM耐性株では親株に比し thymidylate synthase (TS) mRNA 発現の有意な上昇を認め、またMCF7ではTAM耐性株で dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) mRNA 発現の有意な低下を認めた。
4. MCF7のTSとDPYDのmRNA発現をsiRNAでノックダウンすると、DPYDのノックダウンによりMCF7の5-FU感受性は増加した。
5. マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF MS)を用いて5-FUの代謝産物を定量し、MCF7/Tでは親株に比し5-FUの活性代謝物であるフルオロデオキシウリジン(FdUrd)の増加と、DPDにより産生される2-フルオロ-β-アラニン(FBAL)の減少を認め、5-FUの代謝経路が活性化されていることを確認した。
6. DPYD遺伝子のプロモーター活性を luciferase reporter assay を用いて解析したところ、MCF7/TでDPYD mRNA プロモーター活性がMCF7に比べ有意に上昇していることを認めた。DPYD mRNAのプロモーター活性の調節にメチル化が関与している可能性を考え、脱メチル化剤5-アザシチジンでMCF7とMCF7/Tを処理した後、DPYD mRNA 発現を解析したところ、MCF7では1.2倍、MCF7/Tでは8.6倍のDPYD mRNA 発現の増加を認めた。さらに、5-アザシチジン処理によりMCF7/Tの5-FU感受性の低下を認めたことから、MCF7/TではDPYD mRNAのプロモーター領域のメチル化の亢進がDPYD mRNA 発現低下と5-FU感受性増加に部分的に関与していると考えられた。続いてmiRNAが関与している可能性を考え、3'-UTR luciferase assayを用いた解析を行い、MCF7/Tでは親株に比しDPYD 3'-UTR luciferase 活性が有意に低下しており、この結果からmiRNAによる転写後調節もMCF7/TのDPYD mRNA 発現の低下に関与している可能性が示唆された。
7. MCF7とMCF7/Tを17β-エストロジオールを投与したヌードマウスの皮下に移植し xenograft model を作成し、5-FUのプロドラッグであるカペシタビンの経口投与を行ったところ、MCF7/TではMCF7親株に比べ有意な腫瘍縮小が認められ、5-FUに対する感受性上昇が *in vivo* でも認められた。また、マウス皮下で形成された腫瘍の免疫組織染色で、MCF7腫瘍に比べMCF7/T腫瘍でのDPD発現が低下していることが確認できた。

これらの結果から、一部のER陽性乳癌細胞では、内分泌療法により化学療法剤感受性が変化する可能性と、TAM耐性になった乳癌に対して5-FUが有効である可能性が示された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。