

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Oxaliplatin, a Potent Inhibitor of Survivin, Enhances Paclitaxel-induced Apoptosis and Mitotic Catastrophe in Colon Cancer Cells  |
| Author(s)    | 藤江, 裕二郎   |
| Citation     | 大阪大学, 2008, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/48928">https://hdl.handle.net/11094/48928</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

|            |   |
|------------|---|
| 氏名         | 藤江裕二郎   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学)  |
| 学位記番号      | 第 22321 号   |
| 学位授与年月日    | 平成 20 年 3 月 25 日  |
| 学位授与の要件    | 学位規則第 4 条第 2 項該当  |
| 学位論文名      | Oxaliplatin, a Potent Inhibitor of Survivin, Enhances Paclitaxel-induced Apoptosis and Mitotic Catastrophe in Colon Cancer Cells<br>(オキサリプラチンは大腸癌細胞において survivin 蛋白を抑制し、パクリタキセルによる apoptosis および mitotic catastrophe 誘導効果を増強する) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 門田 守人<br><br>(副査)<br>教授 野口眞三郎 教授 金倉 譲  |

### 論文内容の要旨

#### (目的)

新規白金製剤 oxaliplatin は 5-FU/leucovorin や irinotecan との併用により大腸癌に対し高い臨床効果をもたらすが、その作用機序の全容は明らかでない。われわれはこれまでの検討で、大腸癌細胞に対する oxaliplatin の効果発現に細胞周期制御蛋白 p21 の発現制御が関与することを示した。本研究では oxaliplatin が細胞周期に影響を及ぼし apoptosis を誘導するという仮説を立て検討を行った。その過程でわれわれは oxaliplatin が抗 apoptosis 因子の一つである survivin を抑制することを見出した。Survivin は apoptosis のみならず細胞分裂機構の破綻により引き起こされる細胞死 mitotic catastrophe の key molecule としても近年注目されている。そこで oxaliplatin は他剤との併用時に survivin の抑制により apoptosis や mitotic catastrophe 誘導効果を増強するという仮説を立て検証した。併用薬剤としては apoptosis 誘導性であり投与による survivin の増加が報告されている taxane 系製剤 paclitaxel を用いることとした。

#### (対象と方法)

1. 大腸がん細胞株として SW480、DLD1、HT29 を用いた。
2. 細胞性質として細胞増殖 assay、細胞周期 (flow cytometry) 解析を行った。二剤併用効果は isobologram analysis により検討した。
3. Annexin V assay と caspase-3 colorimetric assay により apoptosis 定量を行った。
4. Western blot analysis により細胞周期及び apoptosis 関連蛋白の発現を調べた。
5. Mitotic catastrophe はヘマトキシリン染色による多核巨大細胞の出現頻度測定により定量した。

#### (成績)

用いた細胞株において、oxaliplatin は IC<sub>50</sub> 濃度で G2-M arrest と apoptosis を誘導したが、その程度は細胞種により異なっていた。Western blot analysis では M 期開始に重要な役割を果たす cdc2 の減少および抗 apoptosis 作用

を有する phospho-Bcl2、Bcl-xl の減少を認めた。また survivin 蛋白はいずれの細胞においても投与 24 及び 48 時間後に強く抑制されていた。

Paclitaxel との併用では、paclitaxel 先行または同時投与において相加または相乗的な効果を認めたが oxaliplatin 先行投与ではその効果は拮抗的であった。

DLD1 では、paclitaxel 先行投与群が各単剤投与群に比し annexin V、caspase-3 両 assay において有意に apoptosis の増加を認めたが、多核巨細胞の出現頻度は 6 日目でも 5%未満と低率であった。一方 SW480 では、paclitaxel 先行投与群で annexin V assay において apoptosis の増加を認めるものの 10%と低値にとどまり caspase-3 活性では有意な増加を認めなかった。しかし多核巨細胞の出現頻度は 3 日目で 13%、6 日目で 30%と他群に比し著しく増加していた。

#### (結論)

今回用いた大腸癌細胞株においては oxaliplatin 投与により抗 apoptosis 蛋白の減少と、程度の差はあるが apoptosis 誘導が認められ、本薬剤の作用には apoptosis が関与するものと考えられた。また、細胞周期に関しては M 期開始蛋白 Cdc2 の減少と G2-Marrest を認めた。Survivin 蛋白はその安定化に Cdc2 によるリン酸化を必要とすることから、Cdc2 と apoptosis を結びつけるものとして今回特に着目した分子である。検討結果は oxaliplatin が survivin の inhibitor として作用する可能性を示唆しており、本薬剤の特性としては今回のわれわれの報告が初めてである。

Paclitaxel との併用効果においては薬剤投与順序が重要であったが、oxaliplatin 先行投与の場合は Cdc2 減少により、paclitaxel の作用点 (M 期) へ細胞が至りにくくなるため拮抗作用を呈したと考えられる。これは cell-cycle mediated drug resistance という概念で近年提唱されており、実際の使用においても留意が必要と考えられる。

Paclitaxel 先行投与における併用効果は DLD1 では apoptosis、SW480 では mitotic catastrophe の増強が主たる原因と考えられた。いずれの細胞死においても survivin は重要な役割を果たすと考えられており、本研究の結果は oxaliplatin が survivin の inhibitor として細胞死経路を活性化させ、特に他剤との併用時に効果増強を期待できる薬剤であることを示唆するものと考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

新規白金製剤 oxaliplatin は 5-FU 等との併用により大腸癌に対し高い臨床効果をもたらすがその作用機序の全容は明らかでない。

本研究では oxaliplatin と paclitaxel を用い併用効果におけるメカニズムを検討した。Oxaliplatin は単剤で apoptosis と G2-M arrest を誘導した。また、抗 apoptosis 因子である survivin を強く抑制した。Paclitaxel との併用では、paclitaxel 先行または同時投与において相乗または相加的な効果を認めたが、細胞種により apoptosis が増強されているものと、異常な mitosis により引き起こされる mitotic catastrophe が増強されているものがみられた。Survivin は mitotic catastrophe においても key molecule として注目されており、oxaliplatin が survivin を抑制することで細胞死経路を活性化させ併用効果増強につながる可能性が示唆された。

Oxaliplatin が survivin を抑制することを示したのは本研究が初めてである。本研究の成果は oxaliplatin の増殖抑制メカニズムの解明に繋がるだけでなく、効果的な他剤併用療法の開発に繋がる可能性があり、学位に値すると認める。