The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Involvement of Ribonucleotide Reductase M1 Subunit Overexpression in Gemcitabine Resistance of Human Pancreatic Cancer
Author(s)	中平, 伸
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48983
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【33】

氏　　名	中　平　　伸（なか　ひら　しん）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２１４６６　号
学位授与年月日	平成 19 年４月 23 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	Involvement of Ribonucleotide Reductase M1 Subunit Overexpression in Gemcitabine Resistance of Human Pancreatic Cancer （膵癌における Ribonucleotide reductase M1 subunit 遺伝子発現と Gemcitabine 耐性との関連）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　門田　守人 （副査） 教　授　林　　紀夫　　教　授　野口眞三郎

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

膵癌は局所の高度進展や肝転移などで切除適応とならないことが多く、化学療法に期待するところは大きい。膵癌に対して第１選択化学療法剤として Gemcitabine（GEM）が広く利用されているが、GEM 単剤での抗腫瘍効果は未だ満足するものではなく、その耐性機序等の検討が必要である。本研究においては、ヒト膵癌細胞株を用いて樹立した GEM 耐性株を用いて、遺伝子発現変化を解析し、GEM 耐性機序に関わる因子について検討した。

〔　方　　法　〕

1）GEM 耐性株樹立

ヒト膵癌細胞株５株（MiaPaCa2、PSN1、BxPC3、PCI6、Panc1）における GEM 感受性を MTT assay にて測定し、IC50 値の低い３株（MiaPaCa2、PSN1、BxPC3）を耐性株樹立に使用した。これらの細胞を GEM（IC10 値から開始し、徐々に漸増）に２ケ月以上持続的に曝露し、耐性株を樹立した。また、ヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いて *iv vivo* での耐性も検討した。

2）網羅的遺伝子解析

親株・耐性株間の遺伝子発現変化の解析には３万遺伝子搭載の Microarray chip を使用し、発現変化の認められた因子に関して定量的 RT-PCR および western blot にて確認を行った。

3）候補遺伝子の GEM 獲得耐性への関与

発現変化の認められた因子に関して特異的な RNAi を作成・導入し、GEM 感受性が変化するかどうか MTT assay にて検討した。

4）候補遺伝子の GEM 自然耐性への関与

膵癌細胞株５株を用いて獲得耐性のみならず自然耐性においても関与する因子であるかどうか、発現量と MTT assay による感受性との相関関係について検討した。

5）臨床症例における検討

臨床症例に関しては、膵癌に対して根治的切除術施行後に再発をきたし、GEM を用いた化学療法を受けた画像的

評価可能病変を有する 18 症例を対象に後向き調査を行った。RRM1 発現量は手術時に採取した腫瘍凍結サンプルを用いて定量的 RT-PCR にて mRNA レベルで測定し、発現量により症例を２群に分け、奏効率および全生存率との関係を検討した。

〔　成　　績　〕

1）GEM 耐性株樹立

GEM 耐性度は、IC50 値で MiaPaCa2 : 81 倍、PSN1 : 986 倍、BxPC3 : 11 倍であった。この中で MiaPaCa2 は、GEM 感受性以外の性質は親株と耐性株で類似しており、さらに１ケ月薬剤投与を行わずに培養した後も耐性は安定し、*in vivo* においても耐性を示した。以上より、MiaPaCa2 耐性株はもっとも耐性機序の検討にふさわしい株と考えられ、以後の検討に使用した。

2）網羅的遺伝子解析

網羅的遺伝子解析の結果、耐性株にて Ribonucleotide reductase M1 subunit（RRM1）発現が親株と比較して最も亢進（4.5 倍）していた。定量的 RT-PCR および western blot においても同様の発現亢進が確認された。

3）候補遺伝子の GEM 獲得耐性への関与

RRM1 特異的 RNAi を導入すると耐性株の GEM 感受性は大きく変化し、親株とほぼ同等となった。また、親株に関しても GEM 感受性の増大がみられた。

4）候補遺伝子の GEM 自然耐性への関与

膵癌細胞株５株において、RRM1 発現量と GEM 感受性との間に、統計学的に有意な相関がみられ（R＝0.99、P＜0.001）、自然耐性にも関与する因子であると考えられた。

5）臨床症例における検討

臨床症例に関する検討において、RRM1 発現量と奏効率および全生存率との間に統計学的に有意な相関（P＜0.05）がみられた。

〔　総　　括　〕

RRM1 遺伝子発現は GEM の自然耐性および獲得耐性に関与しており、膵癌患者の治療において GEM 耐性化抑制、GEM 感受性予測および治療標的となる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

膵癌に対して第１選択化学療法剤として Gemcitabine（GEM）が広く利用されているが、GEM 単剤での抗腫瘍効果は未だ満足するものではなく、その耐性機序等の検討が必要である。本研究においては、ヒト膵癌細胞株を用いて樹立した GEM 耐性株を用いて、遺伝子発現変化を解析し、GEM 耐性機序に関わる因子について検討した。膵癌細胞株 MiaPaCa2 にて 80.9 倍の GEM 耐性株樹立し、全遺伝子型 DNA chip にて網羅的遺伝子解析を行ったところ、耐性株で Ribonucleotide reductase M1 subunit（RRM1）が 4.5 倍発現亢進していた。RRM1 特異的 RNAi 導入にて耐性株の感受性は親株と同等に変化した。自然耐性に関して膵癌細胞株５株の IC50 値と RRM1 発現との関連を検討し、強い相関を認めた。臨床例では術後再発にて GEM 投与した 18 症例の切除サンプルの RRM1 発現を測定し、RRM1 と奏効率・全生存率の間に有意差がみられた。以上より、RRM1 は GEM 耐性機序に関与していることが示唆され、膵癌患者の治療において GEM 耐性化抑制、GEM 感受性予測および治療標的となる可能性があり、学位の授与に値すると考えられる。