



Title	BRCA/Fanconi Anemia Pathway Implicates Chemo-resistance to Gemcitabine in Biliary Tract Cancer
Author(s)	中島, 慎介
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/53919
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	中島 慎介
論文題名 Title	BRCA/Fanconi Anemia Pathway Implicates Chemo-resistance to Gemcitabine in Biliary Tract Cancer (胆道癌においてBRCA/Fanconi anemia経路はGemcitabineに対する化学療法抵抗性と関係する)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 胆道癌は切除以外に有効な治療法のほとんど存在しない難治癌であり、本邦において罹患率、死亡率ともに上位である。胆道癌に対する化学療法は、ゲムシタビン (GEM) を基軸とした多剤併用療法が中心であるが、現在、効果の証明されている治療法はGEMとシスプラチンの併用療法のみである。それゆえにGEMに対する抵抗性が生じれば2次治療は存在せず、化学療法抵抗性の機構を解明し、新規治療戦略を開発することが必要であると考えている。 GEMは代謝拮抗性抗悪性腫瘍剤であり、DNAの合成阻害をその機序としており、DNA損傷を蓄積させアポトーシスを誘導する。障害されたDNAの修復因子の増強は化学療法に対する抵抗性の一因と考えられるため、DNA修復因子と化学療法抵抗性の関係を検討することとした。また、化学療法抵抗性と癌幹細胞 (CSC) が関係するという報告や、幹細胞と体細胞では主要なDNA修復経路が異なるという報告から、胆道癌における化学療法抵抗性に関わるDNA修復経路を検討することで、癌幹細胞に対しても効果のある新規補助療法を開発することが可能であると考えた。 そこで、胆道癌細胞株を用いて、GEMに対する抵抗性と、DNA修復因子、癌幹細胞分画との関連性を明らかにすることを目的とした。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 胆道癌細胞株であるMzChA1、CCLP1、KMCH1に対してGEM暴露を反復して行い、耐性化した細胞株をクローニングすることでGR (Gemcitabine resistant) 株 (MzChA1-GR、CCLP1-GR、KMCH1-GR) を樹立した。GEM抵抗株と親株を用いてDNA修復因子の変動を網羅的遺伝子発現解析や、qRT-PCR、Western Blottingにて比較し、上昇した分子に対しsmall interfering RNA (siRNA) を用いて遺伝子発現抑制を行い薬剤感受性の変化を検討した。また、胆道癌におけるCSCマーカーとして報告されるCD24⁺44⁺分画の変化についてはFlow cytometry (FACS) を用いて検討した。 GEM抵抗株と親株の比較において、MzChA1とMzChA1-GRによる網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、2本鎖DNA損傷に対して相同組換え修復を行うBRCA/Fanconi Anemia (FA) 経路を形成する15の因子はほぼすべてが増加しており、GEM抵抗性との関連性が示唆されたため、この経路に着目し検討していくこととした。 胆道癌細胞株と樹立したそれぞれのGR株を用いて、BRCA/FA経路に含まれる主要因子であるBRCA2、FANCI、FANCD2、RAD51cの発現上昇をqRT-PCRによるmRNAレベルに加え、Western Blottingによる蛋白レベルでも確認した。この結果によりGEM抵抗性の機序としてBRCA/FA経路の亢進が関係している可能性が考えられた。そこで、siRNAを導入してこの経路を阻害したところ、GEMに対する抵抗性が改善した ($P<0.01$)。さらに、RAD51に関してはその機能を阻害する特異的阻害薬 (B02) を使用した薬剤感受性試験においてもGEM抵抗性の改善が確認された。また、FACSによる検討により、GR株では親株と比較しCD24⁺44⁺分画が増加していたこと、72時間のGEM短期暴露によってCD24⁺44⁺分画が増加したことから、GEM抵抗性とCD24⁺44⁺分画の関係性が示唆された。さらにFACSによりCD24⁺44⁺分画細胞を抽出し、qRT-PCRにてmRNAの発現を検討したところ、BRCA/FA因子 (BRCA2、FANCD2、RAD51c) は高発現していた。つづいて、siRNAを用いてBRCA/FA経路を阻害したところ、CD24⁺44⁺分画はGEMにより減少した ($P<0.01$)。BRCA/FA経路の阻害は胆道癌におけるCD24⁺44⁺分画を減少させ、GEM抵抗性を改善した。さらに、臨床組織におけるBRCA/FA経路の発現とCD24⁺44⁺分画との関連を検討するため、FANCD2とCD24に対し免疫組織化学染色を施行したところ、この2者の発現に相関を認めた。 〔総括(Conclusion)〕 BRCA/Fanconi Anemia経路の高発現はゲムシタビン抵抗性の機序の一つであり、癌幹細胞分画との関連も示された。GEMとBRCA/FA経路の阻害を併用した治療戦略は胆道癌に対する新規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及び担当者

(申請者氏名) 中島 慎介

	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査 大阪大学教授	森 正 樹
	副 査 大阪大学教授	竹原 徹 印
	副 査 大阪大学教授	奥 山 宏 臣

論文審査の結果の要旨

審査論文の要旨は以下の内容である。

胆道癌に対する化学療法の基軸はゲムシタビン(GEM)であり、DNA修復機構の増強が化学療法抵抗性の一因となっていると考えられた。本研究は、癌幹細胞における化学療法抵抗性が示唆されていることから、DNA修復機構が胆道癌やその癌幹細胞分画に与える影響を検討したものである。

胆道癌細胞株と、樹立したGEM耐性株を使用し、DNA相同組換え修復の中心であるBRCA/Fanconi anemia (FA)経路の発現を評価したところ、耐性株において高発現であった。耐性株では癌幹細胞分画(CD24⁺44⁺分画)が増加していることを示した。CD24⁺44⁺分画におけるBRCA/FA因子は高発現であった。BRCA/FA因子をsiRNAを用いて抑制すると、CD24⁺44⁺分画は減少し、GEM/CDDPに対する化学療法抵抗性が改善した。

上記の結果よりBRCA/FA経路の高発現は胆道癌における化学療法抵抗性の機序の一つであり、CD24⁺44⁺分画と関連していることも示された。

上記内容は胆道癌における新規治療の開拓につながる可能性のある研究であり、学位に値するものと認める。