The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Activation of Wnt/β-catenin signalling pathway induces chemoresistance to interferon-α/5-fluorouracil combination therapy for hepatocellular carcinoma
Author(s)	野田, 剛広
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54127
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

【4】

氏　　名	野　田　剛　広（のだ たけひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２３２７８　号
学位授与年月日	平成21年６月16日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学　位　論　文　名	Activation of Wnt/β-catenin signalling pathway induces chemoresistance to interferon-α/5-fluorouracil combination therapy for hepatocellular carcinoma （Wnt/βーカテニンシグナル活性化による肝細胞癌に対するIFN/5-FU併用療法の治療抵抗性の誘導）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　森　　正樹 （副査） 教　授　福澤　正洋　　教　授　林　　紀夫

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

進行肝細胞癌に対するインターフェロン(IFN)-αと5-FUの併用化学療法は有効な治療法である。しかしながら、その奏効率は約40%であり、現在までに本治療法の抗腫瘍効果と癌部におけるIFNレセプター(IFNAR2)の発現が有意に相関することを報告してきた。また、IFNAR2陽性肝細胞癌であっても治療抵抗性を示す症例が存在し、本治療法の効果予測に関する新たなバイオマーカーの同定は重要課題である。本研究においては、IFNAR2陽性肝細胞癌に対するIFN/5-FU併用療法の抵抗性に関する機序の解明と治療抵抗性マーカーの同定を目的とする

〔　方法ならびに成績　〕

1)進行肝細胞癌減量肝切除例における網羅的遺伝子発現解析・Pathway解析

進行肝細胞癌に対し減量肝切除を施行し、残存する腫瘍に対しIFN/5-FU併用療法を施行した症例30例中、IFNAR2陽性肝細胞癌18例（奏効例9例、非奏効例9例)を対象とした。ヒト全遺伝子型DNAチップ(Ace-Gene Human 30K)を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、治療抵抗性関連遺伝子群としての161遺伝子を同定した。この161遺伝子群について、Ingenuity Pathway解析を行い、Wnt/β-cateninシグナルが治療抵抗性に関与するPathwayであることが確認された。

2)減量肝切除例におけるEp-CAMの発現とIFN/5-FU併用療法の抗腫瘍効果。

治療抵抗性関連遺伝子群の中で、TACSTD1はWnt/β-cateninシグナルの標的遺伝子の一つであり、Ep-CAM蛋白をコードしている。先述した肝切除標本を用いてqRT-PCRと免疫組織染色を行った。qRT-PCRと遺伝子発現解析の結果には、有意な相関があり(p=0.0107)、免疫組織染色の結果、Ep-CAMは癌細胞の細胞膜上に発現を認めた。また、30例中6例のEp-CAM陽性例は全例非奏効例であった。

3)肝癌細胞株におけるWnt/β-cateninシグナルに対するGSK-3β阻害剤を用いた検討
ヒト肝癌細胞株(PLC/PRF/5, HuH7, HLE, HLF, HepG2, Hep3B)におけるEp-CAMの発現をWestern Blot法にて検討したところ、HuH7, HepG2,Hep3Bの3株において陽性であった。これら3株の中でIFNAR2陽性肝癌細胞株(HuH7)を用いて、Wntシグナルの活性化作用を示す選択的GSK-3β阻害剤；BIO(6-bromoindirubin-3'-oxime)の投与によるWntシグナルの転写活性、標的遺伝子の発現状況、蛋白発現の変化をルシフェラーゼアッセイ, qRT-PCR, Western blot法にて検討した。その結果、Wntシグナルの転写因子であるTCF/LEFの転写活性は、BIO投与により濃度依存性に増加を認めた。さらにWntシグナルの標的遺伝子(TACSTD1, AXIN2, MYC, TCF3, CCND1)は、BIO投与により1.3倍から7.6倍に発現の増強を認め、Ep-CAMやc-MYCの蛋白発現も濃度依存性に増加した。

4)肝癌細胞株におけるBIO投与によるIFN/5-FU併用療法の感受性変化と機序
肝癌細胞株(HuH7)においてBIO投与によるIFN/5-FU併用療法の増殖抑制効果の変化をMTT法により検討した。BIOを投与することにより22.3%から8.6%(5-FU;0.5μg/ml, IFN-α;500U/ml)へ増殖抑制効果の減弱を認めた(p=0.0012)。さらに、この増殖抑制効果減弱の機序に関して、DNA合成をBrdU ELISA法にて、細胞周期をFlow cytometryにて検討した。BrdUの取り込み率は、IFN/5-FUに加えてBIOを投与することにより、0.312から0.458と増加し(p=0.007)、DNA合成阻害効果の低下を認めた。細胞周期解析においては、IFN/5-FUによりS期の割合が69.4%(24h)に増加するのに対し、BIOの投与によりS期の割合が34.9%に低下し、IFN/5-FUによるS期における細胞周期遅延効果の減少が認められた。

〔　総　　括　〕
網羅的遺伝子発現解析とネットワーク解析の結果、IFN/5-FU併用療法の治療抵抗性とWnt/β-cateninシグナルの関与が明らかになった。また、その機序としてDNA合成阻害効果や細胞周期遅延効果への影響を確認し、さらにWnt/β-cateninシグナルの標的遺伝子であるEp-CAMは、IFN/5-FU併用療法における治療抵抗性のマーカーとなりうることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、肝細胞癌に対する有効な治療法の一つであるIFN/5-FU併用療法の治療成績向上のために、抗腫瘍効果の機序解明と効果予測に関する新たなマーカーの同定を目的とするものである。まず切除標本における網羅的遺伝子発現解析・Pathway解析によりWnt/β-cateninシグナルが治療抵抗性に関与することを確認し、免疫組織染色の結果、Wntシグナルの標的遺伝子であるEp-CAMが治療抵抗性のマーカーとなりうることを見出した。さらに細胞株において、GSK-3β阻害剤によるWntシグナルの活性化とIFN/5-FU併用療法の増殖抑制効果の減弱を確認し、その機序としてDNA合成阻害効果や細胞周期遅延効果への影響を明らかにした。これらの結果より、IFN/5-FU併用療法の治療抵抗性克服の可能性と本治療法の治療効果予測によるオーダーメイド治療等への臨床応用と発展が十分に期待される。以上より、本論文は学位に値すると考える。