The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	A Histone Deacetylase Inhibitor Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition and Attenuates Chemoresistance in Biliary Tract Cancer
Author(s)	阪本, 卓也
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/55799
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	阪本　卓也
論文題名 Title	A Histone Deacetylase Inhibitor Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition and Attenuates Chemoresistance in Biliary Tract Cancer (ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は胆道癌において上皮間葉転換と化学療法抵抗性を抑制する)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

胆道癌は外科的切除以外に根治的治療法が存在しない予後不良な疾患であり、切除不能症例にはGemcitabine（以下GEM）を主体とした化学療法が行われているが、十分な効果は得られていない。胆道癌の治療成績向上のためには、化学療法抵抗性の機構解明とともに、有効な新規治療戦略の開発が必要である。

近年、上皮間葉転換（epithelial-mesenchymal transition；以下EMT）が、癌の転移や化学療法抵抗性に関与する因子として注目されている。胆道癌では、EMTの誘導に関わる代表的サイトカインであるTGF-βが、GEM耐性株において高発現していたと報告されている。また、EMTは可逆性の変化であることから、ヒストン修飾などのエピジェネティクスに関わる因子が関与している可能性がある。本研究では、EMTとの関連性が報告されているヒストン脱アセチル化酵素（histone deacetylase；以下HDAC）阻害剤が、胆道癌におけるEMTおよび化学療法抵抗性に与える影響について検討した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

本研究では、胆道癌細胞株であるMzChA-1とTFK-1およびこれらの細胞株をGEMに反復曝露し樹立したGEM耐性株（MzChA-1_GR、TFK-1_GR）を使用した。HDAC阻害剤は、多くの臨床試験で用いられているvorinostatを選択した。

親株とGEM耐性株におけるclass I HDAC（HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8）のmRNAレベルでの発現をqRT-PCR法で比較したところ、全てのHDACの発現がGEM耐性株で上昇していた。HDAC活性についても、Enzyme-Linked Immunosorbent Assayで比較したところ、親株と比較してTGF-β曝露株とGEM耐性株において活性が上昇していた。

GEM耐性株では親株と比較してTGF-βが高発現しており、GEM耐性株に対してTGF-βをノックダウンしたところ、EMTが阻害され、薬剤感受性試験（MTT assay）においてGEM耐性の減弱を認めた。

EMTが誘導された細胞株に対するvorinostatの効果を調べるため、EMT関連因子の発現変化とGEM耐性の変化をqRT-PCRおよびMTT assayを用いて検討した。親株をTGF-βに曝露することでEMTおよびGEM耐性が誘導されたのに対し、vorinostatとTGF-βに同時に曝露した場合、EMTおよびGEM耐性の誘導はみられなかった。GEM耐性株をvorinostatに曝露した場合も、EMTは抑制され、GEM耐性の減弱を認めた。vorinostatがEMTを抑制する機序を明らかにするため、TGF-βのシグナル伝達分子であるSMAD2、SMAD3、SMAD4の発現についてwestern blottingを用いて比較検討した。親株、TGF-β曝露株およびTGF-β + vorinostat曝露株において、細胞全体および核でのSMAD4の発現についてwestern blottingを行い比較したところ、細胞全体ではSMAD4の発現に差を認めなかった。核蛋白においては、親株と比較してTGF-β曝露株でSMAD4の発現上昇がみられ、TGF-β +vorinostat曝露株ではこのような発現上昇はみられなかった。SMAD2、SMAD3についても同様の検討を行った結果、p-SMAD2およびp-SMAD3の発現は、TGF-β曝露株のみ核における発現上昇がみられた。

MzChA-1とMzChA-1_GRをNOD/SCIDマウスの皮下に注射することで親株とGEM耐性株の皮下腫瘍モデルを作成し、*in vivo*におけるvorinostatの効果を検討した。親株の皮下腫瘍モデルでは、GEM単剤群とGEM + vorinostat併用群で生存期間に有意な差はみられなかった。これに対し、GEM耐性株の皮下腫瘍モデルでは、GEM単剤群と比較してGEM + vorinostat併用群で生存期間の有意な延長を認めた。GEM耐性株の皮下腫瘍モデルにおいて、増大した皮下腫瘍と転移巣（肺）の腫瘍組織を採取し、SMAD4の免疫組織化学染色を行った。その結果、皮下腫瘍、転移巣共にGEM単剤群では核が強く染色されたのに対し、GEM + vorinostat併用群では核はほとんど染色されなかった。

〔総　括(Conclusion)〕

胆道癌においてvorinostatは、TGF-βのシグナル伝達分子であるp-SMAD2、p-SMAD3、SMAD4の核内移行を阻害することでEMTを抑制し、GEM耐性を減弱させる可能性が示唆された。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　阪本　卓也

		（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	奥山 宏臣
	副　査	大阪大学教授	梅下 浩司

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。

（背景と目的）

上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) は癌の化学療法抵抗性に関与し、TGF-β1により誘導される。本研究では、EMTとの関連性が報告されているヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase ; HDAC) 阻害剤が、胆道癌におけるEMTおよび化学療法抵抗性に与える影響とその機序について検討した。

（方法と結果）

胆道癌細胞株2種と同細胞株から樹立したGEM耐性株を使用し、HDAC阻害剤としてvorinostatを用い検討を行った。GEM耐性株では親株と比較してTGF-β1が高発現していた。EMT関連因子の発現比較およびGEM感受性試験の結果から、vorinostatはGEM耐性株において、EMTを抑制しGEM耐性を減弱させることを示した。さらに、ウェスタンブロット法を用いてTGF-β1のシグナル伝達分子であるSMAD4の発現を比較し、vorinostatがSMAD4の核内移行を抑制することを示した。胆道癌皮下腫瘍モデルを用いた実験では、GEM耐性株を皮下移植したマウスにおいて、vorinostatとGEMの併用群では、GEM単剤投与群と比較して生存期間の延長を認めた。

（結語）

胆道癌においてvorinostatは、TGF-β1のシグナル伝達阻害を介してEMTを抑制し、GEM耐性を減弱させる可能性が示唆された。

上記内容は胆道癌における化学療法抵抗性機構の解明および新規治療の開発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。