The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | A CD13 inhibitor, ubenimex, synergistically enhances the effects of anticancer drugs in hepatocellular carcinoma |
| Author(s) | 山下, 雅史 |
| Citation | 大阪大学, 2017, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/67035 |
| 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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

# 論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　　山下　雅史

| | | （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 | 野口道三郎 |
| | 副　査 | 大阪大学教授 | 竹原徹郎 |

## 論文審査の結果の要旨

癌幹細胞を標的とした治療法確立のため、CD13阻害薬ウベニメクス(Ube)と抗癌剤を併用し、その抗腫瘍効果と作用機序について検討した。

2種のヒト肝癌細胞株に、5-フルオロウラシル(5-FU)、シスプラチン(CDDP)、ドキソルビシン(DXR)、ソラフェニブ(SOR)を投与すると、いずれもCD13陽性細胞の割合が増加した。Isobologramを用いたUbeとの相互作用は、5-FU、CDDP、DXRとは相乗効果を、SORとは相加効果を示した。その作用機序として、UbeはG0/G1期の細胞の割合を減少させ、5-FU、CDDP、DXRとの併用により活性酸素種(ROS)を上昇させることでアポトーシス誘導を増強した。

肝癌においてUbeと5-FU、CDDP、DXRの併用療法は、細胞周期制御とROS上昇を介したアポトーシス誘導により相乗的に抗腫瘍効果を増強することが示唆された。

以上、肝癌の癌幹細胞を標的とした治療に関する本研究は、癌研究における新たな知見と考えられ、学位に値すると考える。

# 論　文　内　容　の　要　旨
# Synopsis of Thesis

| 氏　名<br>Name | 山下　雅史 |
|---|---|
| 論文題名<br>Title | A CD13 inhibitor, ubenimex, synergistically enhances the effects of anticancer drugs in hepatocellular carcinoma<br>(CD13阻害薬ウベニメクスは肝癌において抗癌剤の抗腫瘍効果を相乗的に増強する) |

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

肝細胞癌は、肝切除やラジオ波焼灼療法といった根治的治療を施行しても高率に再発・転移をきたし、さらに各種抗癌剤に対しても抵抗性を有しており、その予後は不良である。近年、再発・転移や治療抵抗性に癌幹細胞(Cancer stem cells; CSC)が重要な役割を果たすことが報告されている。CSCは、自己複製能と多分化能を有する癌の根源に存在する細胞であり、CSCを標的とした治療法の開発は癌の根治につながると考えられる。我々は、CD13が肝細胞癌におけるCSCのマーカーであると同時に、活性酸素種(Reactive oxygen species ; ROS)の排泄を司る酵素としての機能を有することを報告した（Haraguchi N, et al. J Clin Invest 2011）。本研究では、肝細胞癌におけるCSCを標的とした治療法を確立するため、機能的CSCマーカーであるCD13の阻害薬を用いて、従来の抗癌剤および分子標的治療薬との併用による抗腫瘍効果の増強およびその作用機序について検討した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

本研究では、ヒト肝癌細胞株HuH7、PLC/PRF/5を用いて、CD13阻害薬であるウベニメクスと、肝細胞癌に対して臨床で用いられる抗癌剤および分子標的治療薬としてフルオロウラシル(5FU)、シスプラチン(CDDP)、ドキソルビシン(DXR)、ソラフェニブ(SOR)の4種類との併用効果を検討した。

まず、ウベニメクスおよび各薬剤が、肝癌細胞株におけるCD13の発現に与える影響について、Flow Cytometryを用いて評価した。薬剤投与前のCD13発現は、HuH7で3.0%、PLC/PRF/5では2.8%であったが、4種の薬剤を72時間暴露したところ、CD13発現はHuH7において16.6-35.9%、PLC/PRF/5において13.9-20.8%と有意に増加した。ウベニメクスをそれぞれの薬剤と併用したところ、CD13発現はHuH7において7.7-13.8%、PLC/PRF/5において6.4-11.1%と単剤投与時と比較して有意に減少し、ウベニメクスは抗癌剤や分子標的治療薬により増加したCD13の発現を抑制することが示された。

次に、ウベニメクスと、それぞれの薬剤との併用による抗腫瘍効果について、72時間のMTTアッセイで検討した。4剤いずれにおいても、ウベニメクスと併用することにより、単剤投与時と比較して有意にCell viabilityが低下した。さらに、ウベニメクスと各薬剤の併用効果を検討するため、MTTアッセイの結果からCombination Indexを算出した。5FU、CDDP、DXRとのCombination Indexは、HuH7ではそれぞれ0.49、0.59、0.68、PLC/PRF/5では0.64、0.59、0.70といずれも0.8未満であり、相乗効果を有することが示された。一方、SORとのCombination Indexは、HuH7では1.17、PLC/PRF/5では0.92と0.8以上であり、相加効果を有するにとどまった。

併用効果増強の作用機序を解明するため、細胞周期とアポトーシスについて検討した。細胞周期解析では、4剤いずれも単剤投与時と比較して、ウベニメクスと併用することでG0/G1期の割合が有意に低下した。また、5FU単剤では、S期の増加、DXR単剤ではG2/M期の増加を認めたが、ウベニメクスと併用することでその効果がさらに増強された。

Annexin Vアッセイを用いたアポトーシスの評価では、5FU、CDDP、DXRの単剤投与により、HuH7で6.6-9.6%、PLC/PRF/5で6.9-9.0%のAnnexin V陽性細胞を認めたが、ウベニメクスを併用することで、その割合はHuH7で10.7-13.4%、PLC/PRF/5で8.9-11.9%と有意に増加しアポトーシスの増強を認めた。一方、SOR単剤投与とウベニメクスの併用では有意なアポトーシスの増強は認めなかった。さらに、アポトーシスを誘導する機序として、細胞内のROS濃度をCell ROX Deep Red Reagentを用いてFlow Cytometryで検討したところ、5FU、CDDP、DXRでは単剤投与と比較して、ウベニメクス併用により有意に細胞内のROS濃度の上昇を認めたが、SORはウベニメクスと併用しても細胞内ROS濃度の上昇を認めなかった。

〔総　括(Conclusion)〕

肝癌細胞株において、ウベニメクスによりCD13活性を阻害することで細胞内ROS濃度が上昇し、5FU、CDDP、DXRと併用することでアポトーシスの誘導を介して相乗的に抗腫瘍効果を増強することが示された。