

Title	Poly(ethylene glycol)-poly(lysine) block copolymer-ubenimex conjugate targets aminopeptidase N and exerts an antitumor effect in hepatocellular carcinoma stem cells
Author(s)	俊山, 礼志
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/73475
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 俊山 礼志

	(職)	氏名
論文審査担当者	主査 大阪大学教授	土岐祐一郎
	副査 大阪大学教授	森田 真一
	副査 大阪大学教授	石井 優

論文審査の結果の要旨

本研究では肝細胞癌の癌幹細胞マーカーであり、活性酸素種の分解を司る酵素Aminopeptidase N(以下APN)と同一であるCD13に着目し、その阻害薬であるUbenimex(以下Ube)を改良して肝細胞癌治療に有用であるかを検証した。肝細胞癌細胞株を用いて改良型Ubeと通常型Ubeの細胞増殖抑制効果・酵素活性・活性酸素種濃度・アポトーシス率と、他の抗癌剤との併用効果について比較検討したところ、改良型UbeはCD13/APNの酵素活性を阻害し、活性酸素種を増加させることによりアポトーシスを誘導しており、他の抗癌剤との併用で相乗効果を示すことを明らかにした。本研究ではUbeが抗腫瘍効果を発揮するメカニズムを明らかとし、さらに改良型Ubeを用いて、より高い抗腫瘍効果を得ることを可能にしたと評価される。審査の結果、本論文の筆者は、博士(医学)の学位授与に値する。

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏名 Name	俊山 礼志
論文題名 Title	Poly(ethylene glycol)-poly(lysine) block copolymer-ubenimex conjugate targets aminopeptidase N and exerts an antitumor effect in hepatocellular carcinoma stem cells (PEG-ポリリジンブロックコポリマーとウベニメクス複合体は肝細胞癌幹細胞においてアミノペプチダーゼNを標的とし、抗腫瘍効果を発揮する)
論文内容の要旨(Abstract of Thesis)	
〔目的(Purpose)〕 肝内に多発する肝細胞癌や遠隔転移を伴う肝細胞癌の治療法として、肝動脈化学塞栓療法や化学療法が行われるが、これらの治療に抵抗性を示す症例も多く、予後は依然として不良である。この治療抵抗性においては癌幹細胞(Cancer stem cells; CSC)の関与が示唆されており、癌の根源であるCSCを治療することが根治に繋がると考えられている。これまでの研究により、CD13は肝癌のCSCマーカーであり、かつ活性酸素種(Reactive oxygen species; ROS)の排泄を司る酵素Aminopeptidase N(APN)と同一であることが報告されている。さらに、CD13/APNの阻害薬であるUbenimex(Ube)により細胞内ROS濃度が上昇し、フルオロウラシル(5FU)、シスプラチン(CDDP)、ドキソルビシン(DXR)などの抗癌剤と併用することで相乗的に抗腫瘍効果が認められることが報告されてきた。現在、Ubeは白血病などに対して臨床的に使用されているが、その際の投与量で得られる血液中濃度は肝癌細胞株に対する50%阻害濃度の10%以下であり、肝細胞癌に対する抗腫瘍効果は見込めないことが示唆されている。そこで本研究では、poly-lysineの側鎖をUbeで置換したものにpolyethylene glycolを修飾させた改良型Ube2種(40か所の側鎖の35%、50%をそれぞれUbeで置換したものが、より低濃度でも通常型Ubeと同等以上の抗腫瘍効果が得られるかどうかを検証することを目的とした。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 肝癌細胞株HuH7、HepG2を用いて改良型Ube2種と通常型Ubeの抗腫瘍効果をMTTアッセイにて比較した。高濃度(200 μ g/ml)では効果に差がみられなかったが、低濃度(25 μ g/ml)では改良型Ube2種でより強い抗腫瘍効果を示した。なお改良型Ube2種間では差が認められなかった為、以降の実験は改良型Ubeとして側鎖50%置換型のみを用いた。次に、改良型Ubeによる酵素活性、ROS濃度、アポトーシス率の変化について検討した。改良型Ube、通常型Ubeを4時間曝露した後のCD13/APN酵素活性は、HuH7では改良型Ubeが53.6%、通常型Ubeが65.6%で、HepG2では改良型Ubeが24.7%、通常型Ubeが77.0%であり、いずれの細胞株においても改良型Ubeにより有意に酵素活性が低下していた。改良型Ube、通常型Ubeを6時間曝露した後のROS濃度は、HuH7ではコントロール(無治療)が5.6%、改良型Ubeが20.9%、通常型Ubeが10.3%であり、HepG2ではコントロールが6.3%、改良型Ubeが15.2%、通常型Ubeが11.7%と、いずれの細胞株においても、改良型Ubeで有意にROS濃度上昇を認めた。アポトーシスの評価はAnnexin Vを用いてFlow cytometryを用いて測定した。各種薬剤に12時間曝露後のアポトーシス陽性細胞は、HuH7では改良型Ubeは17.7%、通常型Ubeは6.3%、コントロール(無治療)は3.8%で、HepG2では改良型Ubeは26.3%、通常型Ubeは6.4%、コントロール(無治療)は5.1%であり、いずれの細胞株においても改良型Ubeによりアポトーシスの増加を認めた。次に、shRNAを用いてCD13/APNの発現をノックダウンした細胞株を樹立した。qRT-PCRではノックダウン効率が79.1%であり、MTTアッセイでは、改良型Ubeに対するIC50が、親株で11.51 μ g/ml、ノックダウン株で37.98 μ g/mlであり、改良型Ubeの抗腫瘍効果が親株に比べてノックダウン株で有意に低下していることが確認された。次に改良型Ubeの抗腫瘍効果と抗癌剤との併用における上乗せ効果について検証を行った。MTTアッセイの結果からCombination Indexを算出したところ、HuH7、HepG2のいずれの細胞株においても、改良型Ubeと各種抗癌剤(5FU,CDDP,DXR)の併用において相乗効果を認めた。	
〔総括(Conclusion)〕 改良型Ubeは、低濃度においても通常型Ubeと比較して高い抗腫瘍効果を認めており、その機序はCD13/APNの酵素活性阻害、ROS濃度の上昇、アポトーシスの増加であった。改良型Ubeは、従来の抗癌剤との併用により相乗効果を認めており、肝細胞癌に対するCD13を標的とした新規治療薬として臨床応用されることが期待される。	