

氏名（本籍） みやた こうへい  
**宮田 康平** (大分県)

学位の種類 博士（医学）

報告番号 甲第 1501 号

学位授与の日付 平成 26 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）

学位論文題目

Transcriptional factor SP1 contributes to defence mechanism against treatment of irinotecan via promoting HB-EGF expression in ovarian clear cell carcinoma.

（転写因子 SP1 は HB-EGF の発現亢進を介して卵巣明細胞腺癌の塩酸イリノテカン療法に対する防御機構に寄与する。）

論文審査委員（主査）	福岡大学	教授	宮本 新吾
（副査）	福岡大学	教授	岩崎 宏
	福岡大学	教授	田村 和夫
	福岡大学	教授	田中 俊裕

# 博士学位申請論文内容の要旨

博士学位申請論文名

Transcriptional factor SP1 contributes to defense mechanism against treatment of irinotecan via promoting HB-EGF expression in ovarian clear cell carcinoma.

(日本語訳) 転写因子 SP1 は HB-EGF の発現亢進を介して卵巣明細胞腺癌の塩酸イリノテカン療法に対する防御機構に寄与する。

博士学位申請論文キーワード

卵巣癌	HB-EGF
SP1	塩酸イリノテカン

博士学位申請者氏名 宮田 康平

(平成25年10月10日提出)

## 要旨

卵巣癌は最も予後の悪い婦人科悪性腫瘍である。特に明細胞腺癌は化学療法抵抗性な組織型の一つであり、新たな治療法の開発が望まれている。近年明細胞腺癌には卵巣癌で一般的に用いられるパクリタキセルやシスプラチンよりも塩酸イリノテカンを用いた化学療法が効果的であることが報告されている。一方で、ヘパリン結合性上皮系増殖因子系増殖因子 (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor; HB-EGF) は癌の増殖や浸潤、化学療法抵抗性に寄与しており、有望な治療標的分子である。塩酸イリノテカンの活性代謝物である SN38 は HB-EGF の発現を亢進させ、化学療法抵抗性に寄与していることが知られている。本研究では、SN38 による HB-EGF の転写亢進のメカニズムを明らかにすることを目的とした。4 種類の卵巣明細胞腺癌細胞株 (ES-2、OVTOKO、RMG-II、OVISE) において、上皮系増殖因子レセプターのリガンドとして中心的に機能を果たすと考えられる HB-EGF と Amphiregulin を中和抗体にて抑制すると、どちらも抗腫瘍効果を示した。上清中の HB-EGF を Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 法にて測定すると、抗 HB-EGF 抗体を投与した場合、HB-EGF のみでなく Amphiregulin の発現も抑制することから、HB-EGF を抑制することの方がより抗腫瘍効果が得られると考えられた。一方で、卵巣明細胞腺癌細胞株ではパクリタキセルやシスプラチンよりも SN38 が有効であった。SN38 投与下の卵巣明細胞腺癌細胞株における HB-EGF の mRNA は real-time PCR 法で増加していることが示され、上清中の濃度は増加していた。さらに、HB-EGF 選択的阻害薬である CRM197 と SN38 の併用は、TUNEL 法によりアポトーシスの増加が確認できた。これらの結果から、SN38 に反応して HB-EGF の発現が亢進する機構は抗癌剤に対する防御機構の一部であることが示唆された。そこで、HB-EGF の発現亢進に寄与する転写機構を同定するために、*HB-EGF* 遺伝子上流の約 2800 塩基をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入し、5' 側より段階的に欠損させたレポーターベクターを用いてプロモーター解析を行った。ES-2 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイでは、*HB-EGF* 遺伝子の転写開始点より上流-124 塩基から-178 塩基 (転写開始点を+1 とする) の GC 含有率の高い領域に転写調節エレメントの存在が示唆された。同領域を持つレポーターベクターは SN38 によってもルシフェラーゼ活性が増加し、このレポーターベクターを用いて 293T 細胞へ SP1 発現ベクターとともに遺伝子導入すると発光度が増強した。転写因子結合予測アルゴリズム (MatInspector、AliBaba 2.1) を用いた *In silico* 解析により、この塩基配列に結合する転写因子の候補として SP1 が挙げられた。クロマチン免疫沈降法により非薬剤投与時には SP1 は HB-EGF 遺伝子のプロモーターに結合していなかったが、SN38 を投与した卵巣明細胞腺癌株においては SP1 が HB-EGF 遺伝子のプロモーターに結合していることを確認した。Small interfering RNA 法により SP1 の発現を抑制すると、SN38 による HB-EGF の発現亢進が減少した。また、比較的 SN38 抵抗性であった RMG-II 細胞を用いて、同様の方法により SP1 を抑制した SN38 の感受性が亢進した。これらの結果から、HB-EGF の発現亢進は卵巣明細胞腺癌において塩酸イリノテカンに対する防御機構に寄与しており、このメカニズムには SP1 による転写調節が関与していることが示唆された。

## 審査結果の要旨

本論文は卵巣癌明細胞腺癌が塩酸イリノテカン療法に対する防御反応の一つとして HB-EGF の発現を亢進させることを証明した。この機構において、転写因子 SP1 が HB-EGF のプロモーターに直接結合し、転写を亢進させることを同時に証明したものである。一方で、同細胞株において HB-EGF が治療標的分子として有効であり、CRM197 と塩酸イリノテカンの活性代謝物である SN38 を併用することで、HB-EGF による防御反応が抑制され、相乗効果が得られることを証明した。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さは以下の通りである。

### 1. 斬新さ

卵巣明細胞腺癌において、SN38 により HB-EGF の発現が亢進する過程において、転写因子 SP1 が HB-EGF のプロモーターに直接結合し、転写を亢進させることを初めて証明したものである。

### 2. 重要性

本研究の結果は、卵巣明細胞腺癌の治療戦略において、塩酸イリノテカン療法に HB-EGF 選択的阻害薬である CRM197 を併用することで、抗腫瘍効果を増強させることを示唆するものである。また、同治療薬に対する癌の防御反応について詳細に解析を行うことで、より有効な患者を選定できるマーカーの樹立に寄与するものである。

### 3. 実験方法の正確性

本研究に用いた実験方法は細胞実験においていずれも確立された方法であり、実験も複数回行って同様の結果が得られていることから再現性があることも示しており、十分な正確性がある。

### 4. 表現の明確さ

本論文は適切な表現を用いて、明確に記載された論文である。

### 5. 主な質疑応答

Q: 婦人科領域で卵巣以外の明細胞腺癌も同様の形質を示すと考えてよいのか？

A: 卵巣明細胞腺癌と他臓器明細胞腺癌は抗癌剤抵抗性である性質は同様の傾向を示すものと考えられる。但し、本研究結果である HB-EGF の発現機構については検討を行っていないため、不明である。

Q: 11 種類の細胞株の中からどのような根拠で 4 種類の細胞株を選択したのか？また、実験に用いた 4 種類以外の細胞でも同様の形質を示すと考えてよいか。

A: 上皮系増殖因子 (EGF) ファミリーの発現に着目し、HB-EGF を優位に発現する 2 細胞と、癌で高値であるとされる AREG も発現している 2 細胞を選択した。他の細胞株においては、同様の形質を示すと考えることが一般的である。

Q: HB-EGF の発現の程度によって抗 HB-EGF 中和抗体の効果が決まっているのか？

A: HB-EGF 抑制効果は HB-EGF の発現量が多い程効果が高いと考えられる。HB-EGF を優位に発現する細胞株ではより効果が高いことから、特に HB-EGF に依存した増殖を示す癌に有効であると考えられる。

Q: HB-EGF の発現が亢進しないにも関わらず、抗癌剤の効果が得られないのはなぜか？

A: HB-EGF のみが抗癌剤抵抗性に関わる分子であるわけではないため、他の分子機構を通じて他の薬剤への抵抗性を示したと考えられる。むしろ、SN38 では抗癌剤の効果が得られたので、これに対する防御反応として HB-EGF の発現が亢進したものと考えられる。

Q: SN38 の抗腫瘍効果が HB-EGF の発現が最も高い ES-2 細胞で得られたのか？

A: HB-EGF の発現のみが異なっているわけではなく、かつ HB-EGF のみが抗癌剤の感受性を決定している訳ではないためと考えられる。

Q: HB-EGF の SP1 結合配列を欠失させたプロモーターをもつレポーターを用いたルシフェラーゼアッセイの結果で、2 カ所を欠失させても発光度が完全に抑制されず、半分程度の抑制であるのはなぜか？

A: 欠失させなかった領域にも何らかの転写因子が結合し、ルシフェラーゼの転写が起きているためと考えられる。今回欠失を導入した塩基配列は 1 つの転写因子結合予測

アルゴリズムを用いた結果から SP1 が結合すると予測された塩基配列である。このため、SP1 や他の転写因子が変異を導入していない配列に結合し、ルシフェラーゼを発現させたものとする。

**Q:** 塩酸イリノテカンによる HB-EGF の発現亢進に際して、どのような制御機構が SP1 の転写活性を亢進していると考えられるか？

**A:** 細胞のアポトーシスを制御する p53 の上流にある ataxia telangiectasia mutated (ATM) が SP1 の修飾に寄与していることが考えられる。塩酸イリノテカンはトポイソメラーゼ I 阻害薬であり、DNA の複製や修復にを阻害する。このため、p53 経路が活性化していることが予想されるが、このうち ATM は SP1 のリン酸化を促し、転写活性を亢進させることが報告されている。

**Q:** TUNEL 法で同定した SN38 と CRM197 によるアポトーシスは有意な程度の細胞障害を示すと考えてよいか？

**A:** 細胞株を用いた TUNEL 法によるアポトーシスアッセイでは、通常 10% 以上のアポトーシスを認めることができれば、有意であると考えられる。

以上の発表および討議の結果を踏まえ、審査員で協議した結果、本論文は学位論文に値すると評価された。