

# 学 位 論 文 の 要 旨

三 重 大 学

所 属	三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻 臨床医学系講座 代謝内分泌内科学分野	氏 名	井上 知紗
<p>主論文の題名</p> <p>The Fairy Chemical Imidazole-4-carboxamide Inhibits the Expression of Axl, PD-L1, and PD-L2 and Improves Response to Cisplatin in Melanoma</p> <p>主論文の要旨</p> <p>世界の主要な死因となっている癌に対し、キノコから放出されるフェアリー化合物 (fairy chemical) が有益な効果を有することが報告されている。</p> <p>本 研 究 で は fairy chemical の 2-azahypoxanthine(AHX) 、 2-aza-8-oxohypoxanthine(AOH)、imidazole-4-carboxamide(ICA)が、悪性黒色腫の細胞の Axl および免疫チェックポイント分子の発現を抑制することにより、抗癌作用をきたすか検討を行った。</p> <p>シスプラチンは、B16F10 細胞で、PD-L1(programmed cell death protein ligand 1) の発現を増加させることが知られているが、高用量の ICA が、B16F10 細胞におけるシスプラチンによって誘導される PD-L1 発現を減少させ、ICA が melanoma におけるシスプラチンの抗腫瘍活性を改善することが示唆された。</p> <p>また B16F10melanoma 細胞株と melanoma 移植モデルのマウスを使用し、シスプラチン単独またはシスプラチンと ICA の併用療法による腫瘍抑制効果を検証した。未治療またはシスプラチンのみで治療したマウスと比較して、シスプラチンと ICA を組み合わせたものは腫瘍体積を大幅に減少させた。in vitro でも ICA とシスプラチンの組み合わせで処理した細胞はシスプラチンのみで処理した細胞と比較しアポトーシスの有意な増加を示し、ICA は MTT(3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) アッセイでシスプラチンの IC50(50% inhibitory concentration)を大幅に改善した。in vivo では、シスプラチンと ICA で治療したマウスはシスプラチンのみで治療したマウスと比較し、腫瘍周囲の CD3 および CD8 の T 細胞の増加を認め、ICA の全身投与が melanoma 細胞に対する T 細胞応答を増加させることが示唆された。</p> <p>Fairy chemical (AHX、AOH、ICA)が B16F10melanoma 細胞の Axl、PD-L1、PD-L2 の発現を抑制できるかを検証したところ、B16F10 の ICA 刺激で Axl、PD-L1、PD-L2 の相対的な mRNA 発現を有意に減少させた。ヒト肺腺癌細胞株 A549 細胞でも検証を行い、AHX、ICA で刺激された A549 細胞は Axl、PD-L1、PD-L2 の mRNA 発現を有意に減少させた。Fairy chemical のうち特に ICA が Axl と免疫チェックポイント分</p>			

子の mRNA 発現を阻害することが示された。また、Axl と免疫チェックポイント分子の蛋白発現をウエスタンブロットティングおよびフローサイトメトリによって評価したところ、ICA は Axl、PD-L1、PD-L2 の蛋白発現を有意に阻害し、AOH は PD-L1 の蛋白発現を有意に阻害した。

また、ICA の用量に応じた Axl、PD-L1、PD-L2 の発現を、RT-PCR、フローサイトメトリで評価を行ったところ、Axl、PD-L1、PD-L2 の発現を用量依存的に抑制することが示された。

本研究では fairy chemical のうち ICA ががん細胞での免疫チェックポイント分子 (PD-L1、PD-L2) と Axl の発現を阻害し、実験マウスにおける melanoma 移植片の増殖を阻害することを実証した。

シスプラチンと ICA を組み合わせた治療はシスプラチン単独で治療されたマウスと比較し、マウスの melanoma 移植片の腫瘍増殖を有意に減少させ、ICA がシスプラチンの抗腫瘍活性を促進することが示唆された。

Axl が過剰に活性化することは癌に有害な影響を及ぼすことが知られており、Axl 受容体チロシンキナーゼの刺激は、免疫抑制性サイトカインの分泌、PD-L1、PD-L2 の分泌、骨髄由来サプレッサー細胞の浸潤、T 細胞の阻害を促進し、免疫応答を阻害することで、悪性腫瘍患者の腫瘍細胞播種の増強、抗癌治療への耐性、予後不良因子となる。

Axl を介したメカニズムに加えて、PD-L1、PD-L2 の過剰発現は JAK/STAT シグナル伝達経路を介し interferon- $\gamma$  によってアップレギュレートされ、Axl、PD-L1、PD-L2 の腫瘍細胞発現に対する ICA の阻害活性がマウス melanoma 移植片での T 細胞の浸潤の増加と ICA の効果を示していると考えられる。Melanoma の異種移植片はシスプラチンに耐性であったが、シスプラチンと ICA の併用療法に反応があった。また、ICA は melanoma 細胞において、シスプラチンによって誘導される PD-L1 のダウンレギュレーションを有意に抑制した。したがってシスプラチンに対する耐性は ICA を介した免疫応答の活性化によって覆されることが考えられる。

本研究から、癌患者におけるシスプラチンとの有望な補助療法として ICA が用量依存的に有益性がある可能性が考えられ、また AHX、AOH などの fairy chemical を組み合わせることでシスプラチンの抗腫瘍反応をさらに増強する可能性も考えられた。