

論文内容要旨

論文題目

BCL2A1 に着目した腎癌のアポトーシス回避機構の解析

責任講座： 腎泌尿器科学講座
氏 名： 八木真由

【内容要旨】(1,200 字以内)

腎癌は、細胞傷害性抗癌剤や放射線治療に対して抵抗性である。現在、転移性腎細胞癌の治療は、血管内皮細胞増殖因子受容体阻害剤、mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害剤、免疫チェックポイント阻害剤が開発・承認されているが、多くの患者で初期耐性や獲得耐性がみられる。本研究では、内因性アポトーシスを調整する BCL2 ファミリータンパクのうち、抗アポトーシス BCL2 ファミリータンパク (BCL2 サブファミリー) が腎癌のアポトーシス回避機構に関与すると仮定し、その作用の解析と阻害効果について検討した。

まず、TCGA データベースを用いて、BCL2 サブファミリーの mRNA 発現量と全生存期間の解析を行った。高発現であることが、有意な OS 短縮を示したのは *BCL2A1* のみであり (P=0.044)、*BCL2A1* が腎癌のアポトーシス回避に関与している可能性が示唆された。腎癌細胞株では、786-O は *BCL2A1* 高発現株、769-P、A-498 は *BCL2A1* 低発現株であり、786-O に対して、siRNA 法を用いて *BCL2A1* をノックダウンすると、有意な細胞生存率の低下を示した。*BCL2A1* 阻害効果を確認するため、汎 BCL2 阻害剤である sabutoclax (*BCL2A1*, *BCL2*, *BCLxL* および *MCL-1* 阻害) をそれぞれの細胞株に添加すると、*BCL2A1* 高発現である 786-O では sabutoclax の濃度依存性に細胞生存率が低下したが、*BCL2A1* 低発現である 769-P、A-498 では、高濃度にしても一定以上の効果が得られなかった。さらに、*BCL2A1* 阻害作用のない AT-101 と比較すると、sabutoclax、*BCL2A1* ノックダウン、*BCL2A1* ノックダウンと AT-101 の併用では、より高度な細胞生存率の低下を引き起こし、腎癌細胞株の生存には、*BCL2A1* が重要であると考えられた。sabutoclax によるアポトーシス誘導を評価するため、WB 法によるカスパーゼ経路の評価、蛍光染色によるミトコンドリア膜電位の低下、カスパーゼ 3/7 陽性細胞の出現、フローサイトメトリー法によるアポトーシス細胞の増加を確認した。いずれの方法においても、sabutoclax によるアポトーシス誘導を示唆する所見は 786-O においてのみ確認された。786-O、A498 を用いたヒト腎癌細胞株皮下移植マウスでは、786-O において sabutoclax の抗腫瘍効果を認めた一方、A-498 では抗腫瘍効果を認めなかった。

以上より、*BCL2A1* 高発現腎癌細胞では、*BCL2A1* が細胞生存に重要な役割を担っており、*BCL2A1* 阻害作用を持つ sabutoclax はカスパーゼ経路依存的にアポトーシスを誘導し、有効な治療薬となる可能性が示唆された。

令和4年12月5日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：八木 真由

論文題目：BCL2A1 に着目した腎癌の^{アポトーシス}~~アポトーシス~~回避機構の解析

審査委員：主審査委員

副審査委員

副審査委員

審査終了日： 令和 4年 12月 5日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

腎細胞癌の治療は、血管内皮細胞増殖因子（vascular endothelial growth factor: VEGF）受容体阻害剤、mammalian target of rapamycin(mTOR)阻害剤、免疫チェックポイント阻害剤が開発・承認されているが、しばしば薬剤耐性が観察される。本研究では、腎癌の薬剤耐性に BCL2 ファミリータンパク、特に BCL2A1 がアポトーシス回避機構に関与すると仮説をたて、その作用の解析と阻害効果について検討した。BCL2A1 を高発現するヒト腎癌細胞株 786-O を用いた検索では、*BCL2A1* をノックダウンすると、細胞生存率が低下し、アポトーシス促進 BCL2 ファミリータンパクである BAK の発現上昇、および抗アポトーシス BCL2 ファミリータンパクである MCL-1、BCL-2 の発現上昇が認められた。BCL2A1 を低発現するヒト腎癌細胞株 769-P、A-498 を用いて *sabutoclax* の効果を検索した結果、いずれも細胞生存率の抑制がみられたが、それらの抑制効果は限定的で、BCL2A1 を高発現する 786-O でのみカスパーゼ経路の亢進、アポトーシス細胞の増加が確認された。また BCL2A1 の阻害作用を有する *sabutoclax* と BCL2A1 阻害作用のない AT-101 を用いて 786-O の細胞増殖抑制効果を比較した結果、AT-101 に *BCL2A1* ノックダウンを併用した群では、*BCL2A1* ノックダウン、*sabutoclax* と同程度の細胞生存抑制効果が得られた。さらに、786-O および A-498 をヌードマウスに移植した検索では、786-O 移植群で *sabutoclax* の抗腫瘍効果を認めたが、A-498 移植群では抗腫瘍効果を認めなかった。以上の結果から、BCL2A1 を高発現する腎癌細胞では、BCL2A1 が細胞生存に重要な役割になっており、BCL2A1 阻害作用を持つ *sabutoclax* は細胞死を誘導することで、有効な治療薬となる可能性が明らかとなった。治療抵抗性を示す腎癌に対する治療標的分子を同定することは臨床的に意義がある研究課題である。本研究は BCL2A1 に着目し、BCL2A1 を高発現するヒト腎癌細胞株 786-O と低発現する 769-P、A-498、さらに BCL2A1 阻害作用を持つ *sabutoclax* と阻害作用のない AT-101 を用いて実験を行い、独創性があり、適切な手順で検証された研究である。しかし臨床的にすべての腎癌では Apoptosis は誘導されているのか、BCL2A1 の発現上昇が実際にどの頻度で観察されるのかについて検討を加えることが望まれる。総合的に、本研究論文は十分な学術的意義があり、適切な研究手法を用いて得られた、医学の進歩に貢献する研究成果を含むことから、学位論文に値すると判断される。