

## 論文の内容の要旨

氏名：榎 田 浩太郎

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：悪性黒色腫細胞に対する Temozolomide と Interferon- $\beta$ 併用療法における抗腫瘍増強効果の検討

悪性黒色腫は、メラノサイトから発生する悪性腫瘍である。治療は早期発見・早期摘出が原則であり、進行期においては、その後の集学的治療が重要である。現在も進行期悪性黒色腫の治療成績は満足できるものではない。本研究では悪性黒色腫細胞に対する Temozolomide (TMZ) と Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) の併用投与における抗腫瘍増強効果を検討した。

5種の悪性黒色腫細胞株 (A-375、CRL-1579、G361、MeWo、SK-MEL-28) を用いて、TMZ単剤、IFN- $\beta$ 単剤、TMZ + IFN- $\beta$ 併用投与の細胞増殖抑制試験を行った。また、MGMT発現量を定量し、O6-Benzylguanine (O6-BG) によるMGMT阻害下での薬剤投与による増殖抑制試験を行った。これらの結果に基づいて2種の悪性黒色腫細胞株 (A375、CRL-1579) を選択し、抗腫瘍効果の機序を flow cytometry (細胞周期の観察、アポトーシスの解析)、Western blotting (細胞周期・アポトーシス・オートファジー関連蛋白の解析)、および qRT-PCR 法 (*p53*, *caspase-3*, *Fas*, *caspase-8* mRNA) を用いて解析した。

増殖抑制試験では、TMZは5種すべてに対して細胞増殖抑制効果を示した。MGMT発現を阻害した増殖抑制試験では、MGMTを発現しているA375細胞に対して、TMZの抗腫瘍効果が増強した。細胞周期の検討では、併用投与8時間では、G0/G1期細胞の割合を増加させ、24時間においてはG2/M期細胞の割合を増加させた。またWestern blottingでは、両細胞において、TMZ単剤の投与によりp53ならびにp21の発現が上昇することが確認された。併用投与でも同様の結果が得られた。さらにA375細胞を用いたp53 mRNA発現解析では、併用投与では、4時間後に、TMZ単剤投与の約1.6倍を示しており、併用療法の効果を裏付けるものと考えられた。アポトーシスに関しては、TMZ単剤によりアポトーシスは誘導され、さらに併用投与では、TMZ単剤よりもアポトーシスの割合が増加した。またWestern blottingでは、アポトーシス関連タンパクの発現増強と、さらにqRT-PCR (A375細胞) による*p53*, *caspas-3* mRNAの増加が観察された。TMZ単剤の投与では両細胞において、p53およびその下流にあるBaxならびにFasの発現が上昇し、TMZによる内因系アポトーシス・外因系アポトーシスの両者の活性化が観察された。併用投与時は特にFasを介した外因系経路の活性化がより増強されている現象が観察された。さらに、併用投与時にA375細胞では*Fas* mRNAの約1.6倍の増加を認め、外因系経路の重要性を示唆した。オートファジーに対しては、TMZ単剤ならびに併用投与で、オートファジーを誘導した。また、A375細胞では、併用投与により、*caspase-8* mRNAの増加が確認でき、アポトーシスとオートファジーの相互作用が示唆された。