

論文審査の要旨

報告番号	総研第 553 号	学位申請者	Burceta Costansia Anselim
審査委員	主査	古川 龍彦	学位 博士 (医学)・歯学・学術)
	副査	吉本 幸司	副査 橋口 照人
	副査	谷本 昭英	副査 田川 義晃

Synergistic effect of arsenic trioxide, vismodegib and temozolomide on glioblastoma

悪性神経膠芽腫 (GBM) の現在の標準的な治療は、可能な範囲での外科的切除とその後の補助放射線療法とテモゾロミド (TMZ) による化学療法である。GBM の予後は不良で、ほぼ全ての患者が再発する。したがって、治療成績の向上のために治療方法の改善に関する研究が必要とされている。

薬剤耐性は、がん化学療法の治療効果を決定する重要な要因の一つで、Hedgehog 経路の活性化が GBM の腫瘍幹細胞の TMZ 抵抗性に関与していることが報告されている。既存薬物の TMZ との併用によって効果の増強が図れば比較的短期間に臨床への応用される可能性も高いことから、学位申請者らは Hedgehog 経路に注目して併用療法の効果について研究を行った。

培養 GBM 細胞 U251MG、GUO、U138MG の 3 つの細胞株を用いた。Hedgehog 経路の阻害効果が知られている三酸化ヒ素 (ATO) あるいは Hedgehog 経路の smoothend の阻害分子である vismodegib (VIS) と TMZ の GBM に対する併用効果を *in vitro*, *in vivo* で調べた。GBM 細胞株それぞれに対する VIS、ATO、TMZ の単剤または ATO と TMZ、VIS と TMZ の併用での殺細胞効果を WST1 アッセイにより測定した。ATO と TMZ、VIS と TMZ の併用効果は CalcuSyn ソフトウェアを使用し Chou-Talalay の方法により combination index を算出して評価した。薬剤による DNA 障害性、アポトーシスの効果は γ H2AX, cleaved Caspase 3 の発現でウェスタンブロットによって評価した。GUO 細胞をヌードマウスの皮下側腹部に移植した Xenograft モデルに、VIS、ATO、TMZ の単剤または ATO と TMZ、VIS と TMZ の併用時の経時的な腫瘍増殖抑制効果とマウスの体重変化を測定して、これらの薬物の *in vivo* での効果と全身的な有害効果を評価した。

この研究では、次の知見が得られた。

1. ATO、VIS、TMZ は U251MG、GUO、U138MG の 3 つの GBM 細胞株に対して用量依存性に増殖抑制効果を示した。ATO と TMZ、VIS と TMZ の併用により単剤投与と比較して有意な増殖抑制効果の増強がみとめられた。これらの併用は CalcuSyn ソフトウェアを用いた combination index の値はいずれの細胞株でも広い有効度の範囲で 1 以下であり、相乗効果があると判定できた。
2. ATO と TMZ、VIS と TMZ の併用では、単剤と比較して GBM 細胞に高い γ H2AX と cleaved caspase 3 の発現がみられ、より強い DNA 障害性とアポトーシスをもたらすことが明らかになった。
3. *in vivo* では、無治療群、単剤治療群と比較して、ATO と TMZ、VIS と TMZ の併用群では有意で顕著な腫瘍増殖の減少が観察された。この時いずれのマウスも無治療群と比較して有意な体重減少はなかった。

Hedgehog 経路の阻害効果を有する ATO あるいは VIS の TMZ との併用はいずれも TMZ の単剤投与に比べて、*in vitro*, *in vivo* で GBM に対する相乗的な増殖抑制効果がみられ、ATO あるいは VIS と TMZ の併用が GBM の新たな有効な治療法になりうることが示された。

本研究は併用治療の有効性を示し、臨床応用への可能性を示したのみならず、GBM で Hedgehog 経路が腫瘍増殖、TMZ 耐性に関与し重要な役割を担っている可能性も示しており、非常に興味深い。

以上の結果から、我々は本研究が学位論文としての十分な価値があるものと認定した。