

学位論文の要旨

氏名 波里 瑤子

学位論文名 Bcl-xL Inhibition by Molecular-Targeting Drugs Sensitizes Human Pancreatic Cancer Cells to TRAIL

発表雑誌名 Oncotarget, in press
(巻, 初頁～終頁, 年)

著者名 Yoko Hari, Nanae Harashima, Yoshitsugu Tajima, Mamoru Harada

論文内容の要旨

INTRODUCTION

Many molecules are involved in apoptosis. Among them, Bcl-2 family molecules participate in intrinsic apoptosis via mitochondria. The family of Bcl-2-related anti-apoptotic proteins includes Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, and Mcl-1. An increase in Bcl-2 expression protects cancer cells from apoptosis, and the elevated expression of Bcl-2 and Bcl-xL has been frequently observed in a variety of cancers. Thus, the inhibition of Bcl-2 and/or Bcl-xL is hypothesized to potentiate the effect of chemotherapy and, consequently, several Bcl-2 family inhibitors have been developed. ABT-737 is a small molecule inhibitor of Bcl-2, Bcl-xL, and Bcl-w. ABT-263 is a clinically approved orally bioavailable inhibitor with the same specificity as ABT-737. ABT-199 is a new, orally bioavailable inhibitor that inhibits Bcl-2 and Bcl-w, but not Bcl-xL.

Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) can provide a death signal via the extrinsic apoptotic pathway. It is therapeutically important that TRAIL can induce cancer cell death while causing almost no cytotoxicity to normal cells. In this study, we investigated the effects of the Bcl-2 family inhibitors on TRAIL sensitivity using a panel of

human pancreatic cancer cell lines and found that Bcl-xL is responsible for TRAIL resistance in human pancreatic cancer cells.

MATERIALS AND METHODS

Nine human pancreatic cancer cell lines (BxPC-3, SW1990, CAPAN-2, CFPAC-1, Panc10.05, AsPC-1, MiaPaCa-2, Panc-1, and HPAF-II) were used. Cell viability was analyzed using the WST-8 assay. Cell death was assessed using the Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit and propidium iodide and a FACSCalibur flow cytometer. Immunoblot was performed using the following primary antibodies: anti-Bcl-2, anti-Bcl-X_{S/L}, anti-Mcl-1, anti-FLIP_{S/L}, anti-DR5, anti-CHOP, anti-caspase-3, anti-caspase-8, anti-caspase-9, anti-Bid, anti- β -actin and anti- α -tubulin. Goat anti-rabbit or goat anti-mouse alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies were used to detect the primary antibodies. To knockdown Bcl-2 family molecules, specific siRNAs were transfected using LipofectamineTM RNAiMAX. To examine localization of Bax, treated cancer cells fixed on round cover glasses were stained with Hoechst 33342, MitoTracker Red, and anti-Bax antibody followed by Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG F(ab')₂ fragment. Confocal imaging was performed using an Olympus FV1000-D laser scanning microscope. In xenograft mouse models, BALB *nu/nu* mice were subcutaneously inoculated in the right flank with cancer cells with Matrigel. On the indicated days, these cancer-bearing mice were administered an intratumoral injection of TRAIL (1 μ g) and/or an intraperitoneal injection of ABT-737 (75 mg/kg). All experiments with animals were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of Shimane University (IZ26-103). Data were evaluated statistically using an unpaired two-tailed Student's *t*-test or an ANOVA together with Bartlett's test. A *P*-value < 0.05 was considered to indicate significance.

RESULTS AND DISCUSSION

Initially, we examined the sensitivity of nine human pancreatic cancer cell lines to TRAIL

and their expression of DRs, and found that DR5 expression did not reflect the TRAIL sensitivity of the human pancreatic cancer cell lines. We also examined the expression of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1) in nine cancer cell lines, and found that a higher expression of Bcl-xL was detected in the six TRAIL-insensitive cell lines. Selective knockdown of Bcl-xL by siRNA transfection revealed that Bcl-xL was responsible for TRAIL resistance of cancer cells. We further examined the antitumor effect of TRAIL on the TRAIL-insensitive pancreatic cancer cell lines when combined with ABT-199 or ABT-263, and found that ABT-263 significantly augmented the TRAIL sensitivity of TRAIL-insensitive cancer cell lines. These lines of evidence indicate that Bcl-xL is responsible for TRAIL resistance in human pancreatic cancer cells. Flow cytometric analysis revealed that the combination of TRAIL and ABT-263 induced caspase-dependent apoptosis in human pancreatic cancer cells. Additional experiments of immunoblot and flow cytometric analysis revealed that the NF- κ B pathway, but not endoplasmic reticulum stress, was involved in an increased expression of DR5 on ABT-263-treated Panc-1 cells. Alternatively, in *in vivo* xenograft models of AsPC-1 and Panc-1, the combination of TRAIL and ABT-737 significantly suppressed the tumor growth compared with the groups treated with either drug separately.

CONCLUSION

In this study, we found that Bcl-xL is responsible for TRAIL resistance in human pancreatic cancer cells and that the Bcl-2 family inhibitors, including ABT-263 and ABT-737, can restore the TRAIL sensitivity of pancreatic cancer cell lines both *in vitro* and *in vivo*. The Bcl-2 family of inhibitors could be promising reagents to sensitize human pancreatic cancer cells in DR-targeting therapy.

論文審査及び最終試験又は学力の確認の結果の要旨

(甲)・乙	氏名	波里 瑤子
学位論文名	Bcl-xL Inhibition by Molecular-Targeting Drugs Sensitizes Human Pancreatic Cancer Cells to TRAIL	
学位論文審査委員	主査 副査 副査	浦野 健 木下 芳一 磯部 威



論文審査の結果の要旨

膵がんの罹患数は年々増加しており、死亡数はがんのなかで現在4番目である。5年生存率は10%以下と極めて悪い。膵がんを完治できる唯一の方法は外科的切除であるが、早期発見が難しいため診断された時点で手術適応にならない場合も多い。また、現在使用されている抗腫瘍薬では十分な延命効果があるとは言えず、新しい治療法の開発は急務である。今回申請者は、ヒト膵がん細胞株に対して、腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘発リガンド (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand、以下 TRAIL) と抗アポトーシス作用を有する Bcl-2 ファミリータンパク質に対する阻害剤との併用効果について詳細に検討した。

- 1) 9種類のヒト膵がん細胞株のうち、3種類は TRAIL 感受性であり、6種類は感受性が低いか抵抗性 (以下、抵抗性) であることを明らかにした。
- 2) TRAIL 抵抗性のヒト膵がん細胞株6種類のうち、4種類は Bcl-2 ファミリー阻害剤の併用により TRAIL 感受性を示した。他の2種類は TRAIL 非存在下で、Bcl-2 ファミリー阻害剤のみで細胞死が誘導された。
- 3) Bcl-2 ファミリーのうち標的タンパク質の異なる Bcl-2 ファミリー阻害剤の使用および siRNA を用いたタンパク質発現抑制実験から、膵がん細胞株において TRAIL 抵抗性を誘導していた分子は Bcl-2 ファミリーのうち Bcl-xL であることを明らかにした。
- 4) TRAIL 抵抗性の2種類のヒト膵がん細胞株担がんモデルマウスを用いて、TRAIL と Bcl-2 ファミリー阻害剤の併用により抗腫瘍効果があることを証明した。

以上の結果より、Bcl-xL を標的分子とする Bcl-2 ファミリー阻害剤は、すでに海外で治験が進められている TRAIL を標的とした膵がんを含めたがん治療をより効果的な治療法にする可能性を示した。臨床的に極めて重要な意義がある。

最終試験又は学力の確認の結果の要旨

申請者は、Bcl-xL の制御により、すでに海外で治験が進められている TRAIL を標的とした膵がんを含めたがん治療に対する抵抗性を解除できる可能性を示した。しっかりとした基礎研究データを基にした臨床的に意義ある重要な研究成果であり、関連知識も豊富で、かつ質疑応答も的確で学位授与に値すると判断した。 (主査:浦野 健)

申請者は、TRAIL に抵抗してアポトーシスを起こしにくい膵がん細胞株は Bcl-xL を発現していることが多いこと、Bcl-xL を阻害することで TRAIL に対する反応性を獲得することを明らかとした。関連領域の知識も豊富で博士の学位に値すると判定した。 (副査 木下芳一)

申請者は、膵がん細胞を用いて、Bcl-2 ファミリー阻害剤である ABT-263/ABT-737 が、膵がん細胞の TRAIL を介するアポトーシスを増強することを解明し、臨床応用にも可能な重要な知見を示した。関連知識も豊富で質疑応答も的確なため、学位授与に値するものと判断した。 (副査:磯部 威)