

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	深田 翔平
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 Sunitinib promotes apoptosis via p38 MAPK activation and STAT3 downregulation in oral keratinocytes (分子標的薬スニチニブは p38 MAPK 活性と STAT3 抑制を介して口腔粘膜上皮細胞にアポトーシスを誘導する)			
論文審査担当者			
主査	教授	柴 秀樹	印
審査委員	教授	宮内 睦美	
審査委員	講師	重石 英生	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>分子標的薬スニチニブは，血管内皮増殖因子受容体（VEGFR タイプ 1 および 2），血小板由来増殖因子受容体（PDGFR-α および PDGFR-β）などのチロシンキナーゼ受容体の阻害剤で，転移性腎細胞癌患者の第一選択薬として広く使用されている。一方，スニチニブを投与された患者の 10%から 50%に口内炎，歯肉出血，粘膜治癒不全，味覚障害，口腔乾燥など，様々な口腔に関連する有害事象を認めることが知られている。中でも口内炎はスニチニブを投与されている患者に高頻度で発症し，他のチロシンキナーゼ受容体阻害剤と比較して増悪のグレードが高いことが報告されている。しかしながらスニチニブが口腔粘膜に及ぼす細胞障害のメカニズムに関する報告はない。そこで本研究は，口腔粘膜へのスニチニブの影響を明らかにするため，口腔粘膜上皮細胞におけるスニチニブの細胞傷害やアポトーシス誘導に対する影響，およびそれらのシグナル伝達経路について解析した。</p> <p>まず，不死化口腔粘膜上皮細胞 RT7 と初代培養口腔上皮細胞にスニチニブを含む各種チロシンキナーゼ受容体阻害剤を添加し，細胞上清から乳酸脱水素酵素（LDH）の放出による細胞障害を測定した。また RT7 にスニチニブを添加し，TUNEL 法によって染色し，蛍光顕微鏡とフローサイトメトリーにて断片化された DNA を検出した。スニチニブの添加によって誘導されるアポトーシス関連タンパク質の発現をウエスタンブロッティング法にて検討した。FITC 標識 AnnexinV/PI 染色で同定されたアポトーシス細胞の比率をフローサイトメトリーによって解析した。さらにスニチニブ添加による MAPK Family, STAT3 のリン酸化や，スニチニブ誘導性の細胞障害やアポトーシスに対するそれらシグナル伝達経路阻害薬の影響をウエスタンブロッティングや，LDH assay, AnnexinV/PI 染色にて検討した。</p> <p>結果を以下に示す</p> <ol style="list-style-type: none"> スニチニブの培養系への添加は他の各種チロシンキナーゼ受容体阻害剤を添加した場合と比較して，RT7 と初代培養口腔上皮細胞からより多くの LDH の放出を認め，細胞障害が示された。 RT7 へのスニチニブの添加によって DNA 断片化，AnnexinV 陽性細胞の増加を認め，アポトーシスが誘導されることが示唆された。 スニチニブの添加によってアポトーシス関連タンパク質である PARP の発現増加，Caspase-3 の活性化を認めた。一方，抗アポトーシスタンパク質である Bcl-2 の発現が抑制された。スニチニブによってアポトーシス内因経路関連タンパク質 caspase-9 の活性化が認められたが，外因経路関連タンパク質 caspase-8 の活性に変化は認められなかった。 スニチニブの添加によって p38MAPK のリン酸化が誘導された。一方，ERK, JNK のリン酸化は認めなかった。p38MAPK 阻害剤 SB203580 による前処理は，スニチニブ誘導性の p38MAPK のリン酸化を抑制した。 スニチニブの添加によって定常状態で誘導される STAT3 のリン酸化が抑制され 			

た。SB203580 はスニチニブで抑制された STAT3 のリン酸化を増加した。
6. SB203580 の前処理はスニチニブ誘導性の LDH の放出を抑制した。さらに SB203580 の前処理によってスニチニブで増加するアポトーシス細胞の割合が低下した。

以上の結果より、スニチニブは、口腔粘膜上皮細胞における p38MAPK のリン酸化を誘導し、STAT3 の活性化を抑制することによって、細胞障害やアポトーシスを誘導することが明らかになった。p38MAPK 阻害剤はスニチニブによる細胞障害やアポトーシスの誘導を抑制することが示された。スニチニブに関連する口内炎などの口腔の有害事象は口腔粘膜上皮細胞に対するスニチニブの細胞障害性やアポトーシス誘導が関連している可能性が考えられた。

本研究ではスニチニブが p38MAPK の活性化と STAT3 のダウンレギュレーションによって口腔粘膜上皮細胞の細胞障害とアポトーシスを促進することを実証した最初の研究となった。本研究に示された結果は、分子標的薬による口腔内合併症の原因解明や治療法の開発につながる可能性が期待できる。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。