



Title	腎細胞癌におけるInterferon (IFN)- とSuppressor of cytokine signaling(SOCS)3によるTumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL)受容体発現制御メカニズム(本文)
Author(s)	矢部, 通弘
Citation	
Issue Date	2017-03-24
URL	<a href="http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/945">http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/945</a>
Rights	© The Author(s)
DOI	
Text Version	ETD

This document is downloaded at: 2024-04-27T15:24:23Z

# 学 位 論 文

腎細胞癌における Interferon (IFN)- $\alpha$  と Suppressor of  
cytokine signaling (SOCS) 3 による Tumor necrosis  
factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) 受容体  
発現制御メカニズム

福島県立医科大学大学院医学研究科

泌尿器外学分野

矢部 通弘

## 論文内容要旨(和文)

学位論文題名	腎細胞癌における Interferon (IFN)- $\alpha$ と Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 3 による Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) 受容体発現制御メカニズム
<p>進行性腎細胞癌における治療は VEGF 等を標的とした分子標的薬が主流となっているが、これらの薬剤のみでは完全寛解が得られる症例がほとんど無く、一定期間を経て進行してしまうことが報告されている。そのため本邦では従来から用いられてきた IFN-<math>\alpha</math> を中心とした免疫療法が見直されてきているが、IFN-<math>\alpha</math> 抵抗性を示す症例が多いのも事実である。</p> <p>IFN-<math>\alpha</math> による抗腫瘍メカニズムの一つに NK 細胞の活性化が挙げられるが、活性化された NK 細胞による抗腫瘍作用に重要な役割を担っているのが TRAIL である。TRAIL は TNF ファミリーの一つで、腫瘍細胞に発現する TRAIL 受容体に作用することでアポトーシスを誘導する。本講座では腎細胞癌における IFN-<math>\alpha</math> 抵抗性のメカニズムとして IL-6 によって発現される SOCS3 の関与について報告してきた。そこで、IFN-<math>\alpha</math> と SOCS3、TRAIL の関係性から IFN-<math>\alpha</math> 抵抗性腎細胞癌では TRAIL 感受性も低下しているのではないかと、SOCS3 は TRAIL 受容体の発現にも影響しているのではないかと仮説を立て、本研究を行った。</p> <p>SOCS3 が高発現している腎癌細胞株 786-O において SOCS3 siRNA を導入したところ、IFN 刺激時の SOCS3 発現が抑制され細胞増殖試験でも TRAIL に対する感受性が回復した。逆に TRAIL 感受性の腎癌細胞株 ACHN に SOCS3 を強制発現させると、TRAIL に対し抵抗性を獲得した。TRAIL 受容体に着目すると、IFN 刺激によって DR4 の mRNA は高発現するが、蛋白レベルでは SOCS3 によって down-regulate されることが示された。これらのことは、SOCS3 が TRAIL 受容体の発現を制御し、TRAIL 感受性を左右する因子の一つであることを証明する結果であった。</p> <p>抗 IL-6 抗体受容体 Tocilizumab を用いての検証においては、Tocilizumab 単独ではコントロールと比較して DR4 発現に差はなく TRAIL の投与による腫瘍増殖抑制効果は得られなかったが、IFN-<math>\alpha</math> を併用した場合には DR4 発現が亢進し、TRAIL による強い腫瘍増殖抑制効果が得られた。また、IFN-<math>\alpha</math> 刺激で発現した DR4 はコントロール群や Tocilizumab 単独群と比較すると発現が亢進しており、SOCS3 を抑制せずとも IFN-<math>\alpha</math> と TRAIL の併用によって抗腫瘍効果が得られた。これらの結果から、TRAIL 感受性の回復には SOCS3 抑制だけでは不十分であり、IFN-<math>\alpha</math> 刺激による DR4 発現が必要であることが示唆された。</p> <p>近年 DR4 アゴニストヒトモノクローナル抗体 Mapatumumab による臨床治験が進められているが、未だ有益な報告はされていない。これらの治験では Mapatumumab は抗癌剤や分子標的薬と併用されているが、本研究での結果からは Mapatumumab の抗腫瘍作用を効</p>	

## 概要

### 【目的】

進行性腎細胞癌における治療は VEGF 等を標的とした分子標的薬が主流となっている。依然として肺転移のみの症例には有害事象の比較的少ない IFN- $\alpha$  治療も選択されているが、IFN- $\alpha$  抵抗性を示す症例が多いのも事実である。IFN- $\alpha$  による抗腫瘍メカニズムの一つには TRAIL による腫瘍細胞のアポトーシス誘導が挙げられ、IFN- $\alpha$  抵抗性腎細胞癌では TRAIL 感受性も低下していると考えられる。本講座では腎細胞癌における IFN- $\alpha$  抵抗性のメカニズムとして IL-6 により誘導される SOCS3 の関与について報告してきた。そこで、本研究において腎細胞癌の TRAIL 受容体の発現に SOCS3 が関与するか否かを実験的に明らかにし、さらに SOCS3 の発現抑制による TRAIL 抵抗性の解除を試みた。

### 【方法】

腎癌細胞株 ACHN と 786-O を本研究で使用した。TRAIL 受容体、SOCS3 の発現を RT PCR 法で測定した。TRAIL 感受性との相関を MTT 法で解析した。SOCS3 強制発現プラスミドで SOCS3 強発現、siRNA および IL-6 受容体抗体で SOCS3 を抑制した際の TRAIL 受容体発現との関連を RT PCR 法、WB 法で解析した。また、ヌードマウスへの腎癌皮下移植モデルにおいて IFN- $\alpha$  と IL-6 受容体抗体投与時の腫瘍内 TRAIL 受容体発現を免疫染色で検討した。

## 【結果】

IFN- $\alpha$  抵抗性株の 786-O と IFN- $\alpha$  感受性株の ACHN は、それぞれ TRAIL に対しても同様であることがわかった。TRAIL 受容体および SOCS3 の発現レベルを比較すると、TRAIL 感受性株の ACHN では DR4 が高発現し、TRAIL 抵抗性株の 786-O では SOCS3 が高発現していた。また、DR4、DR5、SOCS3 とも IFN 刺激により高発現することがわかった。ACHN に SOCS3 を強制発現させると IFN 刺激による DR4 の発現が抑制され TRAIL に対して抵抗性を示すようになり、786-O の SOCS3 発現を抑制すると IFN 刺激時に DR4 が高発現し TRAIL に感受性を示すようになった。786-O での Tocilizumab を用いた検討では、IFN- $\alpha$  と Tocilizumab との併用療法により siRNA による SOCS3 抑制時と同様の結果が得られた。Tocilizumab の併用では細胞増殖抑制効果が得られなかったが、IFN- $\alpha$  と TRAIL の併用では細胞増殖を抑制できた。ヌードマウス腎癌皮下移植モデルにおいては IFN- $\alpha$  投与群で腫瘍内の DR4 が高発現し、Tocilizumab による SOCS3 抑制は発現を増強させる結果が得られた。

## 【考察】

本研究により TRAIL 受容体の発現に IFN- $\alpha$  と SOCS3 が関与していることが示された。SOCS3 の抑制だけでは TRAIL の作用を効果的に発揮させるには不十分であり、SOCS3 抑制に加えて IFN- $\alpha$  刺激による TRAIL 受容体の発現も必

要であることが示唆された。近年 TRAIL の臨床応用として DR4 アゴニストである Mapatumumab を用いた検証が行われており、今後 IFN- $\alpha$ 、Mapatumumab、Tocilizumab による 3 剤併用療法が進行性腎細胞癌治療における新たな治療の選択肢の一つとして提案されると考えられた。

**【略語】**

- IFN : interferon
- SOCS : suppressor of cytokine signaling
- TRAIL : tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
- VEGF : vascular endothelial growth factor
- IL : interleukin
- RT PCR : real time polymerase chain reaction
- WST : water soluble Tetrazolium salts
- siRNA : small interfering RNA
- WB : western blotting
- TRAIL-R : tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor
- DR : death receptor
- mRNA : messenger RNA
- NK : natural killer
- TNF : tumor necrosis factor
- TBS-T : tris-buffered saline with tween 20
- HRP : horseradish peroxidase
- PBS : phosphate-buffered saline
- HE : hematoxylin and eosin
- JAK : Janus kinase
- STAT : signal transducer and activator of transcription
- MAPK : mitogen-activated protein kinase
- ERK : extracellular signal-regulated kinase

## 【序論】

近年画像診断の進歩に伴い偶発的に発見される腎細胞癌の症例は増加傾向にある<sup>1,2</sup>。これら偶発腎細胞癌は一般的に早期癌であり手術療法で根治が期待できる。しかし、依然として腎細胞癌の約20%は局所浸潤や転移巣を伴う進行性腎細胞癌であり治療に苦慮することが多い<sup>3,4</sup>。現在、これら進行性腎細胞癌に対する治療は sorafenib<sup>5</sup> や sunitinib<sup>6</sup> といった分子標的薬が中心となっているが、これらの効果にも限界があり、これらの薬剤のみでは完全寛解が得られる症例がほとんど無く、一定期間を経て進行してしまうことが報告された<sup>7</sup>。それ故、本邦では従来から用いられてきたインターフェロン-アルファ (IFN- $\alpha$ ) を中心とした免疫療法が見直されてきている<sup>8</sup>。

IFN- $\alpha$ による抗腫瘍メカニズムの一つとして、natural killer (NK) 細胞を含む免疫細胞の活性化が挙げられる。そして IFN- $\alpha$ によって活性化された NK 細胞が腫瘍細胞をアポトーシスに導く過程において重要な役割を担っている可能性があるのが tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) である<sup>9-11</sup>。TRAIL は NK 細胞に高発現する tumor necrosis factor (TNF) ファミリーに属する蛋白であり、TRAIL が腫瘍細胞に発現する TRAIL 受容体に作用することで腫瘍細胞をアポトーシスに導く。TRAIL 受容体は腫瘍細胞にのみ発現していることから、正常細胞への傷害がない新たな治療法とし



て注目されている<sup>9, 12</sup>。TRAIL 受容体は death domain を持つ 2 つの death receptor (TRAIL-R1/DR4、TRAIL-R2/DR5)<sup>13-16</sup> と 2 つの decoy receptor (TRAIL-R3/TRID/DcR1、TRAIL-R4/DcR2)<sup>16-19</sup> が存在し、TRAIL によるアポトーシスの誘導には 2 つの death receptor の発現が重要である。

当講座ではこれまで IFN- $\alpha$  治療抵抗性をもつ腎細胞癌において、そのメカニズムの一つとして IFN- $\alpha$  刺激に伴う SOCS3 の発現亢進が治療抵抗性をもたらしている可能性を報告してきた<sup>20</sup>。さらに、SOCS3 は炎症性サイトカインであるインターロイキン - 6 (IL-6) によって誘導されること、IL-6 の抑制が SOCS3 の発現を抑制すること、SOCS3 の発現低下が IFN- $\alpha$  に対する感受性を回復させ腎癌細胞の増殖を抑制できることを報告してきた<sup>21</sup>。そこで、IFN によるアポトーシス誘導に TRAIL が関わっていることから、IFN 抵抗性腎細胞癌では TRAIL 受容体の発現も抑制されているのではないかと、TRAIL 受容体発現抑制に SOCS3 が関与しているのではないかと、SOCS3 の抑制は IFN- $\alpha$  のみならず TRAIL 感受性も回復させるのではないかと仮説を立て、本研究を行った。

本研究において腎細胞癌の免疫療法抵抗性のメカニズムとして、TRAIL 受容体の発現抑制に SOCS3 が関与するか否かを実験的に明らかにし、さらに SOCS3 の抑制による TRAIL 感受性の回復と腎癌細胞の増殖抑制を試みた。

## 【対象及び方法】

### 細胞株

腎癌細胞株（ACHN、786-O：American type culture collectionより購入）を培地（ACHN：DMEM+10%牛胎児血清+MEM 必須アミノ酸溶液、786-O：RPMI 1640+10%ウシ胎児血清、）上に37℃、5%CO<sub>2</sub>下にて培養した。

### TRAIL

遺伝子組み換え型ヒトTRAIL（R&D systems社製）を用いた。5μgウシ血清アルブミンを加えたPhosphate buffered saline (PBS)で溶解し、使用までは-20℃にて保存した。各々の培地により用事調節した。

### インターフェロンα（IFN-α）

天然型インターフェロンα（スミフェロン600万単位/ml）は大日本住友製薬株式会社より供与された。IFN-αは使用まで4℃保存し、各々の培地により用事調節した。

### IL-6レセプターモノクローナル抗体

ヒト化抗ヒトIL-6レセプターモノクローナル抗体（Tocilizumab：アクテムラ）

は中外製薬株式会社より購入した。Tocilizumab は使用まで 4℃ 保存し、各々の培地により用事調節した。

### Small interfering RNA (siRNA) transfection

SOCS3 に対する siRNA は RNAi 社より提供された。siRNA は同社の siRNA 設計プログラム <http://design.rnai.jp/sidirect/index.php> にて、最も効果的かつオフターゲット効果を回避する配列が選択された。

#### SOCS3 siRNA

Sense strand : CCUGGUGGGACGAUAGCAACC

Antisense strand : UUGCUAUCGUCCCACCAGGAC

#### negative control siRNA

Sense strand : GUACCGCACGUCAUUCGUAUC

Antisense strand : UACGAAUGACGUGCGGUACGU

腎癌細胞株に対する siRNA トランスフェクションには Lipofectamin RNAi

Max (Invitrogen 社製) を使用した。96well プレート上に腎癌細胞株をそれぞれ

10000cells/well となるように 37℃、5%CO<sub>2</sub> にて培養。SOCS3 siRNA 及び

negative control siRNA は各々無血清培地 Opti-MEM Reduced Serum

Medium (Invitrogen 社製) にて 1.5 pmol/10μl Opti-MEM/well となるように

調整した。Lipofectamine RNAi Max を 0.2 $\mu$ l/10 $\mu$ l Opti-MEM/well となるよう調整し、siRNA 液と等量ずつ混合攪拌した後、20 分間室温で静置させ複合体を形成させ腎癌細胞株培養中の培地に合計 20 $\mu$ l を加え 24 時間静置した。24well プレート使用の際は各々5 倍量に調整した。

### SOCS3 強制発現プラスミド (pCIneo-SOCS3)

SOCS3 強制発現のために腎細胞癌株 786-O から調整した cDNA をテンプレートとし PCR 法にて SOCS3 を増幅。動物細胞発現用プラスミド pCIneo expression vector (Promega 社) にライゲーションすることで作成した。negative control には empty vector を使用した。

Forward primer : 5'-ccggaattccggcatggtcaccacagcaagtctc-3'

Reverse primer : 5'-tccccgggggaaaagcggggcatcgtactgg-3'

腎癌細胞株に対するプラスミドトランスフェクションには Lipofectamin LTX (Invitrogen 社製) を使用した。96well プレート上に腎癌細胞株をそれぞれ 1.0  $\times$  10<sup>4</sup> cells/well となるように 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> にて培養。pCIneo-SOCS3 及び control vector は各々無血清培地 Opti-MEM Reduced Serum Medium (Invitrogen 社製) にて 100ng /20 $\mu$ l Opti-MEM/well となるように調整した。Lipofectamine LTX を 0.25 $\mu$ l/well 混合攪拌した後、30 分間室温で静置させ複

合体を形成させ腎癌細胞株培養中の培地に合計 20 $\mu$ l を加え 24 時間静置した。

24well プレート使用の際は各々5 倍量に調整した。

### 定量 PCR、Real Time PCR

cDNA は SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR (TOYOBO 社製) を使用して製品プロトコールに従って作成した。Real Time PCR  $\Delta\Delta$ Ct 法による定量的 PCR を DR4、DR5、SOCS3 mRNA に対して施行した。内因性コントロールとしては  $\beta$  アクチン遺伝子を用いた。それぞれ TaqMan 法により TaqMan Master Mix Reagents Kit protocol (Applied Biosystems 社製) を用いて StepOne real-time PCR System (Applied Biosystems 社製) にて施行した。

DR4、DR5、SOCS3、 $\beta$  アクチン各遺伝子に対するプライマーとして DR4 (Hs00269492)、DR5 (Hs00366278)、SOCS3 (Hs02330328)、 $\beta$  アクチン ( $\beta$ -actin control reagent) を Applied Biosystems 社より購入し、製品プロトコールに従って施行した。

得られた mRNA (DR4、DR5、SOCS3) の Ct 値と内因性コントロールとした  $\beta$  アクチン mRNA の Ct 値から、各遺伝子の発現レベルを比較検討した。

## Water soluble Tetrazolium salts (WST) -1 assay

腎癌細胞株を TRAIL、IFN- $\alpha$ 、抗 IL-6 抗体にて処理した後、細胞増殖抑制効果を WST-1 assay にて検討した。各腎癌細胞株をそれぞれ 96 穴平底プレートに 5000/well となるように調整・分注し 37°C、5%CO<sub>2</sub> にて 24 時間培養した。細胞生着後、TRAIL を 0、12.3、37.0、111、333、1000ng/mL および 100ng/mL、IFN- $\alpha$  を 1000IU/ml、抗 IL-6 抗体を 50  $\mu$ g/ml となるように調節し培養液を交換した。

各々の試薬を加えた 24 時間後にそれぞれの well に細胞増殖試薬 WST-1 (Cell Proliferation Reagent : Roche Applied Science 社製) を 10  $\mu$ l/well で加え、1 時間後にマイクロプレートリーダーで吸光度 (460nm からリファレンス波長 600nm の吸光度を差し引く) を計測した。得られた吸光度は培地のみで WST-1 assay を行った well の吸光度を 1 とした相対値で算出した。

## ウェスタンブロット

蛋白質はそれぞれの腎癌細胞株を 24 穴平底プレートに  $5.0 \times 10^4$ /well となるように調整・分注し 37°C、5%CO<sub>2</sub> にて 24 時間培養した。細胞生着後、各試薬を加えた直後、1 時間後、4 時間後、24 時間後に RIPA buffer (8%/vol. protease inhibitor cocktail II : Roche、1%/vol. の 1M 燐酸 Na、1%/vol. の phosphatase

inhibitor cocktail : SIGMA 含有) 200  $\mu$ l で細胞を溶解し抽出した。抽出された蛋白質は NanoDrop Lite (Thermo Scientific 社製) を用いて定量した。蛋白泳動は SuperSep™ Ace (WAKO 社製) を用い 1well あたりに 10  $\mu$ l ずつ抽出蛋白を泳動した。泳動後 Trans-Blot Turbo (BIO-RAD 社製) にて PVDF 膜に転写した後、ECL Prime™ blocking agent (GE Healthcare 社製) 2%含有 TBS-T にて室温 1 時間ブロッキングした。1 次抗体として DR4 (Santa Cruz Biotechnology 社)、SOCS3 (Immuno-Biological laboratories 社)、抗  $\beta$ -actin マウスモノクローナル抗体 (SIGMA) をそれぞれ Can Get Signal (Immunoreaction Enhancer Solution : TOYOBO) にて希釈し、4°C、over night で反応させた。2 次抗体は DR4、 $\beta$ -actin に対する抗マウス IgG HRP Conjugate (PROMEGA) を、SOCS3 に対する抗ウサギ IgG HRP Conjugate (PROMEGA) を Can Get Signal にて 1 : 1000 となるように希釈し、室温にて 1 時間反応させた。化学発光には SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific 社製) を用い、Chemi DOCTM XRS plus system with Image-Lab™ software にて各蛋白を検出・定量した。各コントロール条件での値を 1 とした相対値で結果を算出した。

## ヌードマウス腎癌皮下移植モデル

本学動物実験委員会において承認を受けている（承認番号 26021）。6 週齢メスの Balb-c nu/nu マウス（日本クレア）右側腹部皮下に、培養した ACHN、786-O 細胞  $2 \times 10^6$  cells を PBS に懸濁し、移植生着させた。皮下に腫瘍が形成されたことを確認した後、コントロール群（ACHN、786-O）、IFN- $\alpha$  単独投与群、tocilizumab 単独投与群、IFN- $\alpha$  + tocilizumab 投与群（以上 786-O）に分けた。IFN- $\alpha$  は 1000IU を連日、tocilizumab は 100  $\mu$ g を週 3 回腹腔内投与した。コントロールには PBS を投与した。腫瘍は移植 50 日後に摘除し、10%ホルマリン固定後パラフィンブロックを作成し、組織学的観察に供与した。

## 統計解析

全ての実験系は3回施行し、結果は平均値 $\pm$ SDで表した。解析においては unpaired t-testにてP値 $<$ 0.05を持って有意差とした。多重比較の場合には Bonferroni correctionを、コントロールとの多重比較にはDunnett's testを適用した。



## 【結果】

### 各腎癌細胞株における TRAIL 感受性

各腎癌細胞株における TRAIL 感受性を比較するため、TRAIL を 0、12.3、37.0、111、333、1000ng/mL の濃度で投与し、細胞増殖能を評価した。IFN- $\alpha$  感受性株である ACHN では濃度依存性に細胞増殖抑制効果が確認され、IFN- $\alpha$  抵抗性株である 786-O では TRAIL 抵抗性が確認された。ACHN との比較では 12.3ng/mL で有意差を認めた ( $p=0.036$ )。ACHN において 111ng/mL の投与で約 50%の細胞増殖抑制効果が得られたため、以後の実験において TRAIL の濃度を 100ng/mL に設定した (Figure 2)。

### 各腎癌細胞株における DR4、DR5、SOCS3mRNA 発現定量

各腎癌細胞株における DR4、DR5、SOCS3 発現を比較するため、IFN- $\alpha$  (1000IU/mL) 刺激 1 時間後 (SOCS3)、24 時間後 (DR4、DR5) の mRNA の比較定量を行った。DR4 は ACHN で有意に高発現し ( $p<0.001$ )、SOCS3 は 786-O で有意に高発現していた ( $p<0.001$ )。これらは IFN 刺激により発現が誘導されることも確認された。DR5 は ACHN に高発現していたが、786-O との間には有意差は認めなかった。この結果から、腎癌細胞株における TRAIL 感受性の差は DR4 および SOCS3 の発現に影響されると考え、以下の実験において DR4

および SOCS3 の相関を評価することとした (Figure 3)。

#### SOCS3 による IFN- $\alpha$ および TRAIL 感受性の変化

IFN- $\alpha$  および TRAIL 感受性に対して SOCS3 が影響するかを評価するため、ACHN に SOCS3 強制発現プラスミドを、786-O に SOCS3 siRNA をトランスフェクションし、細胞増殖能を評価した。ACHN では SOCS3 強制発現プラスミドの導入により IFN- $\alpha$ 、TRAIL に対して抵抗性を示すようになり ( $p < 0.001$ )、786-O では SOCS3 siRNA の導入で IFN- $\alpha$ 、TRAIL に感受性を示すようになった ( $p < 0.001$ , Figure 4)

#### DR4 および SOCS3 発現における相関

ACHN に SOCS3 強制発現プラスミドを、786-O に SOCS3 siRNA をトランスフェクションした際の DR4、SOCS3 の mRNA 発現、蛋白発現を比較検討した。mRNA レベルでは、どちらの株も IFN 刺激により高発現した DR4 が SOCS3 の発現によって影響されることはなかった (Figure 5)。しかし蛋白レベルにおいては、ACHN では SOCS3 強制発現により IFN 刺激時の DR4 発現が抑制され ( $p = 0.011$ )、786-O では SOCS3 発現抑制により IFN 刺激時に DR4 が高発現する結果が得られた ( $p = 0.009$ , Figure 6)。

## 786-O における Tocilizumab による DR4、SOCS3 発現、細胞増殖能の変化

SOCS3 は IFN 刺激による IL-6 分泌によって誘導されることから、抗 IL-6 抗体 Tocilizumab によって SOCS3 発現を抑制できることを報告してきた<sup>21</sup>。TRAIL 抵抗性株 786-O において、Tocilizumab による SOCS3 抑制により SOCS3 siRNA 導入時と同じ結果が得られるか検証した。DR4 mRNA、SOCS3 mRNA とも IFN 刺激により高発現し、Tocilizumab の併用により SOCS3 mRNA 発現は抑制されたが ( $p=0.012$ )、DR4 mRNA の発現に差は認めなかった (Figure 7A)。

しかし蛋白レベルでは、IFN- $\alpha$  と Tocilizumab の併用により SOCS3 が抑制され、DR4 が有意に高発現した ( $p=0.016$ )。一方、IFN- $\alpha$  単独では SOCS3 が高発現し ( $p=0.016$ )、DR4 発現が抑制される結果が得られた (Figure 7B)。

細胞増殖試験における検証では、IFN- $\alpha$  と Tocilizumab の併用により腫瘍増殖抑制効果が得られた。TRAIL 投与群において比較すると、TRAIL 単独投与および Tocilizumab の併用では細胞増殖は抑制できなかったが、IFN- $\alpha$  を併用することで約 20% ( $p=0.031$ )、さらに Tocilizumab を併用すると約 40% ( $p=0.002$ ) の細胞増殖抑制効果を得られた。これは TRAIL 非投与時に比べ有意であった (IFN :  $p=0.003$ 、IFN+Tocilizumab :  $p=0.040$ 、Figure 7C)。

## 組織免疫染色

コントロール群での DR4 発現を比較すると、やはり ACHN で高発現し、786-O では低発現であることが *in vivo* でも確認できた (Figure 8A)。786-O において薬剤投与による変化を観察すると、HE 染色では IFN- $\alpha$ 、Tocilizumab それぞれの投与による変化は見られなかったが、IFN- $\alpha$  と Tocilizumab の併用により線維化や炎症細胞の浸潤を認め、腫瘍細胞の消失が認められた。DR4 染色においては、Tocilizumab 投与群での発現の変化は認められなかったが、IFN- $\alpha$  投与群ではコントロール群に比べ DR4 の発現が亢進しており、Tocilizumab 併用群ではさらに著明な発現亢進を認めた (Figure 8B)。

## 【考察】

本研究において、IFN- $\alpha$  抵抗性腎細胞癌では TRAIL 受容体、特に DR4 の発現が低下し、TRAIL に対しても抵抗性であることが示された。そして SOCS3 の発現を抑制することで、IFN- $\alpha$  刺激時の TRAIL 受容体発現を亢進させ、IFN- $\alpha$  および TRAIL による細胞増殖抑制効果が誘導されることが判明した。

現在、進行性腎細胞癌の治療は分子標的薬の登場により大きく変化をしてくている。従来から転移性腎癌病変に使用されてきた IFN- $\alpha$  を中心とした免疫療法は奏効率が低いことより用いられる頻度が低下してきている。しかし、肺転移単独症例などでは IFN- $\alpha$  療法により完全寛解 (CR) が得られること<sup>22</sup>、近年では favorable risk 群の進行性腎細胞癌では分子標的薬と比較して全生存率に差がないことも報告されている<sup>8</sup>。IFN- $\alpha$  療法抵抗性の機序が解明されれば、有害事象が多く CR が皆無である分子標的薬に再度変わる可能性がある薬剤である。

これまで本講座にて IFN- $\alpha$  療法抵抗性獲得に SOCS3 と IL-6 が関与していることを報告してきた<sup>20,21</sup>。IFN- $\alpha$  が受容体に結合すると、JAK/STAT 系が活性化し STAT がリン酸化される。リン酸化された STAT は二量体を形成して核内へ移行し、プロモーター領域に結合して転写活性を発揮する。STAT1 は癌抑制因子として、STAT3 は癌促進因子として作用することが知られており、SOCS3

はこれらに結合してリン酸化を抑制するネガティブフィードバック因子である。SOCS3 は広範なサイトカインによって発現が誘導されるが、その一つが IL-6 である。IFN- $\alpha$  の刺激によって腎癌細胞より産生された IL-6 は、STAT3 のリン酸化の促進、および Ras を介した MAPK 活性化による ERK のリン酸化の促進により細胞増殖に働く。この STAT3、ERK のリン酸化による細胞増殖促進、および IL-6 により誘導された SOCS3 による STAT1 リン酸化の抑制が IFN- $\alpha$  抵抗性機序の一つと考えられ、実際に SOCS3 抑制により IFN- $\alpha$  感受性が回復されること、抗 IL-6 受容体抗体 Tocilizumab を用いることで SOCS3 発現が抑制できることを報告してきた。

これらの研究の過程において IFN- $\alpha$  が腫瘍細胞にアポトーシスを誘導することが観察されたが、腫瘍細胞のアポトーシス誘導に重要な役割を担っている可能性があるのが TRAIL である。TRAIL は NK 細胞に高発現する TNF ファミリーに属する蛋白で、NK 細胞に発現した TRAIL が腫瘍細胞の TRAIL 受容体に作用すると、カスパーゼ 8、次いでカスパーゼ 3 を活性化し、腫瘍細胞をアポトーシスに導く<sup>9-11</sup>。NK 細胞の細胞毒性は IFN によって活性化されることは古くから知られているが<sup>23, 24</sup>、さらに NK 細胞の抗腫瘍活性には STAT1 が重要であることも報告されている<sup>25-27</sup>。このことから、IFN 抵抗性腎細胞癌では SOCS3 による STAT1 のリン酸化の抑制により NK 細胞の細胞毒性すなわち TRAIL の

活性も抑制されているのではないかと考えられた。また、腎癌細胞株における TRAIL 感受性に関しての報告<sup>28</sup>では我々が報告してきた IFN 感受性と相関するものであったことから、SOCS3 の発現は TRAIL 受容体の発現にも関与しているのではないかと考えられた。

SOCS3 が高発現している腎癌細胞株 786-O において siRNA を用いて SOCS3 発現を抑制したところ、IFN 刺激時の SOCS3 発現が抑制され、細胞増殖試験でも TRAIL に対する感受性が回復した。逆に TRAIL 感受性の腎癌細胞株 ACHN に SOCS3 を強制発現させると、TRAIL に対し抵抗性を獲得した。このことはやはり SOCS3 が TRAIL 感受性を規定する因子の一つであることを証明する結果であった。TRAIL 受容体に着目すると、IFN 刺激によって DR4 の mRNA は高発現するが、蛋白レベルでは SOCS3 によって down-regulate されることが示唆された。その機序としてはユビキチン化による蛋白分解が考えられる。SOCS ファミリーの C 末端側には SOCS-box と呼ばれる領域が存在し、Elongin BC、Cul5、Rbx2 と複合体を形成し、ユビキチンリガーゼ E2 をリクルートする。そして N 末端のドメインを介して結合する標的分子のユビキチン化を促進し、プロテアソームによる蛋白分解を受けると言われている<sup>29-33</sup>。つまり、翻訳された DR4 蛋白は細胞表面に発現する過程で SOCS3 と結合し分解されてしまうため、SOCS3 の抑制により IFN 刺激によって発現された DR4 が

分解されることなく細胞表面に発現することで TRAIL 感受性が回復したと考えられた。

SOCS3 の抑制により TRAIL 抵抗性解除が期待できることは示唆されたが、siRNA の臨床応用は合成量、費用などの観点から現実的には困難である。本講座では SOCS3 が IL-6 刺激により発現することに着目し、慢性関節リウマチなど炎症性疾患にすでに臨床応用されている抗 IL-6 受容体抗体 Tocilizumab (アクトテムラ<sup>®</sup>) を用いての検討を行い、実際に SOCS3 発現を抑制できること、IFN- $\alpha$  と Tocilizumab の併用により腫瘍増殖抑制効果を発揮できることを報告してきた。そこで、本研究においても Tocilizumab を用いて TRAIL 抵抗性が解除できるか、TRAIL 受容体の発現を up-regulate できるかの検証を行った。Tocilizumab 単独ではコントロールと比較して DR4 発現に差はなく、TRAIL の投与による腫瘍増殖抑制効果は得られなかった。しかし IFN- $\alpha$  を併用した場合には DR4 発現が亢進し、TRAIL による強い腫瘍増殖抑制効果が得られた。これは IFN- $\alpha$  と Tocilizumab よりも有意であり、IFN- $\alpha$  による抗腫瘍効果に加え TRAIL によってアポトーシスも誘導された結果と思われた。また、この検討では Tocilizumab を用いない、つまり SOCS3 を抑制せずとも IFN- $\alpha$  と TRAIL の併用によってある程度の抗腫瘍効果が発揮できることが確認できた。IFN- $\alpha$  投与によって DR4 は発現するが、この発現は SOCS3 によって抑制される。し



かし完全に抑制されるわけではなく、コントロール群や Tocilizumab 単独群と比較すると発現が亢進していることが *in vivo* での検証から明らかになった。そして Tocilizumab の併用によって DR4 発現はさらに亢進することも *in vivo* モデルにて確認できた。これらの結果から、腎癌における免疫療法抵抗性のメカニズムの一つとして TRAIL 受容体 DR4 発現抑制があると考えられた。そして TRAIL 感受性の回復には SOCS3 の抑制のみでは不十分であり、IFN- $\alpha$  刺激による DR4 発現が必要である可能性が示唆された。

近年、TRAIL-R1/DR4 アゴニストヒトモノクローナル抗体 Mapatumumab による臨床治験が進められている。TRAIL による抗腫瘍効果は腫瘍細胞のみに発揮されるため副作用の少ない新たな治療法として臨床応用に期待されており、基礎研究においては有益性も報告されている<sup>34-36</sup>。しかし実際の臨床治験では思うような効果が得られていないことも報告されている<sup>37,38</sup>。これらの治験では Mapatumumab は抗癌剤や分子標的薬との併用で使用されているが、本研究での結果からは、Mapatumumab の抗腫瘍作用を効果的に発揮させるには DR4 受容体発現を促進させる薬剤の併用が必要なのではないかと推察される。TRAIL 感受性には様々な制御メカニズムがあると言われており、本研究で解明された IFN- $\alpha$  による DR4 の up-regulation はその一つである。IFN- $\alpha$  は日常的に使用される薬剤であり、抗癌剤や分子標的薬に比べ副作用が少なく長期的

に使用可能である点からも、IFN- $\alpha$ と Mapatumumab の併用による臨床治験が期待される。また、Tocilizumab も実際に慢性関節リウマチの治療薬として承認され市場に出ている比較的用いやすい薬剤である。IFN- $\alpha$ と Mapatumumab、さらに Tocilizumab の 3 剤併用療法が進行性腎細胞癌に対する治療法として臨床応用まで発展されることを期待する。

## 【結論】

腎癌に対する免疫療法の効果発現のためには、腎癌細胞における TRAIL 受容体発現が重要である。TRAIL 受容体発現制御のためには SOCS3 が重要な因子であることが示された。SOCS3 の抑制は IFN- $\alpha$  刺激による TRAIL 受容体発現を亢進させ、TRAIL 感受性を回復させることが明らかとなった。IFN- $\alpha$  と DR4 アゴニストである Mapatumumab、さらに抗 IL-6 受容体抗体 Tocilizumab の併用療法が腎細胞癌における治療法の選択肢として提案される。

## 【引用文献】

1. Lightfoot, N., Conlon, M., Kreiger, N. et al.: Impact of noninvasive imaging on increased incidental detection of renal cell carcinoma. *Eur Urol*, **37**: 521, 2000
2. Mihara, S., Kuroda, K., Yoshioka, R. et al.: Early detection of renal cell carcinoma by ultrasonographic screening--based on the results of 13 years screening in Japan. *Ultrasound Med Biol*, **25**: 1033, 1999
3. Siow, W. Y., Yip, S. K., Ng, L. G. et al.: Renal cell carcinoma: incidental detection and pathological staging. *J R Coll Surg Edinb*, **45**: 291, 2000
4. Tsui, K. H., Shvarts, O., Smith, R. B. et al.: Renal cell carcinoma: prognostic significance of incidentally detected tumors. *J Urol*, **163**: 426, 2000
5. Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W. M. et al.: Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, **356**: 125, 2007
6. Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P. et al.: Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, **356**: 115, 2007
7. Coppin, C., Kollmannsberger, C., Le, L. et al.: Targeted therapy for advanced renal cell cancer (RCC): a Cochrane systematic review of published randomised trials. *BJU Int*, **108**: 1556, 2011
8. Sazuka, T., Nihei, N., Nakamura, K. et al.: Interferon treatment for Japanese patients with favorable-risk metastatic renal cell carcinoma in the era of targeted therapy. *Korean J Urol*, **56**: 205, 2015
9. Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J. et al.: Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, **3**: 673, 1995
10. Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I. M. et al.: Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med*, **188**: 2375, 1998
11. Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M. et al.: Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J Exp Med*, **189**: 1451, 1999
12. Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S. et al.: Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*, **271**: 12687, 1996
13. Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M. et al.: The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, **276**: 111, 1997
14. Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S. et al.: TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J*, **16**: 5386, 1997

15. Schneider, P., Thome, M., Burns, K. et al.: TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity*, **7**: 831, 1997
16. Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, R. M. et al.: Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*, **277**: 818, 1997
17. Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M. et al.: A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol*, **7**: 1003, 1997
18. Degli-Esposti, M. A., Smolak, P. J., Walczak, H. et al.: Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med*, **186**: 1165, 1997
19. Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J. et al.: The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity*, **7**: 813, 1997
20. Tomita, S., Ishibashi, K., Hashimoto, K. et al.: Suppression of SOCS3 increases susceptibility of renal cell carcinoma to interferon-alpha. *Cancer Sci*, **102**: 57, 2011
21. Oguro, T., Ishibashi, K., Sugino, T. et al.: Humanised antihuman IL-6R antibody with interferon inhibits renal cell carcinoma cell growth *in vitro* and *in vivo* through suppressed SOCS3 expression. *Eur J Cancer*, **49**: 1715, 2013
22. Mickisch, G. H., Garin, A., van Poppel, H. et al.: Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial. *Lancet*, **358**: 966, 2001
23. Targan, S. R.: The dual interaction of prostaglandin E2 (PGE2) and interferon (IFN) on NK lytic activation: enhanced capacity of effector-target lytic interactions (recycling) and blockage of pre-NK cell recruitment. *J Immunol*, **127**: 1424, 1981
24. Aso, H., Suzuki, F., Yamaguchi, T. et al.: Induction of interferon and activation of NK cells and macrophages in mice by oral administration of Ge-132, an organic germanium compound. *Microbiol Immunol*, **29**: 65, 1985
25. Yu, C. R., Lin, J. X., Fink, D. W. et al.: Differential utilization of Janus kinase-signal transducer activator of transcription signaling pathways in the stimulation of human natural killer cells by IL-2, IL-12, and IFN-alpha. *J Immunol*, **157**: 126, 1996
26. Lee, C. K., Rao, D. T., Gertner, R. et al.: Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function. *J Immunol*, **165**: 3571, 2000
27. Liang, S., Wei, H., Sun, R. et al.: IFNalpha regulates NK cell cytotoxicity through STAT1 pathway. *Cytokine*, **23**: 190, 2003
28. Griffith, T. S., Fialkov, J. M., Scott, D. L. et al.: Induction and regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand-mediated apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res*, **62**: 3093, 2002

29. Hilton, D. J., Richardson, R. T., Alexander, W. S. et al.: Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 114, 1998
30. Kamura, T., Sato, S., Haque, D. et al.: The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev*, **12**: 3872, 1998
31. Zhang, J. G., Farley, A., Nicholson, S. E. et al.: The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 2071, 1999
32. Kile, B. T., Schulman, B. A., Alexander, W. S. et al.: The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem Sci*, **27**: 235, 2002
33. Piessevaux, J., Lavens, D., Peelman, F. et al.: The many faces of the SOCS box. *Cytokine Growth Factor Rev*, **19**: 371, 2008
34. Song, X., Kim, H. C., Kim, S. Y. et al.: Hyperthermia-enhanced TRAIL- and mapatumumab-induced apoptotic death is mediated through mitochondria in human colon cancer cells. *J Cell Biochem*, **113**: 1547, 2012
35. Neeson, P. J., Hsu, A. K., Chen, Y. R. et al.: Induction of potent NK cell-dependent anti-myeloma cytotoxic T cells in response to combined mapatumumab and bortezomib. *Oncoimmunology*, **4**: e1038011, 2015
36. Ahmed, S. M., Wu, X., Jin, X. et al.: Synergistic induction of apoptosis by mapatumumab and anthracyclines in human bladder cancer cells. In: *Oncol Rep*, vol. 33, pp. 566-72, 2015
37. von Pawel, J., Harvey, J. H., Spigel, D. R. et al.: Phase II trial of mapatumumab, a fully human agonist monoclonal antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1), in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*, **15**: 188, 2014
38. Ciuleanu, T., Bazin, I., Lungulescu, D. et al.: A randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study to assess the efficacy and safety of mapatumumab with sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol*, **27**: 680, 2016

## 【図の説明】

### Figure 1 :

IFN- $\alpha$ 、IL-6 のシグナル経路および TRAIL との相互作用についての模式図

A : IFN- $\alpha$  ・ IL-6 ・ TRAIL 経路の模式図

B : Tocilizumab を用いた場合の理論上の IFN- $\alpha$  ・ IL-6 ・ TRAIL 経路の模式図

A : リン酸化した STAT1 は核内に移行し細胞増殖を抑制するほか Ras-Raf 経路下流の ERK のリン酸化を抑制する。IL-6 刺激により SOCS3 が発現すると、STAT1 と STAT3 のリン酸化が阻害される。STAT1 リン酸化阻害により ERK のリン酸化は促進する。また SOCS3 は TRAIL 受容体に結合し分解する。

B : Tocilizumab に IL-6 シグナルを抑制する事によって SOCS3 の発現を抑制できる。IFN- $\alpha$  を併用する事で STAT1 リン酸化亢進及び MAPK 経路の ERK のリン酸化が抑制され細胞増殖抑制作用の増強が期待できる。また IFN- $\alpha$  による NK 細胞の活性化、TRAIL 受容体の発現により TRAIL によるアポトーシスが誘導される。

### Figure 2 :

腎癌細胞株における TRAIL 感受性の比較

ACHN、786-O に TRAIL を投与した際の細胞増殖能を比較した。ACHN は濃

度依存性に増殖が抑制されたが、786-OはTRAILに抵抗性であった。12.3ng/mL以上で有意差を認めた。

(\*…有意差 :  $p < 0.05$ )

### Figure 3 :

腎癌細胞株におけるIFN投与時のDR4、DR5、SOCS3 mRNA発現量の比較  
IFN未刺激のACHNをコントロールとして、ACHNおよび786-OにおけるmRNA発現を比較した。DR4、DR5はACHNで発現が高く、SOCS3は786-Oで発現が高かった。DR4、SOCS3では細胞株間に有意差を認めた。いずれもIFN刺激により高発現し、ACHNのDR4、786-OのSOCS3で有意差を認めた。

(\*…有意差 :  $p < 0.05$ )

### Figure 4 :

SOCS3による薬剤感受性の変化

A : ACHNにpCIneo-SOCS3を導入

B : 786-OにSOCS3 siRNAを導入

ACHNではSOCS3強制発現にて薬剤抵抗性に、786-OではSOCS3抑制により薬剤感受性になった。またIFNとTRAILの併用はそれぞれ単独投与よりも



強い細胞増殖抑制効果を得られた。

(\*…有意差 :  $p < 0.05$ )

Figure 5 :

SOCS3 による IFN 投与時の DR4、SOCS3 mRNA 発現の変化

A : ACHN に pCIneo-SOCS3 を導入

B : 786-O に SOCS3 siRNA を導入

いずれの細胞も IFN 刺激により DR4 mRNA は高発現し、SOCS3 mRNA の発現には影響されなかった。

(\*…有意差 :  $p < 0.05$ )

Figure 6 :

SOCS3 による IFN 投与時の DR4、SOCS3 蛋白発現の変化

A : ACHN に pCIneo-SOCS3 を導入

B : 786-O に SOCS3 siRNA を導入

ACHN では IFN 刺激により高発現した DR4 が SOCS3 強制発現により抑制された。逆に 786-O では SOCS3 の抑制により IFN 刺激時に DR4 が高発現するようになった。

(\*…有意差 :  $p < 0.05$ )

Figure 7 :

786-O における Tocilizumab 投与時の DR4、SOCS3 発現および薬剤感受性の変化

A : DR4、SOCS3 mRNA 発現

B : DR4、SOCS3 蛋白発現

C : IFN、Tocilizumab、TRAIL 投与による細胞増殖能

siRNA 投与時と同様、mRNA レベルでは SOCS3 の発現によって DR4 の発現が影響されることはなかったが、蛋白レベルでは SOCS3 が抑制されると DR4 発現が亢進した。Tocilizumab のみの投与では変化は認めなかった。IFN、TRAIL の併用により細胞増殖抑制効果が得られ、Tocilizumab の投与は作用をさらに増強させた。

(\*…有意差 :  $p < 0.05$ )

Figure 8 :

組織免疫染色

A : 薬剤非投与時の ACHN と 786-O の DR4 発現の比較

## B : 786-O における薬剤投与による DR4 発現の変化

in vitro での結果と同様、DR4 は ACHN で高発現していた。786-O においては、IFN 刺激により DR4 が発現し、Tocilizumab の併用でさらに高発現していた。Tocilizumab のみでは発現に変化は認めなかった。

【図】  
Figure 1  
A

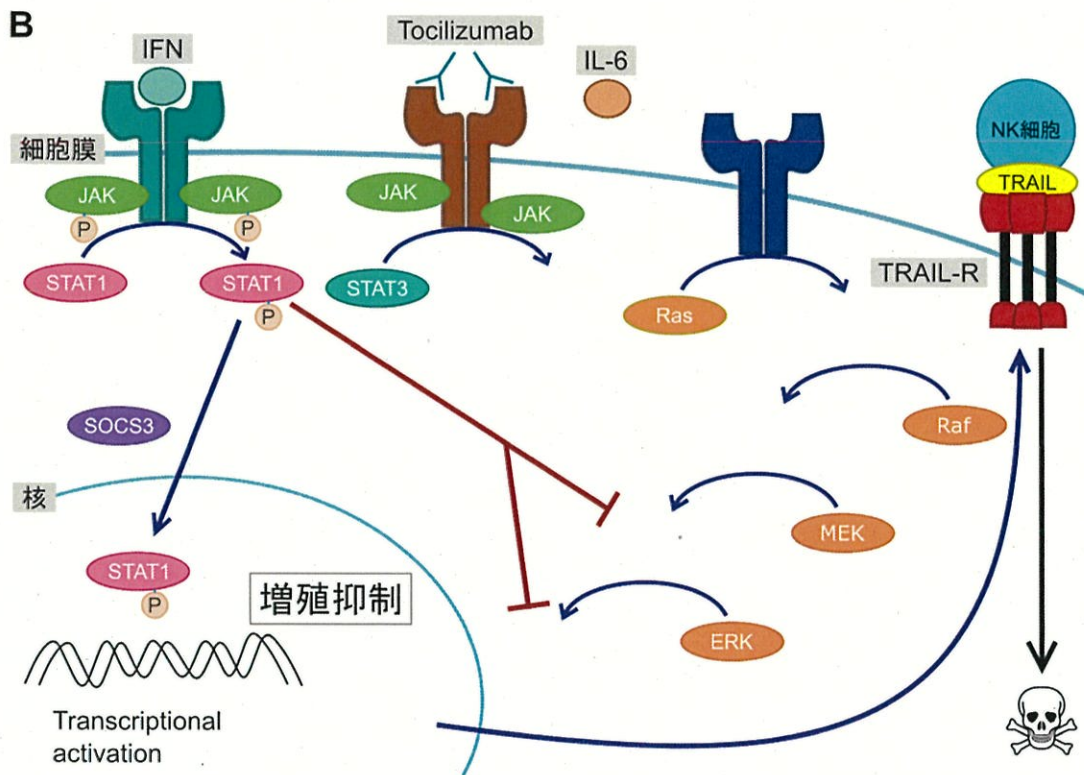
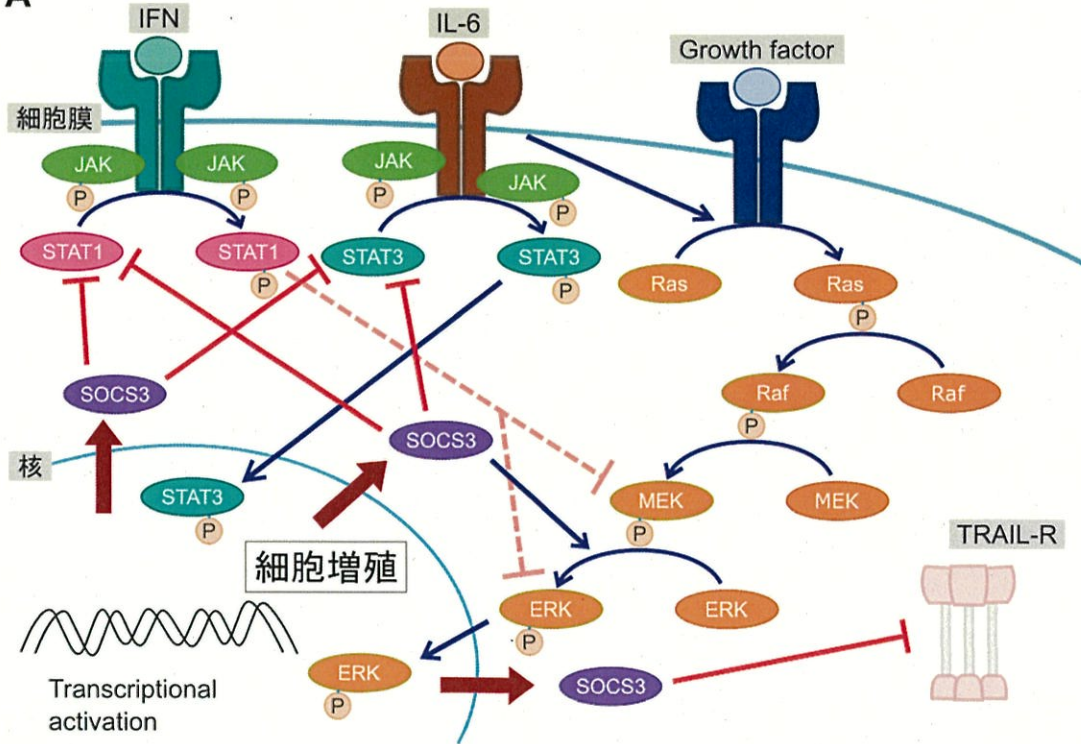


Figure 2

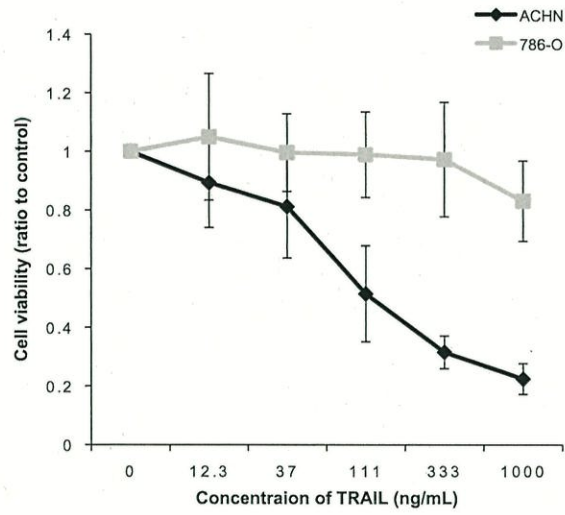


Figure 3

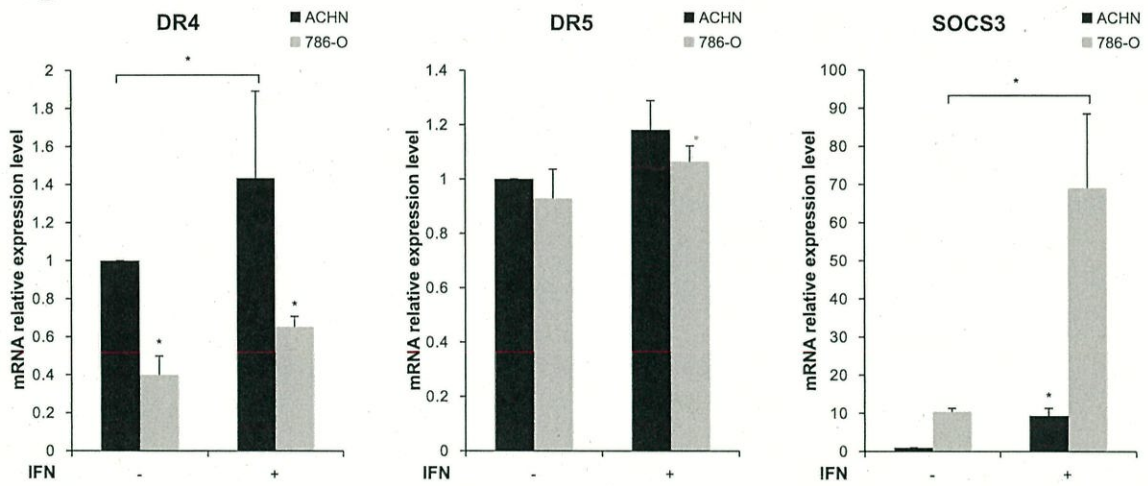


Figure 4

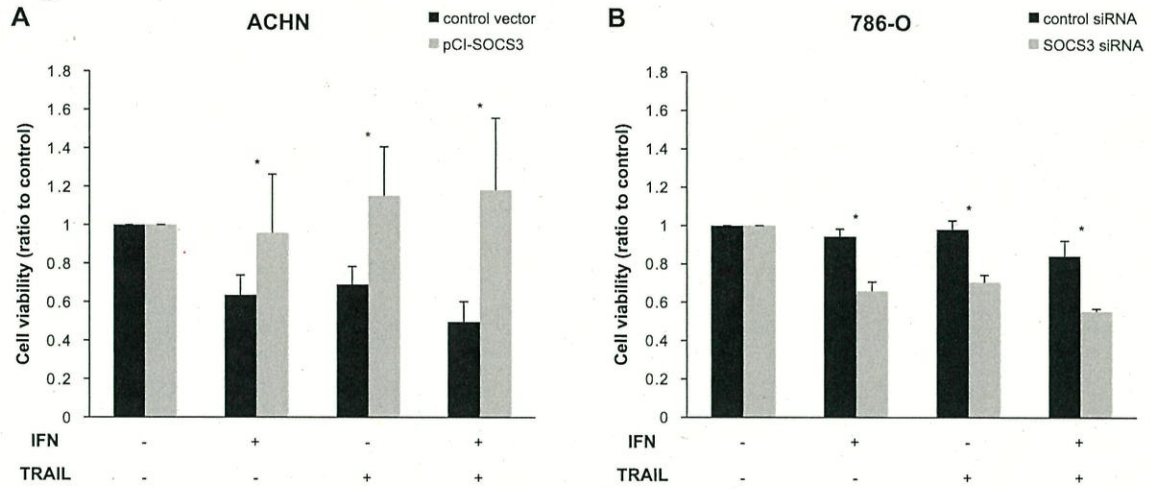
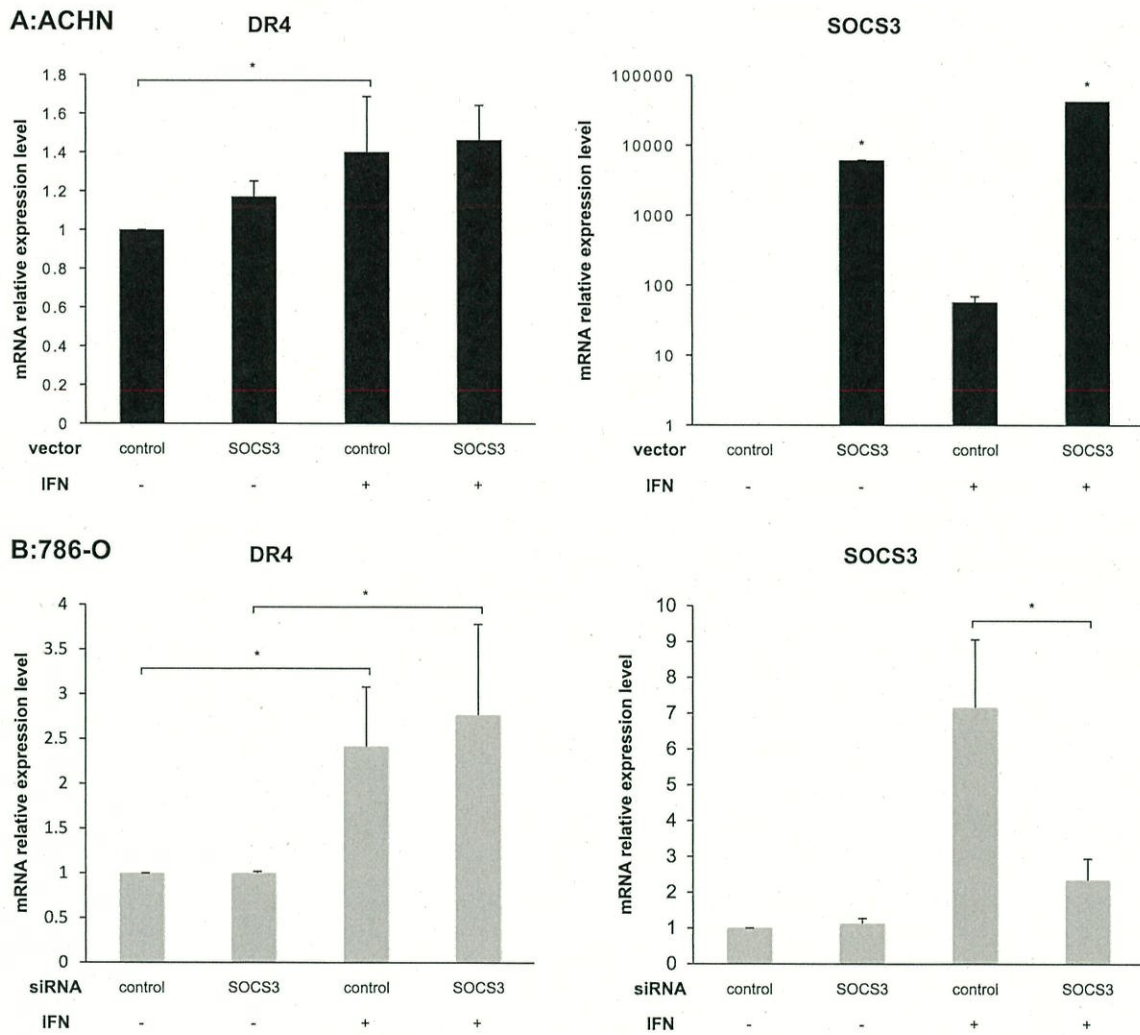
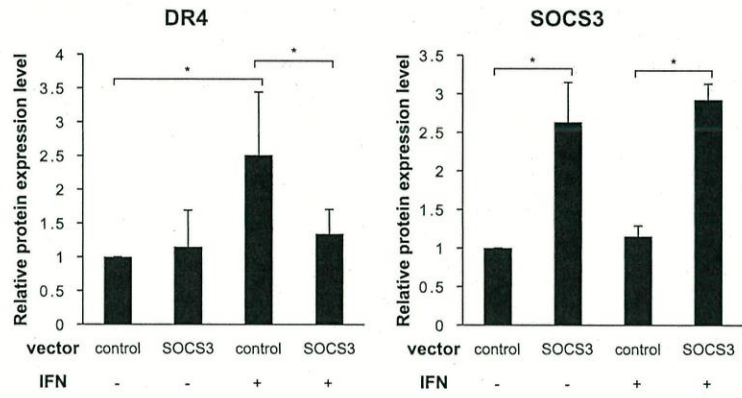
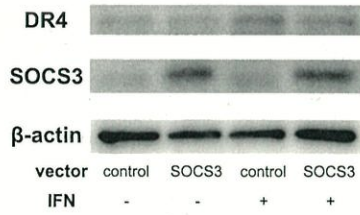


Figure 5



**Figure 6**  
**A:ACHN**



**B:786-O**

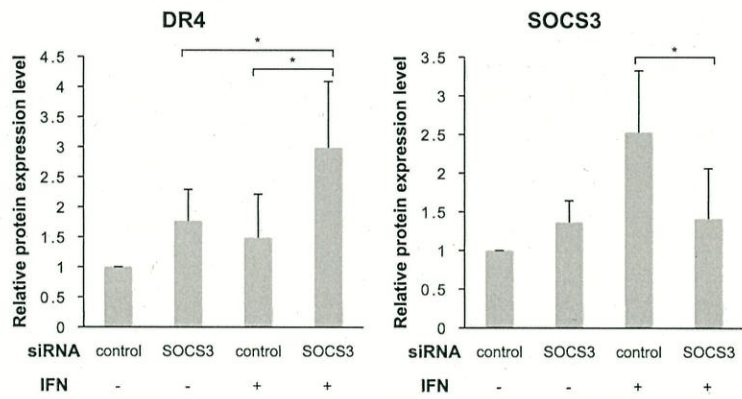
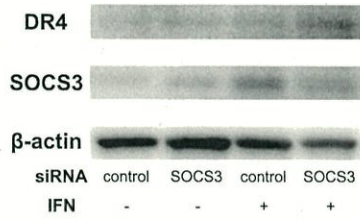


Figure 7

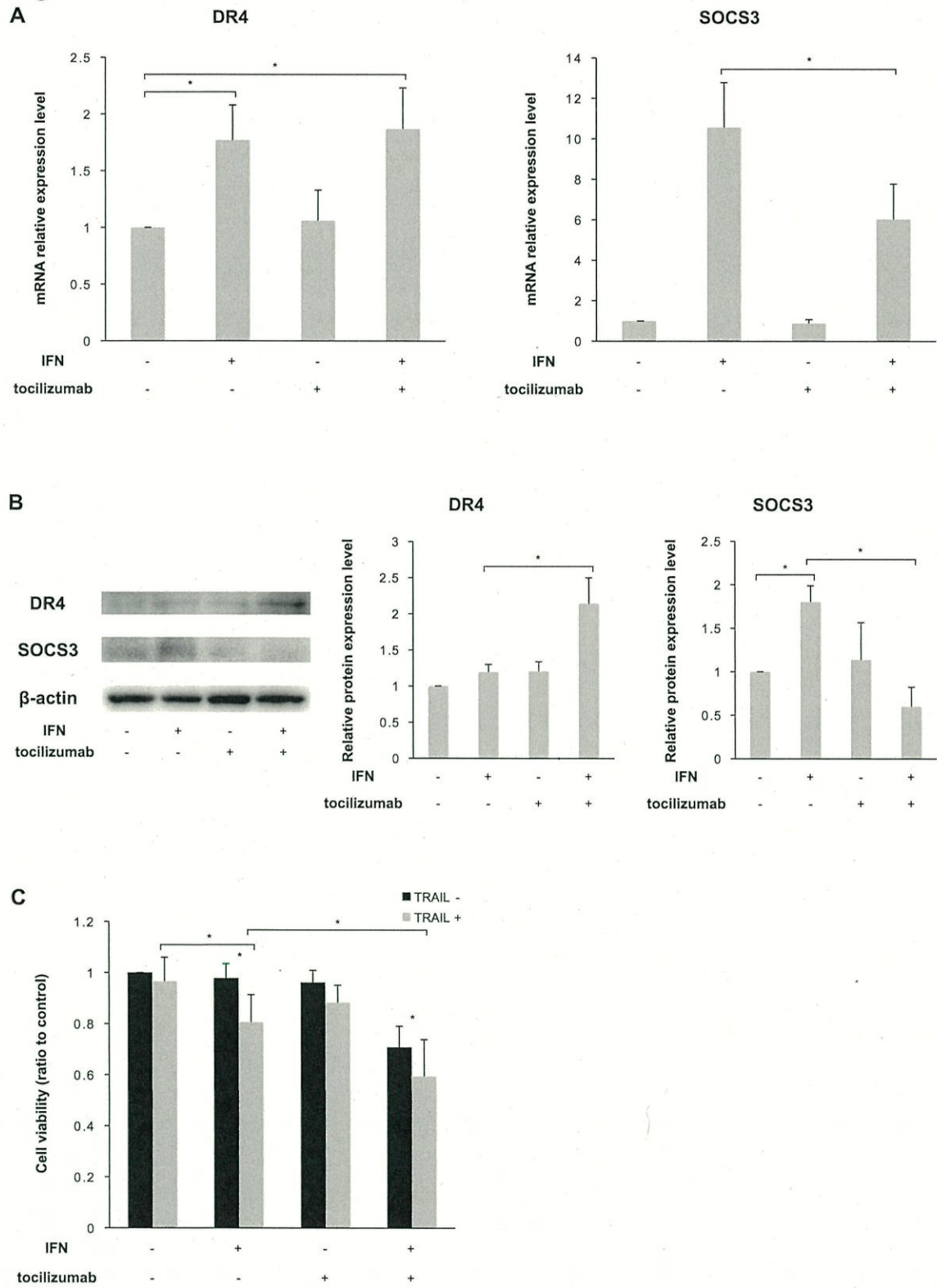
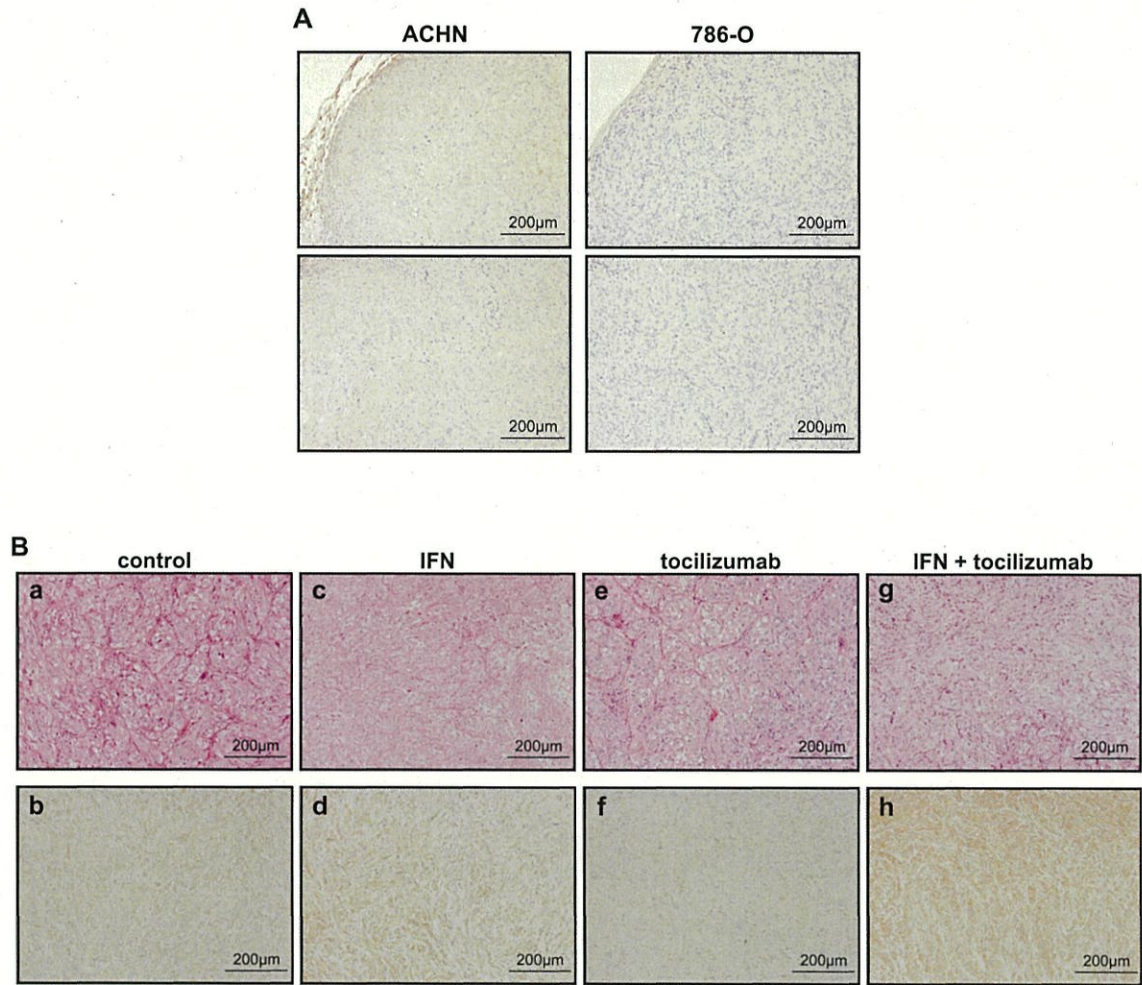




Figure 8



**【謝辞】**

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました当講座教授 小島祥敬先生  
に深謝致します。また、直接ご指導、ご助言を下さった当講座准教授 石橋啓  
先生はじめ、各先生に厚く御礼申し上げます。