

学位論文審査の結果の要旨

平成 30 年 1 月 29 日

審査委員	主査	江見仁 印		
	副主査	南野哲男 印		
	副主査	舛形 尚 印		
願出者	専攻	分子情報制御医学	部門	病態制御医学
	学籍番号	14D731	氏名	大浦 杏子
論文題目	Telmisartan inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation in vitro by inducing cell cycle arrest.			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格 (該当するものを○で囲むこと。)			

〔要旨〕

【目的】昨今非ウイルス性肝細胞癌 (NBNC-HCC) が急激に増加し、高血圧や糖尿病などの生活習慣病を背景する場合が多く、その治療薬が抗腫瘍効果を有するならば、患者にとって二重のメリットがある。telmisartan は angiotensin II type1 受容体拮抗薬 (ARB) として広く臨床使用される降圧薬であるが、心不全や糖尿病性腎症での臓器障害の改善・進展予防など独立した作用を有しており、さらに近年では前立腺癌や子宮体癌などの癌種に対する抗腫瘍効果が報告されている。今回我々は肝細胞癌に対する telmisartan の腫瘍増殖抑制効果とその制御機構について検討した。

【方法】1) 4 種類の ARB (telmisartan, valsartan, losartan, irbesartan) 0~100 μM を使用し、5 種類の HCC 細胞株 (HLE, HLF, HepG2, HuH-7, PLC/PRF/5) に対する増殖抑制効果を MTT assay で検討した。2) 細胞周期変化 (G1 期, S 期, G2/M 期) について flow cytometry で解析し、細胞周期関連蛋白の発現を western blot で調べた。3) アポトーシスに関する実験として、flow cytometry でアポトーシスが誘導された細胞を検出し、caspase-cleaved keratin18 (CCK18) を ELISA 法で測定した。4) アポトーシス関連分子群, レセプター型チロシンキナーゼ群, 血管新生分子群について、アレイ解析を行った。5) 関連する microRNA(miRNA)を同定するため、2555 遺伝子搭載の高感度マイクロアレイチップを用いて網羅的に解析した後、realtime PCR 法で定量解析した。

【結果】Telmisartan のみ肝細胞癌株に対して細胞増殖抑制効果を認め、他の ARB では抗腫瘍効果を認めなかった。Telmisartan は 3 種類の HCC 細胞株 (HLE, HLF, HepG2) において濃度依存性に細胞増殖抑制効果を認め、他の 2 種類では抗腫瘍効果を示さなかった。最も抗腫瘍効果のあった HLF 細胞株を用いた検討では、telmisartan 添加後 12 時間をピークとして G1 停止が持続し、細胞周期関連蛋白では CyclinD1, cdk4, cdk6 および CyclinE, cdk2 の発現の低下を認めた。上流の関連経路では、AMPK α が活性化し、mTOR/p70s6k のリン酸化が抑制されていた。アポトーシスに関する検討では、アポトーシスを誘導した細胞の割合には直接的な差はないものの、CCK-18 は経時的に蓄積しており、アレイ解析では Phospho-p53 (Ser392) の発現亢進および survivin の発現低下を認めた。レセプター型チロシンキナーゼでは ErbB3 の発現が有意に低下しており、血管新生分子群では bFGF の発現亢進を認めた。また telmisartan 添加によって miRNA は異なるクラスターを形成し、減少した hsa-miR-7-5p と増加した hsa-miR-3651 の 2 分子が最も変化していた。

【結語】TelmisartanはHCC細胞株に対する抗腫瘍効果を併せ持つ薬剤と考えられ、その機序としてAMPK α /mTOR経路を介する細胞周期関連蛋白の制御が主要な経路と考える。本研究は、今後高血圧を有するNBNC-HCC患者にどの降圧薬を選択するかの1つの指針となる。

平成30年1月24日に行われた学位論文審査委員会において、以下に示す質疑応答が行われた。

- 1) HCC細胞株に対してtelmisartan以外のARBが腫瘍増殖抑制効果を認めなかった理由についてどう考えているか。
(回答) Telmisartanが他のARBと比較してangiotensin II受容体に対する拮抗作用が強い薬剤ではない。Angiotensin II受容体に依存しない経路として、telmisartanは他のARBと比較してAMPK α の活性化作用が強く、腫瘍増殖抑制効果に最も影響を与えていると考える。
- 2) MTT assayにおいて、telmisartanが腫瘍増殖抑制効果を示さない細胞があるが、効果がある細胞とない細胞ではどういった違いがあるのか。
(回答) 細胞増殖抑制効果を認めたHLF, HLE, HepG2は分化度の低い癌という共通点がある。低分化な癌であるほどエネルギー枯渇状態になりやすく、AMPKが活性化しやすいなどの条件が整っているのではないかと推測しており、今回の制御機構にどう影響しているのかは不明な点が多く、課題として検討をすすめていきたいと考えている。
- 3) MTT assayでは濃度依存性に腫瘍増殖抑制効果を認めているが、使用している薬剤濃度は臨床的に到達可能な濃度であるのかどうか。
(回答) *in vitro*で使用したtelmisartan50~100 μ Mは、臨床使用した際の有効血中濃度の数十倍にあたり、高濃度となっている。*in vivo*で使用したtelmisartan50~100 μ gをマウスあたりの体重から換算すると、人間における常用量の約4~10倍に相当し、*in vivo*の系の方が臨床使用されているのに近いと考えている。
- 4) TelmisartanがAMPK α を活性化する機構について、どういったメカニズムを考えているか。
(回答) TelmisartanがAMPK α を活性化するメカニズムについて詳細には知られていないが、他の薬剤ではmetforminがLKB-1のリン酸化が関わっていることが報告されており、本研究でもtelmisartanによりLKB-1のリン酸化が亢進していたので、metforminと類似したメカニズムが働いているのではないかと考えている。
- 5) どのmiRNAが重要な役割をしているのかを理解する上で、細胞増殖抑制効果のなかった細胞のmiRNA発現と比較する方法が望ましいと助言いただいた。
- 6) *in vivo*の実験系では血圧非依存性であることを証明するためには、ARB以外の降圧薬を投与して比較検討することが望ましいと助言いただいた。
- 7) ARBの疫学研究についてはどのような内容のものがあるか。
(回答) 様々な癌種や異なる人種でstudyが存在するが、代表的なものとしてジェムザールによる化学療法を予定している肺癌患者にARBを併用すると臨床的予後を改善する疫学研究がある。大規模なものとしては500万人を対象としたコホート研究で、肺癌発生リスクが低下したとの報告がある。
- 8) 今回の研究でtelmisartanを選んだ背景について
(回答) まず予備実験として、telmisartan以外のARBも含めて4種類を使用し、HCC細胞株に対する細胞増殖アッセイを行った。telmisartanのみ腫瘍増殖抑制効果を認めたため、以降の実験をtelmisartanですすめることとした。
- 9) Telmisartanを臨床研究で使用する際に血圧に及ぼす影響についてはどう考えるか。
(回答) 降圧薬を血圧正常な患者に使用するの難しいと考えており、まずは高血圧を合併した肝細胞癌患者を対象とした臨床研究を行いたいと考えている。
- 10) 使用している細胞株についてB型肝炎ウイルスに関連しているものかどうか。
(回答) PLC/PRF/5のみHBV感染細胞であり、ほかの細胞株はすべてB型肝炎・C型肝炎に感染していない細胞である。
- 11) TelmisartanがmTORを抑制するのであれば、腎細胞癌でも同様の効果が期待されるが、これまでに報告はあるかどうか。
(回答) *in vitro*で腎細胞癌にARBの抗腫瘍効果を検討した研究は他施設から報告されているが、mTORとの関連については検討されていない。

掲載誌名	Oncology Reports		第38巻, 第5号
(公表予定) 掲載年月	2017年 11月	出版社(等)名	Spandidos Publications

(備考) 要旨は、1,500字以内にまとめてください。