

## 学位論文審査の結果の要旨

平成 30 年 2 月 4 日

審査委員	主査	西小 公			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	14D735	氏名	寒川 英里	
論文題目	Angiotensin receptor blocker telmisartan inhibits cell proliferation and tumor growth of cholangiocarcinoma through 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】降圧剤として臨床で広く使用されているアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) の服用者に癌の発生頻度が少ないことが報告され、近年 ARB の前立腺癌や子宮体癌に対する細胞増殖抑制効果も示されている。今回、我々は ARB の一つである telmisartan を用いて胆管細胞癌に対する細胞増殖抑制効果とその抑制機序について in vitro, in vivo の系で検討した。【方法】In vitro の検討：胆管細胞癌細胞株として HuCCT-1 と TFK-1 を使用し、種々の濃度 (0~100  $\mu$ M) の telmisartan 投与による細胞増殖を MTT cell proliferation assay により検討した。Telmisartan が細胞周期に与える効果を flow cytometry で検討し、細胞周期関連分子の発現動態を Western blot で解析した。アポトーシスに関する実験として flow cytometry でアポトーシス誘導細胞を検出し、caspase-cleaved keratin18 (CCK18) を ELISA 法で測定した。また、telmisartan による細胞内の血管新生分子群、レセプター型チロシンキナーゼ群への影響についてアレイチップを用いて解析した。さらに、telmisartan 投与により誘導される microRNAs を 2555 遺伝子が搭載された高感度チップを用いて網羅的に解析した。In vivo の検討：ヌードマウスに HuCCT-1 を皮下移植し、telmisartan 投与群と対照群に分け、腫瘍サイズを計測することで telmisartan の効果を検討した。【結果】In vitro の検討では、telmisartan は胆管細胞癌細胞株 (HuCCT-1 と TFK-1) において濃度依存性に細胞増殖の抑制効果を認めた。胆管細胞癌細胞株 HuCCT-1 を用いた検討では、telmisartan 投与により、G1 期から S 期への移行が抑制され G1 アレストが認められ、さらに、細胞周期関連分子である CyclinD1 とその catalytic subunit である CDK4、CDK6 や CyclinE の catalytic subunit である CDK2 の発現が低下した。また、これらの基質である Rb のリン酸化の低下も認め、telmisartan の胆管細胞癌細胞の G1 アレストはこれらの細胞周期分子の活性低下によるものと考えられた。telmisartan の胆管細胞癌細胞に対するアポトーシスの誘導効果認めなかったが、レセプター型チロシンキナーゼでは EGFR 活性の低下を認め、血管新生分子群では TIMP-1 の発現低下を認めた。さらに、telmisartan 投与群は対照群と比較して異なる miRNAs のクラスターを形成した。In vivo の検討では、telmisartan 投与によりヌードマウスに皮下移植した癌細胞増殖が顕著に抑制された。【結語】Telmisartan が胆管細胞癌に対して細胞増殖抑制効果を持つことを in vitro, in vivo に

において証明した。Telmisartanにより複数の癌抑制 miRNAs を誘導し、細胞周期の G1 アレストを引き起こすことで胆管細胞癌の増殖を抑制することが示唆された。

平成 30 年 1 月 30 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) 食道腺癌や肝細胞癌への telmisartan の抗腫瘍効果が示されているが、膵癌などの抗癌剤が効きにくい癌腫への効果はどうか。細胞増殖抑制にいたる機序は癌腫によって異なるのか。

(回答) 膵癌に対する telmisartan の抗腫瘍効果も検討しており、抗腫瘍効果が認められた。

細胞増殖抑制にいたる機序としては、食道腺癌や肝細胞癌では細胞周期の停止にいたる経路として AMPK  $\alpha$  の活性化によるものが認められたが、胆管細胞癌では AMPK  $\alpha$  の活性化は見られなかった。癌の由来細胞の性質の違いが影響していると考えられる。

2) *in vivo* における telmisartan の投与濃度はヒトに換算するとどれくらいの濃度になるのか。

(回答) *in vivo* で使用した telmisartan 50~100  $\mu$ 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 倍に相当する。実臨床に生かす際には、telmisartan 単体ではなく、既存の抗癌剤に add on する形が現実的であり、常用量での使用ができると思う。

→今回 telmisartan はマウスには腹腔内投与のため、実際の血中濃度はもっと高いのではないかと助言をいただいた。また、高濃度では血圧変動の懸念があるため、企業と協力し、telmisartan の誘導体などを用いて今後の研究にいかせるのではないかと助言をいただいた。

3) western blot 法において、何回 western blot 法を行ったのか。またこれらの増減の結果を定量的にデータにしたか。

(回答) western blot 法は今回 3-4 回行い、いずれも同様の結果が得られている。タンパク発現の増減の定量は行っておらず、今後は濃度の定量化を示していきたい。

4) telmisartan はどういう機序で EGFR のリン酸化を抑制しているのか。また、リン酸化される部位は細胞膜内かどうか。

(回答) EGFR は細胞膜上に存在し、細胞外で EGF がレセプターに結合すると、隣の EGFR と二量体を形成し、細胞内で相互をリン酸化しあい自己リン酸化がおこり活性型になる。telmisartan が EGFR のリン酸化を抑制する機序は今回明らかにはなっていないので、今後検討していきたい。

→血管内皮細胞において EGFR のリン酸化の報告があったので参考にしてください、と助言いただいた。

5) miRNA の発現量の制御はどのようにされているのか。

(回答) miRNA は前駆体である pri-miRNA が二箇所それぞれある複合体により切断されることで生成される。頭頸部扁平上皮癌に HGF を投与すると癌の浸潤転移に関与する miRNA が短時間で著明に低下したり、Hippo-YAP 経路で知られる YAP が活性化することで miRNA が減少し、代わりに pri-miRNA が増加することより、増殖因子など何らかの刺激により前駆体からの切断が阻害されることで miRNA の発現量が低下しているのではないかと考えられる。

6) 他の癌と比較し、共通した miRNA の変動はあったか。

(回答) 胆管細胞癌、肝細胞癌、膵癌のいずれの細胞株においても miR-3651 の有意な増加が見られたが、現段階では target 遺伝子の報告はなく、さらなる検討の余地がある。

7) 10 年ほど前に ARB と腎癌に対する抗腫瘍効果の検討がされていた記憶があり、最近またこれらの話題が聞かれているが、10 年前と比較すると当時は telmisartan などなく薬も違ったと思われる。telmisartan や ARB とその他の薬剤との違いは何かあるのか。

(回答) telmisartan は ARB の中でも PPAR  $\gamma$  のリガンドとしての作用があると報告されており、抗腫瘍効果の機序として関与している可能性があると思われ。

8) 今回の実験で使用した telmisartan の濃度設定はどうして 50  $\mu$ M、100  $\mu$ M としたのか。またなぜ *in vivo* での薬剤の投与方法が腹腔内投与であったのか。経口投与を常用量でおこなったらどうだったのか。

(回答) 先行した telmisartan と子宮体癌や前立腺癌に対する抗腫瘍効果の検討において使用されていた濃度を参考にし、投与濃度を決定した。また、*in vivo* の薬剤濃度、投与方法も先行文献を参考にし同様にを行った。今後は経口投与での検討も行いたい。

9) 今回 telmisartan のプロモーションを抑制した、との報告はあるが、イニシエーションの抑制の報告はあるか。

(回答) イニシエーションの報告はまだない。

→検討するためには、マウスの発癌モデルを用いた検討がよいでしょう、と助言をいただいた。

10) in vivoの組織切片は作成したか。

(回答) 今回の検討では切片は作成していない。

→マウスにおける腫瘍組織中の全てが癌なのか、核分裂像はtelmisartan投与により抑制されているか、などの情報がたくさんあるので、ぜひ組織切片を作成しましょう、と助言をいただいた。

11) telmisartanの代謝経路は？

→胆汁排泄であれば、胆管を薬剤が直接通過するので、他の癌腫と比較し抗腫瘍効果が強いのではないかと助言をいただいた。

12) in vivoにおいて、マウスを撮影する際の背景はマウスが白ならば黒で撮影するのが望ましい、組織切片の写真を出すときはスライドの背景は暗いほうがよい、と助言をいただいた。

13) その他telmisartanが抗腫瘍効果をきたす機序を、受容体を介してなのか、PPAR $\gamma$ を介する経路なのか、さらなる検討をしてみてもよい、と助言をいただいた。

14) telmisartan以外のARBの抗腫瘍効果はあったか。

(回答) その他、イルベサルタン、ロサルタン、バルサルタンについて細胞増殖アッセイを行ったが、細胞増殖抑制効果は認められなかった。

平成30年1月30日に開催された学位論文公開審査会において、口頭発表の後、指定討論者及び審査委員による質疑応答が実施され、上記の例のように数多くの質問に対して適切な回答が得られた。従って、審査員一同は一致して本論文が学位授与に値すると判断した。尚、本論文は既に受理され発行されている。

掲 載 誌 名	International Journal of Oncology 第51巻, 第6号		
(公表予定) 掲 載 年 月	2017年 12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。