

学位論文審査の結果の要旨

平成 28 年 / 月 18 日

審査委員	主査	中村 隆範		
	副主査	徳田 雅明		
	副主査	平野 勝也		
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	12D747	氏名	横倉繁行
論文題目	Calmodulin antagonists induce cell cycle arrest and apoptosis in vitro and inhibit tumor growth in vivo in human multiple myeloma			
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〕

本研究は、カルモジュリン阻害剤 W-7 と W-13 が多発性骨髄腫 (MM) に対する抗腫瘍効果を検討したものである。

①MM 細胞株である RPMI8226、U266、MM1.S、MM1.R、NCI-H929、KMS-12-BM、KMS-5 に対して種々の濃度の W-7、W-13 および W-7 のネガティブコントロールである W-5 を添加し、WST-8 法により腫瘍細胞の増殖抑制効果を検討した。結果、W-7 および W-13 は各種 MM 細胞株に対して濃度依存的に増殖を抑制した。

②RPMI8226、U266、MM1.S 細胞に対して W-5、W-7、W-13 を添加し、細胞周期の変化についてフローサイトメトリーで解析した。また、細胞周期関連蛋白質の変化について western blot 法で解析した。結果、W-7 および W-13 は MM 細胞株の細胞周期を G1 期で停止させた。また、各種 cyclin および cyclin dependent kinase の発現を低下させ、p21cip1 の発現を上昇させた。

③RPMI8226、U266、MM1.S 細胞に対して W-5、W-7、W-13 を添加し、アポトーシス誘導について PI と Annexin-V の二重染色とフローサイトメトリーで解析を行った。また、caspase 関連蛋白質の変化、ERK1/2、STAT3 のリン酸化の変化について western blot 法で解析した。結果、W-7 および W-13 は MM 細胞株のアポトーシスを誘導した。また、各種 caspase を活性化し、ERK1/2 のリン酸化レベルを上昇させ、U266 と MM1.S においては STAT3 のリン酸化レベルを低下させた。

④RPMI8226、U266、MM1.S 細胞に対して W-5、W-7、W-13 を添加し、細胞内カルシウム濃度の変化を Fluo-4/AM 染色とフローサイトメトリーで解析した。また、ミトコンドリア膜電位の変化を JC-10 染色と蛍光顕微鏡で解析した。結果、W-7 および W-13 は MM 細胞株の細胞内カルシウム濃度を上昇させ、ミトコンドリア膜電位を脱分極させた。

⑤RPMI8226 細胞を BALB/c nu マウスの皮下に移植し、腫瘍の生着が確認された後に W-7 (コントロールに H₂O)、W-13 (コントロールに PBS) を週に 5 日間腹腔内投与し、腫瘍径の変化を計測した。また、実験終了時に血算の測定と各臓器について病理切片を作成し、各臓器の副作用の有無の確認を行った。結果、W-7 および W-13 はマウス皮下に移植した RPMI8226 細胞の増殖を抑制した。また、実験終了時の血算や各臓器の病理切片では明らかな異常は認めなかった。

以上より、カルモジュリン阻害は多発性骨髄腫の新規治療としての可能性を秘めていると考えられた。

本研究に関する学位論文審査委員会は平成28年1月14日に行われた。

本研究は、カルモジュリン阻害剤であるW-7とW-13がin vitroおよびin vivoにおいて多発性骨髄腫細胞の腫瘍増殖を抑制していることを示したもので、結果に対する十分な考察もなされている。本研究で得られた成果は、カルモジュリン阻害が多発性骨髄腫の治療ターゲットとなる可能性があるという点で意義があり、学術的価値が高い。委員会の合議により、本論文は博士（医学）の学位論文に十分値するものと判定した。

審査においては

1. アポトーシスと細胞周期は独立した事象なのか？
2. CaM 阻害剤の骨髄腫への特異性はどこにあるのか？
3. 動物実験では行動の変化については調べたか？
4. 動物実験ではどのような副作用を想定していたか？
5. 動物実験で骨髄は調べているのか。また、基本である血圧測定は行っていたか？
6. 動物実験で使用した薬の量は他の薬と比べて多いのか、少ないのか。
7. 動物実験の薬剤投与量はどのようにして決定したのか？
8. 動物実験ではもっと少ない薬の量で効果がある可能性もあるのか？
9. カルモジュリン阻害が腫瘍に特異的に効くのは、骨髄腫の細胞回転が速いからだろうか？

などの多数の質問が行われた。申請者はいずれの質問に対しても概ね適切に回答し、医学博士の学位授与に値する十分な見識と能力を有することが認められた。

掲 載 誌 名	BMC cancer	第 14 卷, 第 882 号	
(公表予定) 掲 載 年 月	2014年 11月	出版社(等)名	BioMed Central

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。