

学位論文の内容の要旨

専 攻	医学	部 門 (平成27年度以前入学者のみ記入)	
学籍番号	16D723	氏 名	波間大輔
論文題目	The Effect of Gemcitabine on Cell Cycle Arrest and microRNA Signatures in Pancreatic Cancer Cells		
<p>(論文要旨)</p> <p>【背景と目的】 膵癌患者の多くは、発見時に局所進行ないし転移により外科的切除が困難な場合が多く、化学療法の適応となる場合が多い。ゲムシタビンは膵癌の化学療法においてキードラッグであり、登場して約20年が経過した現在でも使用されることは多い。しかしながら奏功率は高くなく、効果予測因子も明らかにはされていない。私たちは、一本鎖のノンコーディングRNAであるmiRNAがGEM治療に影響を与え、診断、治療のターゲットとなり得るという仮説を立て、膵管腺癌(PDAC)に対するGEMの効果进行分析し、miRNAの発現状況を<i>in vitro</i>および<i>in vitro</i>モデルで検討した。</p> <p>【方法】 1) ゲムシタビン 0~100nMを使用し、2種類のPDAC細胞株(PK-1, PK-9)に対する増殖抑制効果をMTT assayで検討した。 2) ゲムシタビンを加えたPK-1の細胞周期変化(G1期, S期, G2/M期)についてflow cytometryで解析した。 3) 細胞周期関連蛋白の発現をwestern blot法を用いて調べた。 4) PK-1microRNA(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。 5) 18匹のヌードマウスにPK-1(1×10^6個/匹)を皮下に移植し、ランダムにゲムシタビン0, 40, 80mg/kgの3群に振り分け、5回/週にわたり計6週間継続投与し各群の腫瘍体積をモニタリングした。 6) 核出した腫瘍組織に対して、Cyclin D1抗体を用いた免疫染色を行った。</p> <p>【結果】 2種類のPDAC細胞株(PK-1, PK-9)において、共にゲムシタビンは細胞増殖抑制効果を示した(Figure 1)。増殖抑制効果を認めたPK-1を用いた検討では、ゲムシタビン添加後S期での停止が誘導され(Figure 2A)、細胞周期関連蛋白ではCyclinD1, Cdk4, Cdk6の発現の低下を認めた(Figure 2B)。In vivoにおいて、ゲムシタビン投与により腫瘍組織の増殖は、有意に抑制されており(Figure 3A, B)、腫瘍組織に対する免疫染色からも、組織においてもCyclin D1の発現低下が起こっていることが裏付けられた(Figure 3C, D)。またゲムシタビン添加によってmiRNAは異なるクラスターを形成していた(Figure 4)。</p> <p>【結語】 ゲムシタビンのPDAC細胞における腫瘍増殖抑制効果は、機序として細胞周期関連蛋白の抑制による細胞周期停止の誘導が考えられる。ゲムシタビンの抗腫瘍効果に関連するmiRNAを複数同定することができ、ゲムシタビンによる膵癌治療における効果判定因子や新たな治療法への一助になる可能性がある。</p>			

Figure 1

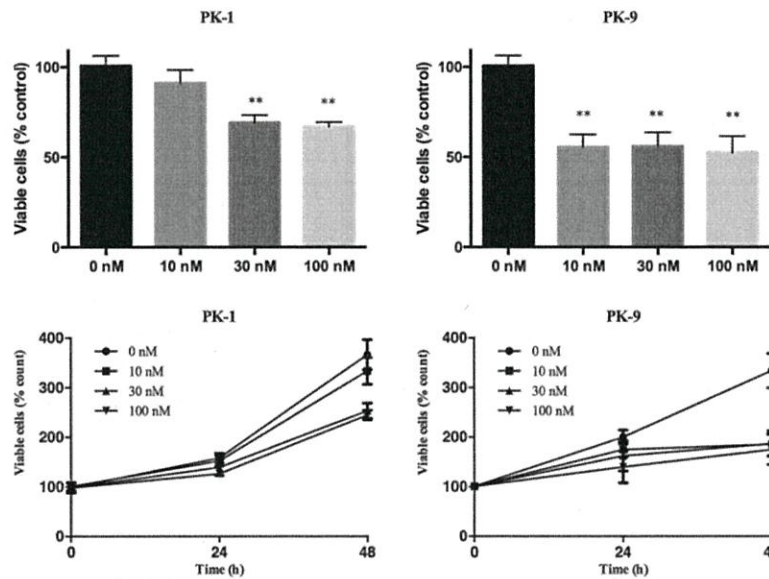


Figure 1. Gemcitabine inhibits the proliferation of PDAC cells. PDAC cells were incubated with 0, 10, 30, or 100 nmol/l gemcitabine for 48 h. Cell proliferation was evaluated by the CCK-8 assay. The results are expressed as the percentage of viable cells compared with the control (0 nmol/l). All treatments were significantly different from the control, based on Student's t-test (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control).

Figure 2

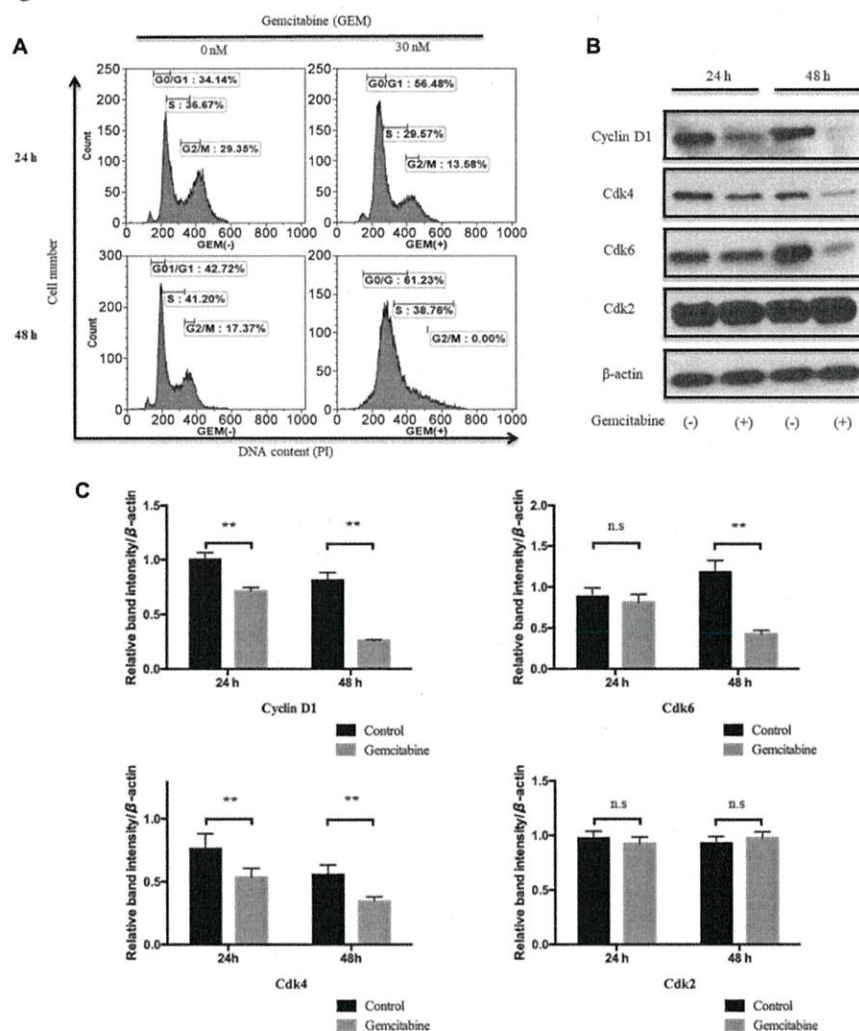


Figure 2. Gemcitabine induces S phase arrest in PK-1 cells (A) Representative results showing the distribution of PK-1 cells in G0/G1, S, and G2/M phases following treatment with 30 nM gemcitabine for 24 and 48 h. (B) Western blot showing expression of cyclin D1, CDK4, and CDK6 in PK-1 cells following treatment with 30 nM gemcitabine for 24 and 48 h. (C) Cyclin D1, CDK4, and CDK6 expression were decreased by 30 nM gemcitabine treatment compared with the control. The images are representative of three independent experiments, and protein levels were normalized to β-actin. Values represent mean ± SD; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control. n.s.: Not significant.

Figure 3

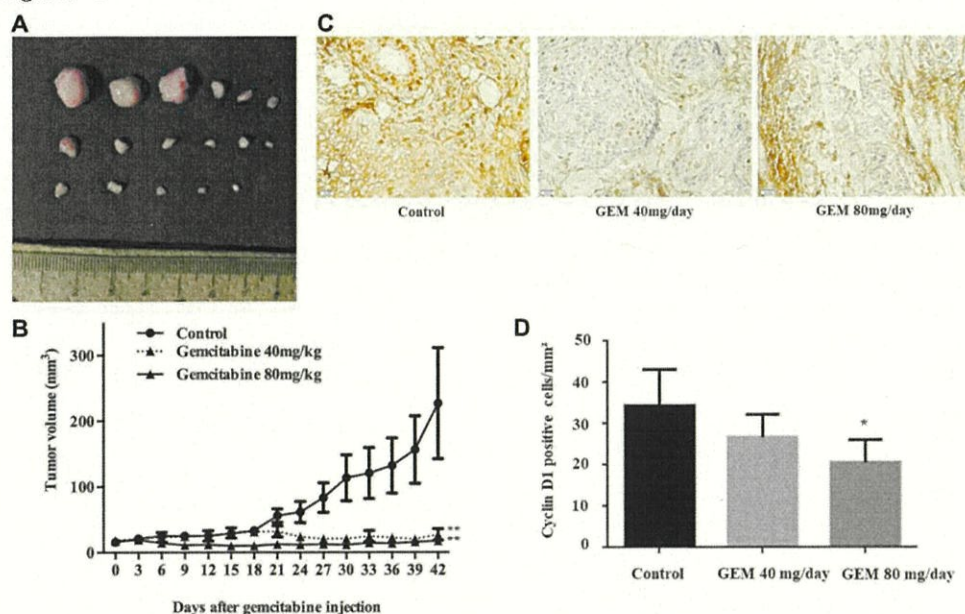


Figure 3. Gemcitabine inhibits the growth of PK-1 cell xenografts in nude mice. PK-1 cells were subcutaneously implanted into the flanks of nude mice. When the tumours became palpable, 0, 40 or 80 mg/kg gemcitabine were intraperitoneally injected five times per week for 42 days. (A) Tumour growth curves of control and gemcitabine treatment groups. (B) Tumours were significantly smaller in gemcitabine-treated mice compared with vehicle-treated mice. Each point represents the mean±standard deviation of eight animals (* $p<0.05$ and ** $p<0.01$ vs. control). (C) Immunohistochemical staining of cyclin D1 in cancerous tissues from gemcitabine-treated and control groups of xenografted mice. Cyclin D1-positive cells (black arrows) were decreased in mice treated with gemcitabine. (D) Cyclin D1-positive cells in gemcitabine-treated mice were reduced compared with untreated mice.

Figure 4

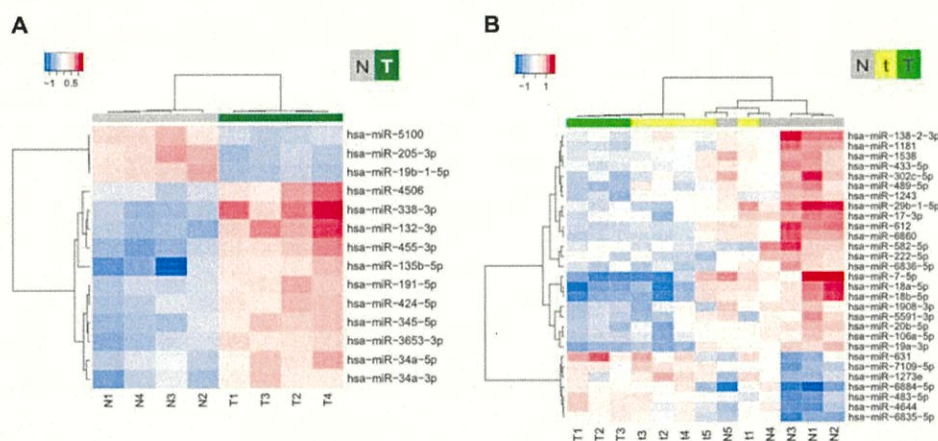


Figure 4. Hierarchical clustering of miRNAs in (A) PK-1 cells and (B) tumour tissues treated with or without gemcitabine. The analysed samples are shown in the columns, and the miRNAs are presented in the rows. The miRNA clustering colour scale presented at the top indicates the relative miRNA expression levels; red and blue represent high and low expression levels, respectively. Gray scale indicates no treatment. Yellow scale indicates 40 mg/kg gemcitabine, and light green scale indicates 80 mg/kg gemcitabine.

掲 載 誌 名	In vivo			第 卷, 第 34 号
(公表予定) 掲 載 年 月	2020年 5 月	出版社 (等) 名	International Institute of Anticancer Research	
Peer Review		有	無	

(備考) 論文要旨は、日本語で1, 500字以内にまとめてください。

