




学位論文審査の結果の要旨

令和 3 年 2 月 10 日

審査委員	主査	井形 尚		
	副主査	西山 成		
	副主査	南野 哲男		
願出者	専攻	医学	部門	
	学籍番号	17D716	氏名	藤田 直樹
論文題目	Antihypertensive drug telmisartan suppresses the proliferation of gastric cancer cells in vitro and in vivo			
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を用いて胃癌細胞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：胃癌細胞株としてMKN-1、MKN-45、MKN-74を使用し、種々の濃度(0~100 μM)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うる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MKN-74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は胃癌細胞株(MKN-1、MKN-45、MKN-74)において濃度依存性に細胞増殖の抑制効果を認めた。胃癌細胞株MKN-74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の胃癌細胞の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の胃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、SerpinE1の発現亢進を認めた。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が胃癌細胞に対して細胞増殖抑制効果を持つことをin vitro, in vivo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胃癌細胞の増殖を抑制することが示唆された。

令和3年2月10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) 胃癌の抑制系について、他の癌腫と比較し同じ薬剤なのに作用機序が異なるのはなぜか。
(回答) 多くの癌腫において、細胞周期のG1アレストでアポトーシスが起るものとそうでないものがあるが、癌の多様性によるものと考えている。
- 2) テルミサルタンの投与濃度について、ヒトに用いる量と比較してどうか。
(回答) *in vitro*では数10~100倍と高容量だが、*in vivo*では2~4倍と実臨床に近い濃度で使用した。また経口投与は技術的に難しかったため、腹腔内投与とした。
- 3) miR-4294のアップレギュレーションが他と比較して高いがこれまでの報告はどうか。
(回答) 既報ではあまり報告はされていない。リアルタイムPCRも施行したが技術的な問題のためか、有意差は認めなかった。詳しい標的の同定等、今後の検討課題の一つになる。
- 4) microRNAをマーカーとし、telmisartanの抗腫瘍効果の効き具合に応用できるか。
(回答) 詳細な検討が進めば、今後応用できる可能性はあると考える。
- 5) 胃癌細胞株においてアンジオテンシンレセプターの発現はあったのか。
(回答) 既報において、今回使用した細胞株に発現を認めていた。
- 6) 胃癌細胞株にAT2を付加した場合に腫瘍は増殖するのか。
(回答) 既報において、腫瘍が増殖したとする報告を認めていた。
- 7) *in vivo*の組織で血管新生関連分子群は増殖していたのか。
(回答) *in vivo*の検体をホモジナイズし、細胞周期関連蛋白についてはウェスタンブロット法を施行したが、サイクリンD1やCdk4も有意差は認めなかった。血管新生関連分子群までは検討が及ばなかった。
- 8) 病態に関わるmiRNAとマーカーとしてのmiRNAがあると思われるが、今後創薬に関してどのような研究が必要か。
(回答) 時間はかかるが、特定のmiRNAを加えて一つずつ検討していくしかないのではと考える。
- 9) telmisartanがどのようなメカニズムで抗腫瘍効果に至っているか。様々な実験をしているが、どう結び付けるのか。
(回答) 当教室の報告にあるように、主なメカニズムは細胞周期の停止とアポトーシスになると考え、まずはフローサイトメトリーを中心に機序を検討した。その後、ウェスタンブロットで蛋白の同定を進めた。だが、上流の経路の同定は困難で、膜のレセプター等についてアレイを用いた解析を行った。さらにmiRNAを追加し、そこに関連がないか検討を進めた。今回の検討ではすべての実験系が一本の線とし結び付くのは難しかった。今後さらに検討を進める上での課題である。
- 10) miRNAの変化が細胞周期に与えた影響は何か。
(回答) 既報やmiRNAのデータベースも調べたが直接的に関与が分かったものはなかった。これについても今後の検討課題の一つである。
- 11) アポトーシスの誘導を調べる際、フローサイトメトリー法にどの染色を用いたのか。
(回答) Annexin Vを使用した。
- 12) 他のカスパーゼでは無く、カスパーゼ18を選んだ理由は何か。
(回答) 以前に肝細胞癌とtelmisartanの検討においてカスパーゼ18において有意差を認めた報告があった。今回の検討ではフローサイトメトリーにおいて、明らかなアポトーシスは誘導されていなかったが、以前の報告にあったこともあり、追加にて施行することとなった。
- 13) *in vivo*の実験を12日間で止めたのは理由があったのか。またtelmisartan投与の有無で癌組織の性状に何か変化はあったのか。
(回答) マウスには目立った変化はなかったが、有意差がついたため、その時点で止めてしまった。また組織の性状について外見上は明らかな差はなかった。
- 14) 疫学的に胃癌は増えているのか。
(回答) 高齢化に伴い、罹患数は増えている。若年者はピロリ陰性であり、またピロリ除菌治療も進んでおり、今後は減少の可能性があると考える。
- 14) Big dataでtelmisartanが胃癌を抑制した研究はあるのか。
(回答) 自身が調べた範囲では認めなかった。
- 15) 他のARBとtelmisartanとの比較はどうか。

(回答) 既報でもカンデサルタンは効果を認めている。今回の事前実験においてはテルミサルタンの方がむしろ効果を認めた。

16) PPAR γ を介した作用機序との関連はどうであったか。

(回答) telmisartanはPPAR γ の部分アゴニストになっており、少なからず影響が考えられる。だが、当教室における食道腺癌における検討においては、アンジオテンシンレセプターをブロックした上でtelmisartanを投与し、抗腫瘍効果を認めている。必ずしも主たる作用機序ではないと考えている。

17) Telmisartan単剤で他の化学療法に匹敵する程の効果は得られるのか。

(回答) 今回の検討で抗腫瘍効果は確かに認めたが、既存の抗癌剤に及ぶ程ではなかったと考える。現実的には既存の抗癌剤とtelmisartanを組み合わせると抗腫瘍効果を高めることができると考える。

令和3年2月10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	Oncology Reports		第 44 巻, 第 1 号
(公表予定) 掲載年月	2020 年 5 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。