

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第527号	氏名	小山尚子
審査委員会委員	主査氏名	吉岡秀克	
	副査氏名	石崎敏理	
	副査氏名	松浦亮子	
<p>論文題目 Telmisartan induces growth inhibition, DNA double-strand breaks and apoptosis in human endometrial cancer cells. (telmisartan はヒトの子宮内膜癌細胞株において細胞増殖抑制、DNA 二重鎖切断およびアポトーシスを誘導する。)</p> <p>論文掲載雑誌名 PLOS ONE</p> <p>論文要旨 telmisartan は angiotensin II type 1 (AT1) 受容体拮抗薬(ARB)として、広く使用されている降圧剤の一つであり、PPARγ (peroxisome proliferative activated receptor gamma)活性化作用を有している。近年、ある癌腫において telmisartan が抗腫瘍効果を示すことが in vitro の系で報告されている。その機序として AT1 受容体を介する系、PPARγ依存性・非依存性の経路が報告されている。本研究で、申請者らは子宮内膜癌に対する telmisartan による抗腫瘍効果について検討を行った。子宮内膜癌細胞株として HHUA、Ishikawa、HEC-59 細胞を使用した。この三種類の細胞株を用いて telmisartan をはじめとする ARB を添加し、WST-1 assay により細胞増殖抑制効果を検討した。また、PPARγ antagonist GW9662 を用いて、telmisartan の抗腫瘍効果の阻害について検討した。アポトーシスに関する実験として、アポトーシス誘導効果の検討は flow cytometry を用いて行った。アポトーシス関連タンパク質発現の解析は Western blotting 法および ELISA 法を用いた。また、caspase 3/7 活性を測定した。DNA double-strand break (DSB)については pulse-field gel electrophoresis (PFGE)およびγ-H2AX の免疫染色を行い検討した。in vivo の実験としてヌードマウスの皮下に HHUA 細胞を移植し、telmisartan を 100 μg/day、5日投与、2日休薬するスケジュールで49日間腹腔内投与した。 telmisartan は三つの子宮内膜癌細胞株において濃度依存性に細胞増殖抑制効果を認め、その作用は GW9662 の添加によって阻害された。しかし、その他の ARB の三剤には抗腫瘍効果は認めなかった。また、flow cytometry ではアポトーシスの誘導が確認された。HHUA 細胞株において Western blotting 法および ELISA 法にてアポトーシス関連タンパク質の発現の変化を認め、caspase 3/7 活性の増加があった。さらに同細胞株において PFGE 法より broken DNA の増加、免疫染色法により γ-H2AX 発現の増加を認めた。最後に、ヌードマウスを用いた実験で HHUA 腫瘍細胞の増殖抑制を認めた。 本研究において telmisartan が子宮内膜癌に対し抗腫瘍効果を持つことが示され、PPARγを介する知見が得られた。抗腫瘍効果の作用機序としてアポトーシスの誘導が関与していることが示され、さらに、DNA double-strand break が誘導されており、これらの作用機序により申請者らは telmisartan が抗腫瘍効果を示していると考えた。本剤は降圧剤としてよく知られた薬剤であるが、ヒト子宮内膜癌の治療薬としても役立つ可能性を示した論文であり、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 課・論	第527号	氏名	小山尚子
審査委員会委員	主査氏名	吉岡秀克	
	副査氏名	石崎敏理	
	副査氏名	松浦美子	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ARB 使用者に癌が少ないということは、子宮内膜癌でもあるのか。 2. これまでに例えば遺伝子検索などで検討された内膜癌の発癌過程と今回の研究との関連はあるのか。 3. 濃度 50、100 μM はどのように使い分けているのか。 4. <i>in vivo</i> の実験の投薬スケジュールはどのように決定したのか。 5. 実験に用いた三種類の細胞株は特徴として似ているが、ER(-)など、異なる性質を持つ細胞株は使わなかったのか。 6. パルスフィールドゲル電気泳動法の実験法について。 7. ノードマウスに投与された量はヒトの降圧剤として使用される量に比較し、何倍量か。 8. 腫瘍計測の計算式について。 9. telmisartan の効果はホルモン感受性の癌との関連はあると考えられるか。 10. 本研究に用いた3種類の細胞株での PPARγ の発現量を検討したか。また、正常細胞での PPARγ の発現量と比べて、癌細胞での発現量に増減は認められるのか。 11. early apoptosis と late apoptosis を検討しているが、その意義はどういうことか。 12. 本研究で用いている化合物の細胞透過性の知見について。 13. Fig 2 で 100 μM telmisartan 48 時間処理で Bcl-2 の発現量の低下を認め、同条件で DNA 切断活性 (Fig 6) および細胞死が増加している。一方で、100 μM telmisartan 24 時間処理で DNA 切断活性 (Fig 6) は有為に上昇しているにも拘わらず、Bcl-2 の発現量の顕著な低下を認めていない。この結果の解釈はどのようにできるのか。 14. PPARγ が関わる細胞死は様々な機序が考えられており、申請者も Bcl-2、Bcl-xL の発現や DNA 断片化などを検討しているが、PPARγ 非依存的な経路の関与 (Death receptor を介した経路など) の検討や考察を行ったか。 15. xenograft による細胞の腫瘍増殖能を telmisartan が阻害していることは示しているが、十分大きくなった腫瘍に対する効果は検討したか。 16. 細胞数が減少した時の細胞の形態はどうだったか。 17. マウスの実験で、得られた腫瘍の形態的な違いはあったか。 18. Ki67 は残存している腫瘍細胞すべてでほぼ陰性か。 19. 今後、投薬するには副作用のことを考えなければならないが、Fig S4にあるように、正常でも HEC-59 くらいの減少があるが、正常細胞での DSB やアポトーシスは検討したか。腫瘍細胞特異的な現象か。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 小山 尚子

論 文 題 目

Telmisartan induces growth inhibition, DNA double-strand breaks and apoptosis in human endometrial cancer cells.

(Telmisartan はヒトの子宮内膜癌細胞株において細胞増殖抑制、DNA 二重鎖切断およびアポトーシスを誘導する。)

要 旨

【緒言】 Telmisartan は angiotensin II type1 (AT1) 受容体拮抗薬 (ARB) として、広く使用されている降圧剤のひとつであり、選択的 PPAR γ (peroxisome proliferative activated receptor-gamma) 活性化作用を有する。近年、他の癌種において telmisartan が抗腫瘍効果を示すことが in-vitro で報告されており、その機序として AT1 受容体を介する系や PPAR γ 依存性および非依存性の経路の関与が報告されている。これまで子宮内膜癌細胞株において、telmisartan による抗腫瘍効果があるかどうかは報告がなく、in-vitro、in-vivo での検討を行った。

【対象及研究び方法】 HHUA をはじめ種々の子宮内膜癌細胞株を用いて telmisartan、他の ARB を添加し、WST-1 assay により細胞増殖抑制効果を検討した。PPAR γ antagonist GW9662 を用いて、telmisartan の抗腫瘍効果が阻害されるか検討した。アポトーシス誘導効果の検討は flow cytometry を用いて行った。アポトーシス関連蛋白発現の解析は Western blotting 法および ELISA 法を用いた。また caspase 3/7 activity を測定した。DNA double-strand break については pulsed-field gel Electrophoresis (PFGE)

および γ -H2AXの免疫染色を行い検討した。In-vivoではnude mouseにHHUAを皮下に移植し、telmisartanを100 μ g/day、5日投薬、2日休薬にて49日間腹腔内投与した。

【結果】Telmisartanは3つの子宮内膜癌細胞株において濃度依存性に細胞増殖抑制効果を認め、その作用はGW9662の添加によって阻害された。他の3つのARBでは抗腫瘍効果は認めなかった。また、flow cytometryではアポトーシスの誘導が確認された。Western blotting法およびELISA法にてHHUA細胞株においてアポトーシス関連遺伝子の発現変化を認め、caspase 3/7 activityの増加を認めた。PFGEにおいてHHUA細胞株においてbroken DNAの増加、免疫染色で γ -H2AX発現の増加を認めた。In-vivoの検討ではHHUA腫瘍細胞の増殖抑制を認めた。

【考察と結語】今回の結果からtelmisartanの子宮内膜癌細胞株における抗腫瘍効果はPPAR γ を介しているとの知見が得られた。また、抗腫瘍効果の作用機序としてアポトーシスが誘導されており、アポトーシス関連遺伝子の発現変化も確認した。更に、DNA double-strand breakが誘導されており、これらの作用機序により抗腫瘍効果を示していると考えられる。また、マウスによるin-vivoの検討でもtelmisartanの抗腫瘍効果が認められ、telmisartanはヒト子宮内膜癌において有効な薬剤である可能性が示され、今後の臨床応用が期待される。