



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Anoikis Induction and Inhibition of Peritoneal Metastasis of Pancreatic Cancer Cells by a Nuclear Factor- κ B inhibitor, (-)-DHMEQ [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	佐藤, 正法
Description	配架番号 : 2120
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11596号
Issue Date	2014-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57775
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Masanori_Sato_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 佐 藤 正 法

審査担当者	主査	教授	平	野	聡
	副査	教授	武	富	紹 信
	副査	教授	田	中	伸 哉
	副査	教授	山	下	啓 子

学位論文題名

Anoikis Induction and Inhibition of Peritoneal Metastasis of
Pancreatic Cancer Cells by a Nuclear Factor- κ B inhibitor, (-)-DHMEQ

(NF- κ B 阻害剤 (-)-DHMEQ による膵癌細胞のアノイキス誘導及び腹膜転移阻害)

学位申請者 佐藤正法は NF- κ B 阻害剤 (-)-DHMEQ による膵癌細胞のアノイキス（足場依存性アポトーシス）誘導効果及び腹膜転移阻害効果をヌードマウス膵癌腹膜転移モデルを用いて評価した。転移モデルでの腫瘍量の客観的評価のため、分泌型ルシフェラーゼである Gluc 遺伝子を安定導入した新規膵癌細胞株 AsPC-1-Gluc を樹立、分泌される Gluc の発光活性と腫瘍量との相関を *in vitro* / *in vivo* で証明した。(-)-DHMEQ の AsPC-1-Gluc に対する増殖抑制・アノイキス促進効果を MTT アッセイで示し、アノイキス抵抗性である AsPC-1-Gluc に(-)-DHMEQ がアノイキスを誘導することを Flow Cytometry を用いて示した。AsPC-1-Gluc を浮遊状態にすると、NF- κ B 構成蛋白 p65 の DNA 結合が増強し、cIAP-1、cIAP-2、FLIP といった抗アポトーシス分子の発現が増強するが、(-)-DHMEQ によりこれが抑制されることを ELISA と Western blot で確認した。アノイキス抵抗性である膵癌細胞株は、アノイキス感受性の細胞株に比して有意に多くの腹膜転移を形成することをヌードマウス移植モデルで示した。最後に、AsPC-1-Gluc 5×10^6 個をヌードマウス (n=6) に腹腔内注射し、その直後から Vehicle あるいは(-)-DHMEQ を 1 日 2 回腹腔内投与した。(-)-DHMEQ は血液中の Gluc の発光活性（腫瘍量を反映）でも 26 日目の解剖の結果でも腹膜転移を用量依存性に抑制したが、残存腫瘍組織の Ki-67 及び cleaved caspase-3 の免疫染色結果には差を認めず、既に形成された腫瘍組織に対する作用ではなく、そこに至る過程でアノイキス誘導が関与したと結論した。

公開発表では審査にあたり本研究における意義及び結果解釈、今後の臨床応用に向けた課題・発展性について質疑応答がなされた。まず副査の山下教授から、今回の実験系では腹膜播種形成の抑制を見ているがこれをアノイキス誘導として良いかということと、実際の臨床での使用法について質問があった。申請者は *in vivo* でアノイキスそのものを証明することが技術的に困難であるため、間接的にこれを評価ことができるモデルとして腹膜転移モデルを選択したこと、臨床応用においては、今回の結果からは既に形成された腫瘍に対する作用は弱いと考えられるので、細胞傷害性の抗癌剤と併用し、細胞傷害性の薬剤で固形腫瘍を、そこから浮遊して転移へと向かう細胞を(-)-DHMEQ で抑制するというコンセプトが考えられると回答した。次に副査の田中教授からは、実際に腹水中で増殖している細胞そのものへの効果を検討したかどうか、浸潤能抑制作用が関与している可能性、及び(-)-DHMEQ の薬理作用について質問があり、申請者は今回は腹水中の浮遊細胞を直接は検討していないこと、他の研究者がマウス腹腔内の浮遊細胞の回収を試みた際、技術的に困難であったと回答した。また、他の論文で(-)-DHMEQ による膵癌細胞株の浸潤能抑制効果も報告されており転移抑制機序の一端を担っている可能性があること、(-)-DHMEQ は

NF- κ B 構成蛋白のシステイン残基に共有結合して DNA 結合を阻害することを説明した。次に副査の武富教授から、(-)-DHMEQ の連日投与は短縮可能であったか、最初の 1 回の投与で十分だった可能性があるかと質問があり、申請者は最初の 1 回投与で差がついた可能性も否定できないが、後から浸潤抑制や血管新生抑制効果が発現する可能性、形成された腹膜転移巣から二次的に浮遊する細胞に対するアノキス誘導効果も予想されるため連日投与を選択したと回答した。最後に主査の平野教授から(-)-DHMEQ の EMT (上皮間葉転換) に対しての影響と、他の転移形式に対しての検討について質問があり、申請者は、アノキス抵抗性は EMT の一端を見ていると考えられ、NF- κ B と EMT の関連も報告されているので EMT 全体に与える効果について網羅的に検討することも今後の課題であること、今回使用した AsPC-1-Gluc で肝転移モデルが作成でき、分泌型ルシフェラーゼを用いた評価も可能であることを確認しているため、今後、膵癌で最も重要である肝転移についての検討も進めたいと回答した。

この研究の詳細は *Oncology Research* に掲載され、今後の臨床応用の可能性も期待される。研究発表の内容及びその後の質疑応答を通して、申請者は当該領域に関する深い見識と研究遂行能力を有すると判断し、審査員一同はこれらを総合的に評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。