



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ニューロメジンB受容体を標的としたACTH産生下垂体腺腫の新規治療法の探索〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	関崎, 知紀
Description	配架番号 : 2767
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15449号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89957
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SEKIZAKI_Tomonori_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 関崎 知紀

主査 教授 久住 一郎
審査担当者 副査 教授 田中 真樹
副査 准教授 乗本 裕明

学 位 論 文 題 名

ニューロメジン B 受容体を標的とした ACTH 産生下垂体腺腫の新規治療法の探索
(Exploration of novel treatment for ACTH-producing pituitary adenoma targeting neuromedin B receptor)

ニューロメジン B(NMB)は視床下部-下垂体-副腎系の刺激因子とされ、副腎不全状態のマウスの ACTH 産生細胞に発現している。また、乳癌等では腫瘍増殖を促進するとの報告もあり、クッシング病の治療標的となる可能性がある。本研究ではクッシング病に対する NMB 受容体(NMBR)拮抗薬の効果を検討した。まず、ヒト下垂体腺腫の病理検体を用い定量 PCR 法、免疫蛍光染色で NMB、NMBR 発現を評価したところ、ACTH 産生腺腫で NMB、NMBR 発現が増加していた。次に AtT-20/D16v-F2 細胞に NMBR 拮抗薬 PD168368 を投与したところ、ACTH の前駆蛋白である Proopiomelanocortin (POMC)の遺伝子・蛋白発現、培地 ACTH 濃度は PD168368 の濃度依存性に低下した。また、細胞周期に関与するサイクリン E1、CDK2 の遺伝子・蛋白発現も同様に低下し、細胞増殖も抑制された。AtT-20/D16v-F2 細胞を背部に皮下接種した BALB/c-nu マウスに 1.2mg/kg の PD168368 を 2 週間腹腔内投与したところ、PD168368 投与群で対照群に比べ有意に腫瘍体積増加率、血中 ACTH・コルチコステロンが低値だった。最後に、ACTH 産生腺腫に対し腺腫摘除術を受けた患者 7 例の初代培養細胞に PD168368 を投与し効果を確認した。PD168368 投与により 7 例中 4 例の初代培養細胞で POMC 発現低下を認め、うち 3 例で CCNE 発現低下を認めた。また、培地中 ACTH 濃度を評価し得た 5 例中 2 例で ACTH 低下を認めた。以上から NMBR 拮抗薬はクッシング病の新規治療薬となる可能性がある。また、サイクリン E はクッシング病で発現が増加し転写因子 E2F1 の活性化を介し POMC 発現を亢進させると報告されており、NMBR 拮抗薬の ACTH 産生腺腫への効果はサイクリン E の抑制を介している可能性が考えられた。

審査にあたり、まず副査の田中教授からは、ACTH 産生腺腫の免疫蛍光染色で ACTH と NMB・NMBR の発現が重なっておらず、自己分泌ではなく傍分泌の可能性あるかとの質問があり、申請者は初代培養細胞実験に用いた腫瘍の免疫組織染色では腫瘍全体に NMB・NMBR の発現が認められており、免疫蛍光染色の手技上の影響である可能性はあるが、腫瘍内で NMB を分泌する細胞と NMBR を発現している細胞が混在しており傍分泌の機序を介している可能性もあると回答した。また、初代培養細胞実験で薬剤投与により POMC 発現が上昇している症例があるとの指摘があり、統計処理は片側検定のみを行ったのか質問があった。これに対し申請者は POMC 上昇については薬剤投与などにより生じた細胞へのストレスが影響している可能性があり、検定法は片側検定を行ったと記憶しているが、詳細は再精査し学位論文に記載すると回答した。

次に副査の乗本准教授からは、PD168368 の EC50 はどのくらいか、また複数の NMBR 拮抗薬で同様の結果が得られるなど特異性は担保されているか質問があり、申請者は PD168368 の EC50

の数値は記憶していないが NMBR 拮抗薬の中では最も特異性の高い薬剤であり、別の NMBR 拮抗薬を用いた予備検討でも同様の結果が得られていることから NMBR への特異的な作用と考えていると回答した。また、NMB や NMBR の発現は病変部だけでなく正常組織においても発現しているのかと質問があり、申請者は中枢神経系や消化管などの正常組織にも発現はしているが、先行研究の ACTH 受容体ノックアウトマウスでは、他の臓器に比べ下垂体において発現が亢進していたと回答した。また、臨床応用にあたり薬剤の投与経路をどう考えているか質問があり、申請者は下垂体には血液脳関門がないため通常の血管内や経口での投与で効果が期待できると回答した。

最後に主査の久住教授からは、学位論文の初代培養細胞実験の結果において、7 例中 4 例中で有意に POMC 発現が低下したと記載があるが、症例 4 は有意差がついておらず表現方法は正しいのか質問があり、申請者は表現を修正し学位論文に記載すると回答した。また、免疫染色での NMB 発現と初代培養細胞実験の効果に関連がみられなかった点について、具体的にどのような検討を行ったか質問があり、論文にも記載した方がよいとの指摘があった。申請者は既報に基づいて免疫染色での NMB 発現を 3 段階に分けてスコアリングし検討したと回答し、論文にも記載すると回答した。また、NMBR のノックアウトマウスでの表現型について質問があり、申請者は既報では特に重篤な障害は報告されていないと回答した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。