

学位授与番号：乙 3 0 5 7 号

氏 名：孫 敬洙

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 25 年 4 月 24 日

学位論文名：

Doxycycline Induces Apoptosis in PANC-1 Pancreatic Cancer Cells
(ドキシサイクリンの PANC-1 細胞株に対するアポトーシス誘導効果)

主論文名：

Doxycycline Induces Apoptosis in PANC-1 Pancreatic Cancer Cell.
(ドキシサイクリンの PANC-1 細胞株に対するアポトーシス誘導効果)

学位審査委員長：相羽恵介教授

学位審査委員：大橋十也教授、田尻久雄教授

論文要旨

論文提出者名 孫 敬洙 指導教授名 矢永 勝彦

主論文題名

Doxycycline Induces Apoptosis in PANC-1 Pancreatic Cancer Cells
(ドキシサイクリンのPANC-1細胞株に対するアポトーシス誘導効果)

【背景】

膵臓癌は、診断後の5年生存率が10%未満と極めて予後不良な消化器癌である。根治的治療法は唯一外科的切除のみであるが、医療技術の進歩にかかわらず診断時にはすでに進行癌で、切除不能である症例が多い。現在の切除不能膵臓癌に対する標準化学療法は塩酸ゲムシタビンであるが、その治療成績は十分とはいえない。また、塩酸ゲムシタビンをはじめ、従来の化学療法には一定の細胞毒性があり、その副作用のために化学療法が継続できない症例や、全身状態悪化のために化学療法が開始できない症例を経験する。そのため、そのような症例に対してでも適応となりうる、副作用が少なく、抗腫瘍効果を有する新しい治療法を開発することが急務となっている。今回、テトラサイクリン系抗菌薬であるドキシサイクリンが、様々な癌に有効であるとの報告から、ヒト膵癌細胞株 PANC-1 においても抗腫瘍効果を有するか否かについて検討した。

【方法】

In vitro においては、PANC-1 細胞を培養し、DNA 断片化、細胞周期解析、ノーザンブロット解析、リボヌクレオプロテクションアッセイを行った。

また、*in vivo* において、生後 6~8 週の雌のヌードマウスに 1×10^7 の PANC-1 細胞を側腹部に移植して膵癌腫瘍モデルを作成した。6 週間後、腫瘍容積が 100mm^3 に達した後、移植腫瘍の対側皮下にそれぞれペレットを移植し、ドキシサイクリン含有ペレット群 ($n = 7$) とプラセボペレット群 ($n = 7$) を比較した。腫瘍の長径を毎週計測し、腫瘍容積は計算式 $V = ab^2/2$ にて算出した。7 週間後、すべてのマウスを犠牲死させ、移植腫瘍を摘出、計量した。腫瘍増殖の差異の比較には two-way repeated measures ANOVA を使用し、腫瘍重量の比較には two-tailed Student's *t*-test を用いた。 $P < 0.05$ にて有意とした。

【結果】

PANC-1 細胞株において $20 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では G_1 -S 期での細胞周期の停止および DNA 断片化が認められた。同時に p53, p21, FAS/FASL-関連遺伝子の転写増強が認められた一方、Bcl-xL と Mcl-1 の発現は低下した。細胞傷害レベル以下 ($5 \mu\text{g/ml}$) の濃度においても通常時およびパクリタキセル誘導時の IL-8 発現が抑制された。マウスの同所腫瘍移植モデルではドキシサイクリンの抗腫瘍効果は 80%であった。

【結語】ドキシサイクリンの抗腫瘍効果には IL-8 の誘導抑制、アポトーシス遺伝子の活性化、アンチアポトーシス遺伝子の抑制が関与している可能性がある。ドキシサイクリンは、マウスの同所腫瘍移植モデルにおける PANC-1 膵癌細胞株への殺細胞効果を有する。

論文審査の結果の要旨

孫 敬洙氏提出の学位申請論文は主論文 1 編、1 冊よりなり、主論文題名は「Doxycycline Induces Apoptosis in PANC-1 Pancreatic Cancer Cells(ドキシサイクリンの PANC-1 細胞株に対するアポトーシス誘導効果)」と題するもので、インパクトファクター(2011): 1.725 の英文誌 ANTICANCER RESEARCH 誌に発表されたもので、矢永勝彦教授のご指導によるものです。

次に主論文の要旨と審査内容をご報告致します。

膵臓癌は、診断後の 5 年生存率が 10%未満と極めて予後不良な消化器癌であります。切除不能原発進行膵臓癌に対する現在の標準的化学療法は、塩酸ゲムシタビンの単独療法ですが、その治療成績は十分とは言えません。さらに塩酸ゲムシタビンをはじめ、多くの抗がん薬は選択毒性が低いため、常に副作用が発現します。そのため、たとえ良好な効果が得られても、治療継続が困難であったり、一般状態が不良のためにそもそも化学療法の適応とならない症例も少なからず経験します。よって、そのような症例に対しても適応し得る、副作用が少なく、抗腫瘍効果に優れる新しい治療法を開発することは急務となっております。今回、抗菌薬として多用されているドキシサイクリンについてその抗腫瘍活性を *in vitro*、*in vivo*にて検討しました。

In vitro の検討では、ヒト膵癌細胞株 PANC-1 細胞を培養し、DNA 断片化、細胞周期解析、ノーザンブロット解析、リボヌクレアーゼプロテクションアッセイを行いました。

In vivo では、生後 6~8 週の雌のヌードマウスに 1×10^7 個の PANC-1 細胞を側腹部に移植して膵癌腫瘍モデルを作成しました。そして 6 週間後、腫瘍容積が 100mm^3 に達した後に、移植腫瘍の対側の皮下にそれぞれドキシサイクリン含有ペレットとプラセボペレットを包埋して、両群各々 7 匹を用いて比較しました。腫瘍の長径を毎週計測し、腫瘍容積は計算式 $V = ab^2/2$ にて算出した。治療開始 7 週間後、すべてのマウスを犠牲死させ、移植腫瘍を摘出、計量しました。腫瘍増殖の差異の比較には two-way repeated measures ANOVA を使用し、腫瘍重量の比較には two-tailed Student's *t*-test を用いました。

【結果】

In vitro では、ドキシサイクリン $20\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で G₁-S 期での細胞周期の停止および DNA 分断化が認められました。同時に p53, p21, FAS/FASL 関連遺伝子の転写増強が認められた一方、Bcl-xL と Mcl-1 の発現は低下しました。ドキシサイクリン $5\mu\text{g/ml}$ という細胞傷害レベル以下の濃度においても、対照条件およびパクリタキセル誘導時の IL-8 発現は抑制されました。マウス移植腫瘍モデルでは、ドキシサイクリンの抗腫瘍効果は 80% ありました。

【結語】

ドキシサイクリンの抗腫瘍効果は IL-8 の誘導抑制、アポトーシス遺伝子の活性化、抗アポトーシス遺伝子の抑制が関与していることが示唆されました。そしてドキシサイクリンは、

マウスの同所腫瘍移植モデルにおいても一定以上の抗腫瘍効果を発揮しました。以上の非臨床試験の結果より、今後ドキシサイクリンの臨床的有用性に新たな知見が得られました。このような研究成果について平成 25 年 4 月 4 日、田尻久雄教授、大橋十也教授、矢永勝彦教授ご臨席の下、公開論文審査委員会を開催致しました。席上、多くの質問がなされました。

- ヒト膵癌細胞株としてなぜ PANC-1 細胞を採用したか？
- ヒト膵癌細胞株には種々の組織型があるが、他の細胞株での検討はどうか？
- 標準治療薬であるゲムシタビンとドキシサイクリンとの比較研究はしたか？
- *In vivo*において p53, p21, FAS/FASL 関連遺伝子等の転写増強は検討したか？
- *In vivo*におけるドキシサイクリンの局所刺激性はどうか？
- ドキシサイクリンの抗菌効果は t-RNA を通した蛋白合成阻害であるが、今回の抗腫瘍効果について RNA への作用は検討したか？
- アポトーシスについて、TUNEL 染色など組織化学的同定の検討はしたか？
- *In vivo*においてマウスの生存期間は検討したか？
- ドキシサイクリンの副作用である光線過敏症を回避するためには、より低用量を用いて、かつパクリタキセルなどとの併用が期待されるが実験成績からはどうか？

など多くの質疑・討議がなされ、孫氏からは極めて適切かつ明快な回答がなされました。

その後、大橋教授、田尻教授と慎重審議の結果、本論文は抗がん薬抵抗性の膵臓癌に対して抗菌薬として既に安全に臨床使用されているドキシサイクリンの抗腫瘍性を *in vitro*、*in vivo* で示した有用な研究であり、今後の臨床応用を含め研究の発展を期待するものと判断されました。ここに学位申請論文として十分価値あるものと認めた次第であります。