

学位授与番号：甲 942 号

氏 名：春木孝一郎

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 25 年 5 月 8 日

学位論文名：

Inhibition of nuclear factor- κ B enhances the antitumor effect of paclitaxel against gastric cancer with peritoneal dissemination in mice

（NF- κ B 活性化抑制に着目した胃癌腹膜播種に対するメシル酸ナファモスタット併用パクリタキセル腹腔内投与の抗腫瘍効果の検討）

主論文名：

Inhibition of nuclear factor- κ B enhances the antitumor effect of paclitaxel against gastric cancer with peritoneal dissemination in mice.

（NF- κ B 活性化抑制に着目した胃癌腹膜播種に対するメシル酸ナファモスタット併用パクリタキセル腹腔内投与の抗腫瘍効果の検討）

学位審査委員長：田尻久雄教授

学位審査委員：靱山俊彦教授、相羽恵介教授

学位論文要旨

論文提出者名

春木 孝一郎

指導教授名

矢永 勝彦

主論文題名

Inhibition of nuclear factor- κ B enhances the antitumor effect of paclitaxel against gastric cancer with peritoneal dissemination in mice

(NF- κ B 活性化抑制に着目した胃癌腹膜播種に対するメシル酸ナファモスタット併用パクリタキセル腹腔内投与の抗腫瘍効果の検討)

Dig Dis Sci. 2013; 58: 123-131.

<要旨>

胃癌は依然として癌死亡の第2位を占める消化器癌である。腹膜腔は転移・再発の好発部位であり、腹膜播種は腹水貯留、消化管閉塞、水腎症等を来すため、患者のQOLを著しく低下させるとともに、予後を規定する重大な因子である。手術単独による根治は不可能で、化学療法が標準治療であるが、有効な治療法は開発されていない。近年、パクリタキセルは、その構造から腹膜播種に対して腹腔内投与の有効性が報告されており、胃癌・卵巣癌の腹膜播種患者に対する臨床試験が行われている。しかしながら、その効果は十分とはいえず、その原因としてパクリタキセルによって活性化される Nuclear factor κ B (NF- κ B) を介した抗癌剤耐性の誘導があげられる。NF- κ B は 1986 年に転写因子として報告されて以来、種々の癌細胞で活性化されアポトーシス抑制や癌の増殖、浸潤、転移に関与していることが明らかになっている。我々は以前の研究で、プロテアーゼインヒビターであるメシル酸ナファモスタットがヒト膵臓癌細胞株の NF- κ B を抑制することを報告した。そこで今回 NF- κ B 活性化抑制をターゲットとした胃癌腹膜播種モデルに対するメシル酸ナファモスタット併用パクリタキセル腹腔内投与の抗腫瘍効果の検討を立案した。

In vitro において、ヒト胃癌細胞株 (MKN-45) にパクリタキセルおよびメシル酸ナファモスタット投与し NF- κ B の活性化、アポトーシス誘導効果を評価したところ、メシル酸ナファモスタット併用によりパクリタキセル投与で活性化された NF- κ B が抑制され、アポトーシス誘導増強効果を認めた。*In vivo* において、MKN-45 をヌードマウスに腹腔内投与し、胃癌腹膜播種モデルを作成した。接種 1 週間後からメシル酸ナファモスタット群、パクリタキセル群、併用群、コントロール群に分けパクリタキセルを週 1 回、メシル酸ナファモスタットを週 3 回腹腔内投与した。併用群において、*in vitro* と同様に *in vivo* においてもパクリタキセルで活性化された NF- κ B が抑制され、アポトーシスが増強した。また、併用群ではパクリタキセル群と比較して、腹膜腫瘍結節数および重量の減少を認め、生存率の延長効果を認めた。

以上の結果より、メシル酸ナファモスタット併用パクリタキセル腹腔内投与は胃癌腹膜播種に対して新しい治療となりうると示唆された。

論文審査の結果の要旨

春木孝一郎氏の学位申請論文は、“Inhibition of nuclear factor- κ B enhances the antitumor effect of paclitaxel against gastric cancer with peritoneal dissemination in mice” (NF- κ B 活性化抑制に着目した胃癌腹膜播種に対するメシル酸ナファモスタット併用パクリタキセル腹腔内投与の抗腫瘍効果の検討) です。以下に、主論文の要旨と論文審査会の審査結果をご報告いたします。

胃癌は依然として癌死亡の第 2 位を占める消化器癌です。腹膜腔は転移・再発の好発部位であり、腹膜播種は腹水貯留、消化管閉塞、水腎症等を来すため、患者の QOL を著しく低下させるとともに、予後を規定する重大な因子です。手術単独による根治は不可能で、化学療法が標準治療ですが、有効な治療法は開発されていません。近年、パクリタキセルはその構造から腹膜播種に対して腹腔内投与の有効性が報告されており、胃癌・卵巣癌の腹膜播種患者に対する臨床試験が行われています。しかしながら、その効果は十分とはいえ、その原因としてパクリタキセルによって活性化される Nuclear factor κ B (NF- κ B) を介した抗癌剤耐性の誘導があげられます。NF- κ B は種々の癌細胞で活性化されアポトーシス抑制や癌の増殖、浸潤、転移に関与していることが明らかになっています。研究者らは、以前の研究で、プロテアーゼインヒビターであるメシル酸ナファモスタットがヒト膵臓癌細胞株の NF- κ B を抑制し、アポトーシスを誘導することを報告しております。胃癌に対してもメシル酸ナファモスタット併用による抗腫瘍効果の増強が期待されますが、有用性は明らかではありません。そこで今回 NF- κ B 活性化抑制をターゲットとした胃癌腹膜播種モデルに対するメシル酸ナファモスタット併用パクリタキセル腹腔内投与の抗腫瘍効果の検討を行いました。

In vitro において、ヒト胃癌細胞株 (MKN-45) にパクリタキセルおよびメシル酸ナファモスタット投与し NF- κ B の活性化、アポトーシス誘導効果を ELISA、western blot analysis、MTT assay、FACS を用いて評価しました。*In vivo* において、MKN-45 をヌードマウスに腹腔内投与し、胃癌腹膜播種モデルを作成しました。接種 1 週間後からメシル酸ナファモスタット群、パクリタキセル群、併用群、コントロール群の 4 群に分け治療を行いました。パクリタキセルは週 1 回、メシル酸ナファモスタットは週 3 回腹腔内投与しました。Primary endpoint として生存率評価を行いました (各 10 頭)。また、腫瘍移植後 28 日でマウスを犠牲死させ、腹膜腫瘍結節を摘出して評価を行いました (各 9 頭)。評価項目としては、腹膜腫瘍結節の数と重量の測定、また腫瘍からタンパクを抽出し、NF- κ B 活性化、アポトーシスの評価を ELISA、western blot analysis を用いて行いました。さらに、摘出腫瘍の切片を作成し、免疫学的染色として NF- κ B(p65)染色を行い、さらに TUNEL 染色でアポトーシスの評価を行いました。

In vitro において、MKN-45 細胞にパクリタキセルを投与すると NF- κ B が活性化され、メシル酸ナファモスタットを併用することで、NF- κ B が抑制されることを ELISA、western blot analysis で証明しました。一方、アポトーシス誘導タンパクである cleaved caspase-8、cleaved

caspase-3、cleaved PARP はパクリタキセル群と比較して併用群で増加しました。また、FACSによる cell cycle analysis では併用群でパクリタキセル群と比較してアポトーシス細胞である sub-G0/G1 期 (M1) の細胞数が増加しました。MTT assay では、併用群でパクリタキセル群と比較して有意に細胞増殖抑制効果の増強を認めました。一方、*in vivo* において、併用群ではパクリタキセル群と比較して有意な生存率延長効果を認めました。また腹膜腫瘍結節の数および重量を計測したところ、併用群ではパクリタキセル群と比較して、有意な減少を認めました。腫瘍組織では併用群でパクリタキセルによる NF-κB の活性化は有意に抑制され、cleaved caspase-8、cleaved caspase-3、cleaved PARP の増加を認めました。さらに、腫瘍組織切片での NF-κB 免疫染色において、併用群ではパクリタキセルにより増加した NF-κB の核内移行の減少を認め、TUNEL 染色においては併用群で TUNEL 陽性細胞の増加を認めました。

パクリタキセルは分子量が大きく脂溶性で、腹腔内投与後にはリンパ系から緩徐に吸収されるため腹腔内からのクリアランスが低く、極めて高い腹水中濃度が長時間にわたり維持されます。また抗腫瘍効果は濃度、時間依存的であるため腹膜播種に対して特に有効性が高いとされています。しかし、パクリタキセルなどの抗癌剤投与により NF-κB は活性化されます。そのため、抗癌剤耐性改善を目的とした NF-κB 阻害剤と抗癌剤の併用に関する研究が数多く報告されていますが、その有効性を示すことができていないものは少ない。メシル酸ナファモスタットは、すでにわが国で重症急性膵炎、DIC、慢性腎不全患者に広く安全に使用され、血管内に投与可能な薬剤であり、重症急性膵炎に対しては腹腔内投与の報告もあります。また塩酸ゲムシタビンと併用した臨床試験においても明らかな有害事象を認めていません。そのためメシル酸ナファモスタットは安全で有効な NF-κB 阻害剤であり、メシル酸ナファモスタット併用パクリタキセル腹腔内投与は、胃癌腹膜播種に対して臨床応用が可能な新しい治療法になりうると考えられます。

以上のことからメシル酸ナファモスタット併用パクリタキセル腹腔内投与は胃癌腹膜播種に対して新しい治療として、多くの患者さんの治療成績向上に寄与することが期待されることから臨床的意義はきわめて高いものと思われれます。

本論文に対する審査会は、平成 25 年 4 月 25 日 (木) に靱山俊彦教授、相羽恵介教授のご臨席のもと開催され、両教授より貴重なご意見、ご示唆をいただきました。席上、1) 本研究で用いた細胞株を選択した理由、2) パクリタキセルの抗癌作用の機序について、3) 他の抗癌剤で NF-κB は変化するのか、4) *in vivo* でのメシル酸ナファモスタットの量はどのように設定したのか、5) *in vivo* での投与薬剤の血中濃度の推移、腫瘍マーカーの測定について、6) 臨床応用に向けての問題点などの質問がありましたが、これらについて春木孝一郎氏は適切な回答と意見を述べました。

その後、審査会は慎重審議の結果、本論文を学位申請論文として十分に評価あるものと認めた次第です。