

学位授与番号：甲 974 号

氏 名：岩瀬 亮太

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 26 年 9 月 10 日

学位論文名：

NF- κ B 活性化抑制に着目した胆嚢癌に対するメシル酸ナファモスタット併用
塩酸ゲムシタビン療法抗腫瘍効果の検討

主論文名：

Combination chemotherapy of nafamostat mesylate with gemcitabine for
gallbladder cancer targeting nuclear factor- κ B activation.

(NF- κ B 活性化抑制に着目した胆嚢癌に対するメシル酸ナファモスタット併用
塩酸ゲムシタビン療法抗腫瘍効果の検討)

学位審査委員長：教授 田尻久雄

学位審査委員：教授 馬目佳信 教授 相羽恵介

論文要旨

(2部提出)

論文提出者名	岩瀬 亮太	指導教授名 矢永 勝彦
<p data-bbox="225 443 483 479">主論文題名</p> <p data-bbox="225 501 1409 584">Combination chemotherapy of nafamostat mesylate with gemcitabine for gallbladder cancer targeting nuclear factor-κB activation</p> <p data-bbox="225 604 1409 687">(NF-κB 活性化抑制に着目した胆嚢癌に対するメシル酸ナファモスタット併用塩酸ゲムシタビン療法の抗腫瘍効果の検討)</p> <p data-bbox="225 710 730 745">J Surg Res. 2013; 184: 605-612.</p> <p data-bbox="225 826 341 862"><要旨></p> <p data-bbox="225 884 1409 1393">胆嚢癌は一般に予後不良な消化器癌で、根治切除が最も有効な治療法であるが、発見時既に進行している事が多いため外科的切除を受けられる例が少ない。塩酸ゲムシタビンは進行胆嚢癌に対する第1選択となる抗癌剤であるが治療反応率は10~30%と低く、その効果は十分とは言い難い。その原因の1つとして、転写因子である nuclear factor kappa B (NF-κB)の活性化が考えられている。NF-κB 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腫瘍増殖・転移・抗癌剤耐性に関与していることが明らかになっている。過去の研究で、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-κB を抑制し、単剤または抗癌剤との併用で抗腫瘍効果を増強させる報告してきた。そこで今回 NF-κB 活性化抑制をターゲットとした胆嚢癌皮下腫瘍モデルに対するメシル酸ナファモスタット併用塩酸ゲムシタビン投与の抗腫瘍効果の検討を立案した。</p> <p data-bbox="225 1417 1409 1787">In vitro に於いて、ヒト胆嚢癌細胞株 NOZ に塩酸ゲムシタビンおよびメシル酸ナファモスタットを投与し、NF-κB 活性、アポトーシス誘導効果を検討したところ、メシル酸ナファモスタット併用群では NF-κB 活性を有意に抑え、細胞増殖抑制効果・アポトーシス誘導効果を認めた。In vivo に於いて、胆嚢癌皮下腫瘍モデルマウスに対しコントロール群、メシル酸ナファモスタット群、塩酸ゲムシタビン群、両者併用群の4群に分けて治療を行い腫瘍径の推移を測定したところ、併用群ではゲムシタビン単独群に比して有意に腫瘍増殖抑制効果を認めた。また、摘出腫瘍の NF-κB 活性は併用群でゲムシタビン単独群に比して有意に抑制されており、アポトーシス蛋白の誘導も認められた。</p> <p data-bbox="225 1812 1409 1895">以上の結果より、メシル酸ナファモスタット併用塩酸ゲムシタビン投与は胆嚢癌に対して有効な新しい治療法となりうると示唆された。</p>		

論文審査の結果の要旨

岩瀬亮太氏の学位申請論文は、“Combination chemotherapy of nafamostat mesylate with gemcitabine for gallbladder cancer targeting nuclear factor- κ B activation” (NF- κ B 活性化抑制に着目した胆嚢癌に対するメシル酸ナファモスタット併用塩酸ゲムシタビン療法の抗腫瘍効果の検討) です。以下に、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。

胆嚢癌は予後不良な消化器癌の一つで、切除可能であっても 5 年生存率は 40~50%と報告されています。早期発見されれば予後は良好ですが、初期症状に乏しいため発見時既に進行癌であることが多く、根治手術を行える症例は 40%にも満たないと言われていています。塩酸ゲムシタビンは進行胆嚢癌における第一選択となる抗癌剤の一つですが、その生存率は中央生存率が 7~8 ヶ月と極めて不良でその効果は十分とは言えません。効果不十分の原因の一つとして、抗癌剤により活性化される 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 は炎症・免疫に関係する転写因子の一つで、NF- κ B の活性化によりアポトーシスの抑制や癌の増殖、浸潤、転移などに関与する蛋白産生が誘導されます。これまでの研究で、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、単剤または抗癌剤との併用で抗腫瘍効果を増強させることを報告してきました。本研究では、NF- κ B 活性化抑制をターゲットとした胆嚢癌皮下腫瘍モデルに対するメシル酸ナファモスタット併用塩酸ゲムシタビン投与の抗腫瘍効果を検討しました。

In vitro において、ヒト胆嚢癌細胞株 (NOZ) に塩酸ゲムシタビンおよびメシル酸ナファモスタット投与して NF- κ B の活性化を ELISA にて、腫瘍増殖抑制効果を MTT assay にて、アポトーシス誘導効果を Western blot analysis, FACS を用いて評価しました。*In vivo* において、NOZ を雄のヌードマウスに皮下注射して胆嚢癌皮下腫瘍モデルマウスを作成し、Control 群、メシル酸ナファモスタット群、塩酸ゲムシタビン群、両者併用群 (Combination 群) の 4 群に分け、それぞれ治療を行いました。治療は 6 週間行い、その後すべてのマウスを犠牲死させ腫瘍を摘出しました。治療中の腫瘍径を適宜測定して評価し、摘出腫瘍の重量・体積も測定しました。摘出腫瘍より抽出した蛋白から NF- κ B の活性化、アポトーシス誘導効果を *In vitro* と同様に評価しました。

In vitro において、Combination 群では塩酸ゲムシタビン単独群に比して NF- κ B 活性を有意に抑え、細胞増殖抑制効果・アポトーシス誘導効果を認めました。*In vivo* において、Combination 群では塩酸ゲムシタビン単独群に比して有意に腫瘍増殖抑制効果を認め、摘出腫瘍の重量・体積とも、有意に小さくなることが明らかになりました。摘出腫瘍蛋白の NF- κ B 活性は Combination 群でゲムシタビン単独群に比して有意に抑制されており、アポトーシス蛋白の誘導も認められました。

本研究では胆嚢癌において、メシル酸ナファモスタットが塩酸ゲムシタビンにより活性化された NF- κ B を抑制することで、塩酸ゲムシタビンのアポトーシス作用を促進し、抗腫

瘍効果を増強することを示しました。NF- κ B は p65 と p50 の二量体により構成され、Inhibitor of κ B α (I κ B α) と結合し不活型として細胞質内に存在しますが、塩酸ゲムシタビンをはじめとした抗癌剤などの刺激は I κ B kinase complex の活性化を介して I κ B α のリン酸化を生じ、NF- κ B は I κ B α との結合が解かれます。この結合が解かれた NF- κ B が核に移行し転写活性を示すことで抗アポトーシス蛋白が産生され抗癌剤耐性の要因となると考えられます。メシル酸ナファモスタットは I κ B α のリン酸化を抑制することで細胞質内の NF- κ B と I κ B α の結合を維持し、NF- κ B の核内移行、抗アポトーシス蛋白の産生を抑制しています。本実験の結果より、メシル酸ナファモスタットによる I κ B α のリン酸化抑制と NF- κ B の核内移行抑制を示すことを明らかにしました。

研究者のグループは、膵臓癌に対してメシル酸ナファモスタットが塩酸ゲムシタビン投与により活性化された NF- κ B を抑制し、より高い抗腫瘍効果を有することを基礎的実験で証明し、切除不能膵臓癌に対するメシル酸ナファモスタット併用塩酸ゲムシタビンの臨床試験を開始しています。また膵臓癌や胃癌の腹膜播種に対しパクリタキセル腹腔内投与にメシル酸ナファモスタットを併用することで抗腫瘍効果が増強することも基礎的実験で証明してきました。胆道癌においても、NF- κ B の抑制をターゲットとした治療の検討は報告されているものの、塩酸ゲムシタビンと NF- κ B 阻害薬を併用し抗腫瘍効果を増強するという報告は本研究が世界で初めてであり、臨床的意義はきわめて高いものと考えられます。以上のことより、メシル酸ナファモスタット併用塩酸ゲムシタビン投与は胆嚢癌に対して有効な新しい治療法となりうることが示唆されました。

本論文に対する審査会は、平成 26 年 7 月 28 日 (月) に馬目佳信教授、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) 塩酸ゲムシタビンとメシル酸ナファモスタットの投与濃度設定の根拠、2) メシル酸ナファモスタットの NF- κ B 阻害機序、3) メシル酸ナファモスタットの単独での抗腫瘍効果、4) メシル酸ナファモスタットと他の抗癌剤との併用による効果の可能性、5) 本研究で用いた胆嚢癌細胞株 NOZ の組織型と生物学的特徴像、6) 皮下腫瘍モデル実験における体重減少、下痢などの副作用の発現について、7) メシル酸ナファモスタットに代わる NF- κ B 阻害剤について、8) 臨床で行う場合のメシル酸ナファモスタットの投与方法、9) これまでの研究で得られた結果と今回の結果の相違点、などの質問がありましたが、これらについて岩瀬亮太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。