



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1631号
学位記番号	第1166号
氏名	齊藤 健太
授与年月日	平成30年3月26日
学位論文の題名	Xanthohumol inhibits angiogenesis by suppressing nuclear factor- κ B activation in pancreatic cancer (キサントフモールは膵癌において nuclear factor- κ B の活性化を抑制し、腫瘍血管新生を阻害する) Cancer Science 2018; 109: 132-140
論文審査担当者	主査： 城 卓志 副査： 岡本 尚, 瀧口 修司

論文内容の要旨

【目的】

膵癌の悪性度は極めて高く、消化器癌の中で最も予後が悪い。既存の化学療法や放射線療法の効果も十分ではなく、新規分子標的薬剤の開発は急務である。膵癌において抗癌剤が効きにくい理由として、転写因子NF- κ Bが恒常的に活性化していることが挙げられる。我々は転移能の高い膵癌細胞株において、NF- κ Bの活性がさらに高く、血管新生能も高いことを報告した。さらに、NF- κ Bを抑制することにより、血管新生因子であるVEGFやIL-8の産生が低下し、血管新生を抑制することも報告した。これらのことからNF- κ Bは新規分子標的薬剤のターゲットになりうると思う。しかし、既存のNF- κ B阻害薬は副作用が強いことから臨床応用にはいたっていない。また、近年、比較的毒性が弱いと考えられている天然化合物において、強い抗炎症効果をもつことが多数示され、その作用機序に転写因子NF- κ Bシグナルの関与が報告されている。以上から、我々はホップから生成された天然化合物であり、高い抗炎症作用を有するプレニルフラボノイドのキサントフモール(Xanthohumol)に着目し、膵癌に対してキサントフモールがNF- κ B活性を抑制し、腫瘍血管新生を抑制することを検討した。

【方法と結果】膵癌細胞株(BxPC-3、AsPC-1、MIAPaCa-2)を使用し、以下の実験を行った。はじめに、キサントフモールの細胞増殖抑制効果をWST-1 assayを用いて評価したところ、すべての膵癌細胞株においてキサントフモール濃度依存的に腫瘍増殖抑制効果を認めた。続いて、転写因子NF- κ Bの活性化に対する、キサントフモールの抑制効果をELISA法にて検討した。NF- κ B活性はキサントフモール濃度依存的に低下し、さらにWST-1 assayにおいて細胞増殖に影響を与えない低濃度においても抑制効果を認めた。続いて、血管新生因子であるVEGFおよびIL-8に対して、それぞれのmRNAとタンパクの発現に対するキサントフモールの抑制効果をqRT-PCRとELISA法を用いて確認した。qRT-PCRにおいて、キサントフモール濃度依存的にVEGF、IL-8のmRNA発現減少を認めた。ELISA法でも同様に、VEGF、IL-8におけるタンパク発現の減少を認めた。次に、血管新生に与える影響を確認するため、double-chamberを用いて血管内皮細胞と線維芽細胞を共培養し、血管内皮細胞の管腔形成能の変化を評価するangiogenesis assayを使用した。最初に膵癌細胞による血管内皮細胞の管腔形成能の変化を検討したところ、膵癌細胞との共培養により血管内皮細胞の管腔形成能の亢進を認めた。次に、それに対するキサントフモールの抑制効果を評価したところ、管腔形成能はキサントフモールにより有意に抑制された。最後に、ヌードマウスを用いて膵癌皮下移植モデルを作成し、キサントフモールの抗腫瘍効果を検討した。さらに、摘出した腫瘍を免疫染色法にて評価し、細胞増殖や血管新生に対する影響を検討した。ヌードマウスの皮下に膵癌細胞株BxPC-3を移植し、その後キサントフモールを5週間腹腔内投与したところ、キサントフモールによる腫瘍縮小効果を認めた。摘出腫瘍に対する免疫染色においては、キサントフモールを投与した群において、Ki-67の発現低下、microvessel densityの低下、p65、VEGF、IL-8の発現低下を認めた。VEGF、IL-8は免疫染色の他にPCRも行い、mRNA発現の低下もそれぞれ確認した。

【結論】膵癌細胞に対して、キサントフモールは細胞増殖抑制効果を示した。また、転写因子であるNF- κ Bの活性化を抑制することにより、腫瘍血管新生を低下した。ヌードマウスを用いた膵癌皮下移植モデルにおいても抗腫瘍効果、血管新生抑制効果を認めた。血管新生は膵癌の増殖に関して非常に重要な因子であり、キサントフモールの膵癌に対する新規治療薬の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

【目的】

膵癌の悪性度は極めて高く、消化器癌の中で最も予後が悪い。膵癌において抗癌剤が効きにくい理由として、転写因子 NF- κ B が恒常的に活性化していることが挙げられており、我々も NF- κ B が膵癌血管新生において重要な役割を果たしていることを報告してきた。しかし、既存の NF- κ B 阻害薬は副作用が強いことから臨床応用にはいたっていない。また、近年、比較的毒性が弱いと考えられている天然化合物において、強い抗炎症効果をもつことが多数示され、転写因子 NF- κ B シグナルの関与が報告されている。以上から、我々はホップから生成された天然化合物であり、高い抗炎症作用を有するキサントフモール (Xanthohumol: XN) に着目し、膵癌に対して XN が NF- κ B 活性を抑制し、腫瘍血管新生を抑制することを検討した。

【方法と結果】

膵癌細胞株 (BxPC-3、AsPC-1、MIAPaCa-2) を使用した。XN は WST-1 assay において、細胞増殖抑制効果を認め、NF- κ B の活性化に対しては、濃度依存的に抑制した。続いて、血管新生因子である VEGF および IL-8 の発現を評価した。RT-PCR、ELISA において、それぞれの mRNA とタンパクの発現低下を認めた。次に、機能評価として、angiogenesis assay を行った。膵癌細胞との共培養により血管内皮細胞の管腔形成能は亢進し、XN はそれを有意に抑制した。最後に、ヌードマウスを用いて膵癌皮下移植モデルを作成し、XN の抗腫瘍効果を検討した。XN を 5 週間腹腔内投与したところ、腫瘍縮小効果を認め、摘出腫瘍に対する免疫染色においては、XN 群において、Ki-67 の発現低下、microvessel density の低下、p65、VEGF、IL-8 の発現低下を認めた。VEGF、IL-8 は免疫染色の他に PCR も行い、mRNA 発現の低下もそれぞれ確認した。

【結論】

膵癌細胞に対して、XN は転写因子である NF- κ B の活性化を抑制することにより、腫瘍血管新生を低下した。膵癌皮下移植モデルにおいても抗腫瘍効果、血管新生抑制効果を認めた。血管新生は膵癌の増殖に関して非常に重要な因子であり、XN の膵癌に対する新規治療薬の可能性が示唆された。

主査 城教授から、①乏血性腫瘍の膵癌に対し、なぜ血管新生阻害に着目したのか、②NF- κ B の活性を ELISA 法にて測定できる原理について、③NF- κ B をノックダウンした実験をしたかどうか、④XN の臨床試験の可能性があるかなど、計 7 項目の質問があった。

副査 岡本教授からは、①膵癌の悪性度が高い理由は何か、②XN の抗酸化作用と抗酸化物質を治療薬として用いる危険性について、③XN による IL-8 や VEGF の抑制効果が、mRNA レベルよりタンパクレベルの評価実験で強く現れた理由は何か、④一般的に難治性癌を特徴づける因子は何かなど、計 17 項目にわたり質問がなされた。

副査 瀧口教授からは、①今回の研究において考えられる Limitation には何があるか、また次への研究のためには何が必要か、②XN を治療薬として確立する際、必要となる研究は何かについて質問がなされた。

これらの質問に対し、一部返答に窮することもあったが、おおむね満足すべき回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。本論文は XN の血管新生抑制効果を膵癌において初めて示した論文であり、その作用機序には NF- κ B の活性抑制が示唆されている。以上より、XN の膵癌に対する新規治療薬への可能性を示唆しており、意義のある研究といえる。従って、本論文の著者は博士 (医学) の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 城 卓 志 副査 岡 本 尚 瀧 口 修 司