



Title	C-type natriuretic peptide in combination with sildenafil attenuates proliferation of rhabdomyosarcoma cells
Author(s)	銭谷, 昌弘
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/55790
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	銭谷 昌弘
論文題名 Title	C-type natriuretic peptide in combination with sildenafil attenuates proliferation of rhabdomyosarcoma cells (C型ナトリウム利尿ペプチドがシルデナフィルとの併用で横紋筋肉腫の増殖を抑制する)
論文内容の要旨 〔目 的(Purpose)〕 小児軟部肉腫の代表である横紋筋肉腫は、集学的治療により近年予後は改善されつつあるが、未だ満足のいく成績には至っていない。また成長発達障害や二次がんといった小児特有の合併症が治療上の大きな問題となっており、治療関連合併症の発生を減らす治療戦略が求められている。C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) は主に血管内皮から分泌されるペプチドホルモンであり、抗炎症・抗線維化作用を有するため各種病態モデルに対して保護的に作用することが報告されている。CNPは血管平滑筋や線維芽細胞をはじめ様々な間葉系細胞に増殖抑制効果を有するため、間葉系悪性腫瘍である横紋筋肉腫に対してCNPが増殖抑制効果を有するという仮説のもと、この効果とメカニズムについて検討した。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 方法：横紋筋肉腫臨床検体（胎児型2例、胞巣型3例）と横紋筋肉腫細胞株（胎児型：RD, RMS-YM, KYM-1、胞巣型：RH30）を用いて、CNPの受容体であるguanylyl cyclase B (GC-B)の遺伝子発現をqRT-PCR法で評価した。GC-Bの発現を認めたRD,とRMS-YMに対してCNPを添加後の細胞内cyclic guanosine monophosphate (cGMP)をradioimmunoassay (RIA)法で測定した。細胞株と比較して臨床検体でGC-Bが高発現し、また細胞株は継代するごとにGC-Bの発現が低下したため、RDとRMS-YMに対してレトロウイルスベクターを用いてGC-Bの安定発現細胞株（RD-GC-B, RMS-YM-GC-B）を樹立し、以降はGC-B安定発現細胞株を用いて実験を行った。またcGMPはphosphodiesterase (PDE)によって速やかに分解されるため、cGMPの分解を阻害すべく選択的PDE5阻害剤（シルデナフィル）を併用することとした。in vitroの増殖試験はWST-8 assayを用いて評価し、CNPやシルデナフィル添加後の蛋白発現はWestern blotting法で評価した。in vivoでは、6週齢BALBc nu/nu雄マウスにRD-GC-Bの腫瘍塊（5mm角）を埋め込み、1週間後に治療を開始した。治療はCNP (2.5μg/kg/min 持続皮下投与)またはSildenafil (20mg/kg, i.p. 隔日投与)を投与し、予測腫瘍体積 (0.5×長径×短径²(mm³))と最終腫瘍重量を測定し、腫瘍の蛋白発現をWestern blotting法で評価した。 成績：全ての横紋筋肉腫臨床検体と横紋筋肉腫細胞株ではRDとRMS-YMのみにGC-Bの遺伝子発現を認めた。また臨床検体のGC-B遺伝子発現量はRDやRMS-YMと比較して約5-26倍であった。またCNP添加後のRDとRMS-YMにおいて、CNPの濃度依存性に細胞内cGMP濃度の上昇を認め、生理活性を有することを確認した。in vitroの増殖試験において、RD-GC-BやRMS-YM-GC-Bに対してCNP添加により増殖抑制効果を認め、シルデナフィルを併用することでCNPの増殖抑制効果が増強した。またこのメカニズムとしてリン酸化extracellular signal-regulated kinase (ERK)の蛋白発現を評価したところ、CNP添加によりERKのリン酸化が抑制され、シルデナフィルはCNPによるERKの脱リン酸화를増強し、効果を持続させた。in vivoにおいて、CNP単独ではRD-GC-Bの増殖抑制は認めなかったが、シルデナフィルを併用することで腫瘍増殖抑制効果を認めた。またCNPやシルデナフィル治療後の腫瘍検体でERKの脱リン酸화를認め、これらの併用では単独と比較して強いERKの脱リン酸화를認めた。 〔総 括(Conclusion)〕 以上よりCNPは横紋筋肉腫に対して、ERK/mitogen-activated protein kinases (MAPK)シグナルを抑制して増殖抑制効果を有すると考えられた。CNPとシルデナフィルの併用療法は、横紋筋肉腫に対して毒性の少ない新たな治療となりうる可能性が示唆された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 銭谷 昌弘			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	奥山 宏臣
	副 査	大阪大学教授	木蘭 恵一
	副 査	大阪大学教授	奥村 明之進

論文審査の結果の要旨

小児がんは治療関連合併症が問題であり、これを減らす治療戦略が求められている。C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) は様々な間葉系細胞の増殖を抑制するため、間葉系悪性腫瘍の横紋筋肉腫に対してCNPが増殖抑制効果を有するという仮説のもと、この効果とメカニズムを検討した。

横紋筋肉腫の細胞株は臨床検体と比較してCNP受容体のguanylyl cyclase B (GC-B)発現量が低く、また継代ごとに発現量が低下したため、GC-B安定発現細胞株を樹立した。またCNPがGC-Bに結合しcyclic guanosine monophosphate (cGMP)が産生されるが、cGMPはphosphodiesterase (PDE)によって速やかに分解されるため、選択的PDE5阻害剤 (シルデナフィル) を併用して検討した。CNPとシルデナフィルの併用によりERKリン酸化を阻害し、横紋筋肉腫の増殖を抑制した。この併用療法は毒性の少ない新たな治療となりうる可能性が示唆され、本研究内容は学位の授与に値するものとする。