



Title	Inhibition of Clusterin Represses Proliferation by Inducing Cellular Senescence in Pancreatic Cancer
Author(s)	Mitsufuji, Suguru
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/89547
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	光藤 傑
論文題名 Title	Inhibition of Clusterin Represses Proliferation by Inducing Cellular Senescence in Pancreatic Cancer (Clusterin阻害は細胞老化を誘導し膵癌の増殖を低下させる)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>浸潤性膵管癌（以下、膵癌）の根治的治療は外科的切除であるが、たとえ切除可能であってもその治療成績は十分なものとは言えず、新規治療標的の同定およびその治療開発は重要な課題である。今回、新規治療標的として、ストレス誘発性細胞保護シャペロン蛋白であるClusterin（以下、CLU）に着目した。CLUは、分子量75-80kDaのヘテロ二量体を形成する蛋白であり、核型と分泌型のアイソフォームが存在し、正常細胞ではDNA修復、組織修復、神経変性などの生理学的プロセスに関与する。一方、悪性腫瘍では、より生理活性を有した分泌型CLUが、増殖能、薬剤耐性、転移能において重要な役割を持つことが報告されているが、膵癌におけるCLUの意義は明らかではない。これまで他癌において分泌型CLUに対するアンチセンスヌクレオチドであるCustirsen（OGX-011）を用いた第II相、第III相臨床試験が行われ、その有効性が確認されつつある。本研究では、膵癌における分泌型CLUの働きを解析することで、治療標的となり得るかどうかを検討した。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>はじめに、分泌型CLUの発現が膵癌細胞に与える影響を検討した。分泌型CLUの発現を4種の膵癌細胞株（PANC-1、MiaPaCa2、BxPC3、PSN1）で、ウエスタンブロット法を用いて検討したところ、すべての細胞株においてその発現が認められた。以下の実験は、PANC-1、PSN1を用いて行った。分泌型CLUの発現抑制による膵癌細胞の増殖能を評価するために、siRNAを用いて分泌型CLUの発現抑制を行った。その結果、膵癌細胞の増殖は細胞播種後72時間で平均58.4%低下した（$P<0.01$）。続いて、増殖能が低下した機序について、アポトーシス、細胞周期、細胞増殖シグナル経路への影響を検討した。アポトーシスにおいては、Annexin V assay、ウエスタンブロット法を行ったが誘導は認められず、細胞増殖シグナル経路においては、AktおよびMAPK経路における評価を行ったが誘導は認められなかった。一方で、細胞周期においては、Cell cycle assayで、G1期細胞の割合が平均1.25倍に増加していた（$P<0.01$）。以上から、G1期での細胞周期の停止を特徴とする「細胞老化」に着目し、検討を追加した。</p> <p>老化細胞を検出するsenescence-associated β-galactosidase（SA-β-gal）染色を用いて評価したところ、分泌型CLUの発現抑制によって、SA-β-gal染色陽性細胞の割合が平均3.49倍に増加し（$P<0.01$）、形態学的にも老化細胞に特徴的な細胞の扁平化および肥大化を認めた。細胞老化の原因となるDNA損傷のマーカー（γH2AX）とその下流のp21の発現をウエスタンブロット法で評価したところ、分泌型CLUの発現抑制によりそれぞれの発現亢進が認められた。細胞老化で認められる細胞老化関連分泌現象（senescence-associated secretory phenotype：SASP）因子であるCXCL1、IL-1a、IL-1b、IL-6およびIL-8を測定したところ、分泌型CLUの発現抑制によって、全てのSASP因子の上昇を認めた。</p> <p>最後に、膵癌患者における分泌型CLUの発現の意義を、術前治療なしで根治切除を行った53例の切除検体を用いて免疫組織化学染色を行い、検討した。膵癌細胞における分泌型CLU発現がLangerhans島よりも高い症例をCLU高発現群（26例）、それ以外をCLU低発現群（27例）に分類したところ、CLU低発現群ではCLU高発現群に比して無再発生存率（$P=0.047$、3年無再発生存率 CLU低発現群：33.3%、CLU高発現群：7.69%）と全生存率（$P=0.019$、3年生存率 CLU低発現群：63.0%、CLU高発現群：34.6%）が良好であり、臨床的に分泌型CLUの発現は膵癌の切除後の治療成績に関与していた。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>膵癌細胞においては、分泌型CLUの発現抑制によって増殖能低下が誘導されること、そのメカニズムとしてG1期における細胞周期の停止とそれに寄与する細胞老化が関与していることを示した。分泌型CLUの高発現は膵癌切除後の予後不良因子であったことから、分泌型CLUの発現抑制は、膵癌切除後の予後改善に寄与する可能性がある。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 光藤 傑				
論文審査担当者	(職)	氏 名		
	主 査	大阪大学教授	江口 英利	署 名
	副 査	大阪大学教授	山本 浩文	署 名
	副 査	大阪大学教授	保山 通毅	署 名

論文審査の結果の要旨

これまで分泌型CLUに対するアンチセンスヌクレオチドであるCustirsenを用いた臨床試験が他癌で行われ、その有効性が確認されつつある。膵癌における分泌型CLUの働きを解析することで、治療標的となり得るかどうか検討した。本研究では、分泌型CLUの発現抑制により膵癌細胞の増殖能が有意に低下することを見出した。増殖能が低下した機序を評価すると、分泌型CLUの発現抑制によるアポトーシス誘導は認められなかったが、G1期細胞の増加を認めた。G1期での細胞周期の停止を特徴とする老化細胞を検出するsenescence-associated β -galactosidase染色では染色陽性細胞の割合が有意に増加しており、分泌型CLUの発現抑制により細胞老化が誘導されることが示唆された。臨床検体を用いた免疫組織化学染色において、CLU低発現群ではCLU高発現群に比して無再発生存率と全生存率が有意に良好であった。本研究は、分泌型CLUの発現抑制によって誘導される細胞老化が膵癌切除後の予後改善に寄与する可能性があることを示した。

本研究結果は、2022年4月 Annals of Surgical Oncology誌に発表されており、学位の授与に値すると考えられる。