



Title	Anti-tumor effect of avadomide in gemcitabine-resistant pancreatic ductal adenocarcinoma
Author(s)	西, 秀美
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/93039
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	西（川西） 秀美
論文題名 Title	Anti-tumor effect of avadomide in gemcitabine-resistant pancreatic ductal adenocarcinoma (avadomideはゲムシタビン耐性膵管癌に抗腫瘍効果を示す)
論文内容の要旨	
〔目 的(Purpose)〕	
膵癌は5年生存率が約10%と極めて予後不良な疾患である。その要因の一つとして、治療効果を認める薬剤が少ないことに加えて、主薬剤であるgemcitabine (GEM)に耐性を生じやすいことが挙げられており、GEM耐性を含む膵癌に有効な薬剤の開発が必要である。われわれは新規の膵癌治療薬の候補として、thalidomide誘導体に着目した。thalidomide誘導体は第2世代まで臨床応用されており、現在第3世代の開発が行われているが、その中のavadomideは、血液癌において強い抗腫瘍効果を示すことが報告されている一方で、膵癌を含む固形癌に関する検討はほとんどされていない。本研究ではavadomideが膵癌細胞株そしてGEM耐性誘導膵癌細胞株に抗腫瘍効果を示すかどうかを検討し、さらにその作用機序を明らかにすることを目的とした。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
(1) 膵癌細胞株 (Pancl, BxPC3, PSN1)を用いて、avadomideによる細胞増殖抑制効果をMTT assayで評価すると、濃度依存性に細胞の生存率低下を認めた(500 μ Mにおいて22.8-54.4%の低下)。Avadomideを投与し、apoptosisとcell cycleをflow cytometryで評価すると、Pancl, BxPC3においてapoptosis細胞はそれぞれ5.7, 15.2% ($p=0.0065$, $p<0.001$)、G1期細胞は11.0, 11.1% ($p=0.0201$, $p<0.001$)の増加を認めた。 (2) 次に、MiaPaCa2とMiaPaCa2から樹立したGEM耐性誘導膵癌細胞株(MiaPaCa2-GRs:MiaPaCa2-GR1, MiaPaCa2-GR2)を用いて、(1)と同様にMTT assay、apoptosis assay、およびcell cycle assayで評価すると、avadomideの濃度依存性に細胞の生存率低下を認め(500 μ Mで43.4-57.6%の低下)、MiaPaCa2-GRsでMiaPaCa2より有意に強い効果が得られた($p<0.05$)。Avadomideの投与により、apoptosis細胞はそれぞれ9.4, 14.6, 14.7% ($p=0.0002$, $p=0.0107$, $p=0.0002$)、G1期細胞は9.5, 20.2, 19.6% ($p=0.0166$, $p=0.0021$, $p<0.001$)の増加を認めた。さらに、MiaPaCa2-GRsにおいて、avadomideの投与の有無によるapoptosis関連蛋白とcell cycle関連蛋白の発現量の変化をWestern blottingで評価すると、同薬の投与によりpIκB蛋白発現の低下とcleaved caspase 3蛋白発現の増加を認めたため、NFκB経路阻害によるapoptosis誘導が示唆された。同時に、CDK4、CDK6、Cyclin D3蛋白発現の低下およびp18 INK4c、p21 Cip1、p27 Kip1蛋白発現の増加上昇を認め、G1/S checkpoint阻害によるG1期細胞周期の停止が示唆された。 (3) 血液癌ではavadomideは転写因子Ikarosを分解し、その下流にある<i>c-Myc</i>の転写を抑制することで、抗腫瘍効果を示すと考えられている。MiaPaCa2およびMiaPaCa2-GRsにおいて、avadomideの投与によるIkarosと<i>c-Myc</i>の蛋白発現量の変化をWestern blottingで評価し、低下することを確認した。 (4) 最後に、MiaPaCa2とMiaPaCa2-GRsを用いてマウス皮下腫瘍モデルを作成し、avadomideの効果を検討した。モデルマウス作成から29日後に腫瘍形成を確認し、avadomide投与群と無治療群に分け、57日後に腫瘍を摘出し評価した。なお、avadomide群については0.75mg/kgのavadomideを経口にて週5回4週間投与した。MiaPaCa2-GR2由来の皮下腫瘍の腫瘍体積の増加率は、avadomide投与群において無治療群と比較し低下した(113% vs 351%, $p=0.021$)。さらに、腫瘍の最大切片を用いてHE染色後に、画像解析ソフトで生細胞と死細胞を判定し、細胞生存率を算出すると、MiaPaCa2-GR1, MiaPaCa2-GR2において、avadomide投与群ではそれぞれ25.5, 15.6%低下した ($p=0.0012$, $p=0.0149$)。	
〔総 括(Conclusion)〕	
GEM耐性を誘導した株を含む膵癌細胞において、avadomideは細胞増殖を抑制すること、マウス皮下腫瘍モデルにおいても有効であることを示した。作用機序としては、avadomideは<i>c-Myc</i>を制御する転写因子Ikarosをターゲットとし、apoptosisやG1/S checkpoint阻害を誘導していると考えられた。 以上よりavadomideは、GEM耐性獲得を含む膵癌の治療において有効な治療法の選択肢の一つとな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) 西(川西)秀美			
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	島津 研三 署名
	副 査	大阪大学教授	山本 浩文 署名
論文審査の結果の要旨 膀胱癌は治療効果を認める薬剤が少なく、主薬剤のgemcitabine(GEM)に耐性を生じやすく予後不良である。新たな膀胱癌の治療薬の候補として、血液癌で抗腫瘍効果が確認されたthalidomide誘導体(avadomide)に着目し、GEM耐性を含む膀胱癌細胞株に抗腫瘍効果を示すかどうかを検討した。 Avadomideは膀胱癌細胞株4種とGEM耐性誘導膀胱癌細胞株2種で濃度依存性に細胞生存率を低下させた。また、flow cytometryを用いたapoptosis assayやcell cycle assayではPSN1以外の細胞株でapoptosis細胞の増加、G1期細胞の増加を認めた。Western blottingを用いた蛋白発現解析では、GEM耐性株でNFκB経路の阻害とG1/S checkpoint阻害が認められ、それぞれapoptosis誘導とG1期細胞周期の停止に関連していると思われた。加えて、既に血液癌で示された標的分子(Ikaros)を介する抗腫瘍効果の機序の存在を示した。最後に、GEM耐性株でマウス皮下腫瘍モデルを作成し、avadomide群とcontrol群に分け、治療期間終了後に腫瘍を摘出し検討すると、avadomide群で腫瘍体積の増殖抑制が、また腫瘍切片における生細胞の割合の低下が認められた。 本論文において、avadomideが膀胱癌の治療の選択肢の一つとなる可能性を示し、その効果についてのメカニズム解析も行っており、学位に値すると認める。			