

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御科学領域婦人科腫瘍学教育研究分野 氏名 田村良介
<p>(論文題目)</p> <p>4-Methylumbelliferone inhibits ovarian cancer growth by suppressing thymidine phosphorylase expression</p> <p>(4メチルウンベリフェロンはチミジンホスホリラーゼの発現を抑制することで卵巣癌の発育を阻害する)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>【目的】</p> <p>上皮性卵巣癌は早期では自覚症状に乏しく、癌性腹膜炎を呈してから診断される例が多く、婦人科領域では予後不良な疾患である。癌性腹膜炎に進行した場合、手術での完全摘出は困難であり術後化学療法が治療の主体となる。現在では様々な薬剤が化学療法に用いられているが、時に治療抵抗性を示す場合もあり、治療に難渋する症例もある。治療抵抗性卵巣癌を制御するため、新規の薬剤の開発が望まれている。4-methylumbelliferone(MU)は細胞でのヒアルロン酸合成の阻害剤として知られる物質である。これまでに MU は乳癌、肝臓癌等において抗腫瘍効果を示すことが実験的に示されているが、卵巣癌に対しての抗腫瘍効果を検討した報告はない。本研究では MU の卵巣癌細胞株に対する抗腫瘍効果を調べ、MU が卵巣癌の新規治療薬となりえるかどうかを検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>ヒト卵巣漿液性腺癌から樹立した細胞株である HRA 細胞株を今回の研究では用いた。</p> <p>1)8週齢の Fisher344 雌ラット 10 匹に大網切除術を施行後に HRA 細胞株を腹腔内投与することで癌性腹膜炎モデルを作製した。MU 投与群と control 群の 2 群に分け、MU 投与群(n=5)には HRA 細胞株を腹腔内投与した日から CMC 溶液 2ml に懸濁した MU100mg/body を連日腹腔内投与した。Control 群(n=5)には CMC 溶液 2ml のみを同様に連日腹腔内投与した。Control 群は Day14 までに全例死亡したため、MU 投与群は Day14 以降 MU 投与を行わず経過観察した。Day35 まで経過観察の後に屠殺し腹腔内所見を観察した。</p> <p>2)HRA 細胞株を 0mM, 0.2mM, 0.6mM, 1.0mM の各 MU 濃度に調整した MU 添加培地で 0、24、48、72 時間培養し、細胞増殖アッセイにて細胞の増殖を測定した。</p> <p>3) HRA 細胞株を 0mM, 0.2mM, 0.6mM, 1.0mM の各 MU 濃度に調整した MU 添加培地で 24 時間培養し細胞遊走アッセイと浸潤アッセイでそれぞれ測定した。</p> <p>4)HRA 細胞株を MU 非添加培地と MU 添加培地(MU 濃度 1.0mM)で 24 時間培養し、各細胞から RNA を抽出した。その抽出 RNA を用いて realtime reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)を行い、ヒアルロン酸の合成酵素である hyaluronan synthase (HAS)2 と HAS3、ヒアルロン酸の受容体である CD44、血管新生因子である vascular endothelial growth factor (VEGF)と thymidine phosphorylase (TP)の各 mRNA 発現を測定した。</p> <p>5)HRA 細胞株を 0mM, 0.2mM, 0.6mM, 1.0mM の各 MU 濃度に調整した MU 添加培地で 24 時間培養し、各細胞から蛋白を抽出し、その TP 発現を western blot 法にて測定した。</p> <p>【結果】</p> <p>1)ラット癌性腹膜炎モデルにおいて、control 群では Day13 で全例死亡したが、MU 投与群では 2 匹が Day35 までの長期生存を得た。両群間で生存期間に有意差を認めた(P <</p>	

0.05)。Control 群では高度の癌性腹膜炎と腹水貯留を呈していたのに対し、MU 投与群では腹腔内腫瘍の増殖抑制と腹水産生の抑制を認めた。

2)細胞増殖アッセイでは、MU の濃度依存性に HRA 細胞株の増殖能の抑制がみられた。72 時間の培養で MU 非添加培地と比べ、MU 0.2mM では 11%、0.6mM では 76%、1.0mM ではほぼ 100% の HRA 細胞の増殖抑制を認めた。

3)細胞遊走アッセイと浸潤アッセイでは、各 MU 濃度で培養した HRA 細胞株間で遊走能と浸潤能に差が見られず、HRA 細胞株の遊走能と浸潤能に対しては MU の影響は認められなかった。

4)HRA 細胞の TP mRNA 発現は MU 処理によって抑制を受けた。一方、HAS3 mRNA 発現は MU 処理による影響を受けなかった。また、HRA 細胞株の HAS2、CD44、VEGF mRNA 発現は MU 非処理と処理に関わらず、もともと低かった。

5)HRA 細胞株の TP 発現は MU 濃度依存性に抑制を受けた。

【考察】

MU は従来、ヒアルロン酸の合成を抑制することで、特に細胞の浸潤や遊走を抑制し、各癌種に対して抗腫瘍効果を示すとする報告が多い。しかし、本研究で用いた HRA 細胞株は HAS や CD44 といったヒアルロン酸に関わる因子の発現がもともと低レベルであった。また、細胞の遊走アッセイと浸潤アッセイでは、HRA 細胞株の遊走能と浸潤能は MU による影響を受けなかった。このことから、MU は HRA 細胞株に対してはヒアルロン酸とは違ったアプローチで抗腫瘍効果を示しているものと考えられた。

TP は platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF)とも呼ばれ、血管新生因子としての働きを持つ。また、TP は細胞のアポトーシスを抑止する作用を持つとも報告されている。MU は HRA 細胞株の増殖能を抑制していた。また MU はラット癌性腹膜炎モデルにおいて癌性腹膜炎の進展抑制と、生命予後の延長に寄与していた。この機序として、MU の TP 発現抑制によるアポトーシスの促進と、腫瘍における血管新生の抑制があるものと考えられた。

【結論】

MU の抗腫瘍効果を *in vivo*, *in vitro* で実験的に示した。MU は卵巣癌細胞の TP 発現を抑制することで細胞増殖と癌性腹膜炎の進行を抑制し生命予後の延長に寄与することが示唆された。MU は卵巣癌の新規治療薬となり得る可能性が示唆された。