

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御科学領域消化器外科学教育研究分野 氏名 吉田枝里
(論文題目)	
Antitumor effects of the hyaluronan inhibitor, 4-methylumbelliferone, on pancreatic cancer (4-メチルウンベリフェロンの膵癌に対する抗腫瘍効果)	
<p>【目的】</p> <p>膵癌は最も難治な固形癌の一種であり、集学的治療によっても治療成績は改善していない。この一因として、近年、膵癌組織に含まれる豊富な間質が癌細胞の生存を助長する環境を構築していることが報告されはじめている。</p> <p>ヒアルロン酸は細胞外マトリックスの主要な構成成分であり、癌細胞の増殖、浸潤、転移活性を高めることが知られている。4-methylumbelliferone (MU) は本学で発見されたヒアルロン酸合成抑制剤であり、現在、様々な癌種において実験的に有用性が報告されている。</p> <p>私達は、以前、ヒト膵癌肝転移モデルにおいて、抗癌剤と MU を投与すると抗癌剤単剤の場合よりも抗腫瘍効果が高まることを報告した。しかしその原因については明らかになっていない。今回、私達はヒアルロン酸合成抑制による癌細胞周囲の環境変化を培養細胞と担癌マウスを用いて、生化学的・組織学的に検討を行った。</p> <p>【方法】</p> <p><u>ヒト膵癌細胞 MIA PaCa-2 細胞実験</u></p> <p>培地は、10%ウシ胎仔血清を含むダルベッコ改変イーグル培地を用いた。細胞外マトリックスを可視化するために赤血球排除試験を行い、MU による細胞外マトリックスの変化を検討した。また、MU 処理後の細胞は、ヒアルロン酸結合タンパクを用いた免疫染色でヒアルロン酸を可視化した。ヒアルロン酸結合タンパクを用いた ELISA 法で細胞層ヒアルロン酸量定量を行った。MU の細胞増殖抑制効果は血球計算板を用いて培養細胞数を計測することで検討した。MU の細胞毒性は ELISA 法を用いて乳酸脱水素酵素 (LDH) を定量することで検討した。</p> <p><u>マウスの膵癌皮下腫瘍モデル実験</u></p> <p>生後 6 週の C.B17/Icr-scid マウスの左背部皮下に 4×10^6 個/0.2ml の MIA PaCa-2 細胞を接種した。接種 1 週間後にマウスをランダム化した。さらに 1 週間後より、2 g/kg/日の MU の経口投与を開始した。マウスはコントロール群と MU 投与群に分け、腫瘍体積の変化を追跡した。腫瘍体積は $\text{volume}(\text{mm}^3) = \text{length} \times \text{width}^2 \times 0.52$ の計算式を用い測定した。摘出した腫瘍は腫瘍内ヒアルロン酸量定量、免疫染色、電子顕微鏡検査でヒアルロン酸量や構造の変化を検討した。</p> <p>【結果】</p> <p><u>ヒト膵癌細胞 MIA PaCa-2 細胞実験</u></p> <p>赤血球排除試験では、コントロール群では細胞外マトリックスは細胞周囲の透明帯 (halo) として観察されたが、0.1 mM、0.5 mM の濃度の MU で処理を行うことにより halo の視認は困難となった。さらに、ヒアルロン酸の特異的消化酵素 (<i>Streptomyces hyaluronidase</i>) で処理を行うことによっても、halo の視認は困難となった。</p> <p>培養した MIA PaCa-2 細胞の免疫染色では、細胞質と細胞膜表面にヒアルロン酸染色帯</p>	

を認めた。培養細胞を MU で処理したところ、コントロール群と比べ、ヒアルロン酸染色帯の減少を認めた。細胞層ヒアルロン酸量の定量では、処理する MU の濃度が高くなるほど、コントロール群と比べてヒアルロン酸量の減少を認め、濃度 0.5 mM では 12%、濃度 1.0 mM では 29% の減少を認めた。

また、MU 処理により MIA PaCa-2 細胞の増殖抑制を認めた。MU を加えてから 72 時間後の比較では、コントロール群に対し、濃度 0.1 mM で 30.6%、濃度 0.2 mM で 48.0%、濃度 0.5 mM で 67.5%、濃度 1.0 mM で 83.9% の増殖抑制率が得られた。

LDH アッセイによる毒性試験では、MU は LDH を増加させなかった。

マウスの腭癌皮下腫瘍モデル実験

MIA PaCa-2 細胞の接種から 70 日目の評価で、腫瘍体積はコントロール群 7.02cm³、MU 投与群で 4.91cm³と、MU 投与群で減少を認めた。腫瘍内ヒアルロン酸量の測定では、腫瘍 1g あたりのヒアルロン酸濃度はコントロール群で 9.59mg/g、MU 投与群で 4.89mg/g と MU 投与群で有意な減少を認めた。マウス腫瘍切片で行ったヒアルロン酸染色でも同様に、MU 処理群ではコントロール群に比べ、染色域の減少を認めた。

電子顕微鏡による観察では、コントロール群と MU 投与群で核や細胞質の形態変化は認めなかったが、MU 投与群で細胞間質の菲薄化、間質内の空胞化が認められた。

【結論】

個々の腭癌細胞はその周囲にヒアルロン酸リッチマトリックスを保有しており、MU はこの形成を阻害することによって増殖を抑制することがわかった。また、MU は移植された癌組織中のヒアルロン酸合成を抑制する作用を有し、癌間質を粗造な構造へ変化させ腫瘍増大を抑制することが明らかとなった。さらに、MU は細胞膜を傷害する作用を有しないことから、既存の抗癌剤との併用によってより有効性の高い安全な治療法を提供しえる有力な候補であると考えられる。