

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 4年 長瀬 勇人
<p>(論文題目)</p> <p>4-Methylumbelliferone Suppresses Hyaluronan Synthesis and Tumor Progression in SCID Mice Intra-Abdominally Inoculated With Pancreatic Cancer Cells (膵癌細胞腹腔内投与マウスにおける 4-メチルウンベリフェロンのヒアルロン酸合成抑制作用および抗腫瘍効果)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>【背景・目的】 膵癌は早期診断が難しく、化学療法の奏効率も低いため、5年生存率が10%未満といまだ予後不良である。この一因として、膵癌間質の線維形成性が知られており、特に主要な構成成分であるヒアルロン酸（以下HA）は、癌細胞の増殖・移動・浸潤・転移・血管新生・薬剤抵抗性に関与し、その受容体であるCD44は膵癌幹細胞マーカーとして注目されている。</p> <p>4-methylumbelliferone（以下MU）はHA合成阻害作用を有し、さまざまな癌腫において抗腫瘍効果が報告されている。私達は過去にヒト膵癌肝転移モデルマウスやヒト膵癌皮下腫瘍モデルマウスにおいて、MUの抗腫瘍効果を報告したが、その作用機序はいまだ明らかではない。今回、私達はヒト膵癌細胞およびヒト膵癌細胞腹腔内投与マウスにおけるMUの抗腫瘍効果および作用機序について検討した。</p> <p>【手法】 全ての実験において10%ウシ胎仔血清を含むダルベッコ改変イーグル培地で培養したヒト膵癌細胞（MIA Paca-2）を用いた。赤血球排除試験にて細胞外マトリクスを可視化し、MUの細胞外マトリクスへの作用を検討した。MUの細胞増殖能・移動能・浸潤能への影響を評価した。またフローサイトメトリーを用いて、CD44発現、ヒアルロン酸結合能、アポトーシスへのMUの作用を検討した。CD44およびヒアルロン酸合成酵素（HAS）mRNA発現量に対するMUの作用はRT-PCRを行い検討した。</p> <p>生後7週のC.B17/Icr-scidマウスの腹腔内にMIA Paca-2（2×10^6 cells/0.2ml）を投与した。コントロール群とMU投与群に分けて、1週間後よりMUの経口投与（2mg/g/day）を開始し、コントロール群とMU投与群における生存期間を検討した。また、摘出した膵腫瘍中のヒアルロン酸への作用を評価するため、ヒアルロン酸定量（HA-ELISA法）および免疫染色を行った。</p> <p>【結果】 赤血球排除試験においてMUはヒアルロン酸を含む細胞外マトリクス構造を有意に減少させた。しかし、ヒアルロン酸合成酵素である <i>HAS3</i> mRNAはMUによってup-regulationされていた。<i>HAS1</i> mRNA、<i>HAS2</i> mRNAはコントロール群、MU投与群ともに検出感度以下であった。MU 0.5mMで処理した細胞では、コントロール群と比較して増殖能(26.4%)、移動能(14.7%)、浸潤能(22.7%)が有意に抑制されていた。また、CD44抗体を用いてCD44とHAの結合（HA-CD44 interaction）を阻害したところ、増殖能（29.7%）および移動能（16.2%）が抑制された。さらに、MU存在下で培養された細胞ではアポトーシスが有意に増加していた。</p> <p>フローサイトメトリーによる解析では、MIA Paca-2はほぼすべての細胞にCD44が発現しており、外因性に加えたヒアルロン酸との結合能を有していた。MU投与によるCD44発現およびヒアルロン酸結合能への影響は認められず、<i>CD44</i> mRNAの発現量もMU投与による変化は認められなかった。</p> <p>ヒト膵癌細胞を腹腔内投与したマウスは全例において膵腫瘍を形成し、主な死因は癌性腹膜炎であった。ヒアルロン酸定量（HA-ELISA法）および免疫染色のいずれにおい</p>	

でも腫瘍中に豊富なヒアルロン酸が確認されたが、MU投与群ではコントロール群と比較してヒアルロン酸量の有意な減少が認められた。また、平均生存期間はコントロール群40.8日、MU投与群43.8日であり、MU投与群において生存期間の延長が認められた ($p<0.05$)。

【考察・結語】

MUはヒト膵癌細胞の増殖・移動・浸潤を抑制し、アポトーシスを誘導することが明らかとなったが、類似の作用が抗CD44抗体を用いてHA-CD44 interactionをブロックすることでも観察された。これらのことから、MUはヒト膵癌細胞のCD44発現やヒアルロン酸結合能への直接的な作用を有さず、癌細胞周囲のヒアルロン酸を減少させることでHA-CD44 interactionを間接的に阻害し、抗腫瘍効果を発揮していると考えられた。

また、MUはヒト膵癌細胞腹腔内投与マウスにおいて腫瘍中のHAを減少させ、平均生存期間を延長した。膵癌組織の間質をターゲットとしている点で既存の抗癌剤と作用機序が異なり、また重篤な副作用を示さないことから、他の抗癌剤との併用療法が可能であり、MUは膵癌治療における新規補助剤として有用であると考えられた。