

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 須藤 亜希子
<p>(論文題目)</p> <p>Increase of tumor infiltrating $\gamma\delta$ T cells in pancreatic ductal adenocarcinoma through remodeling of the extracellular matrix by a hyaluronan synthesis suppressor, 4-methylumbelliferone</p> <p>(4-メチルウンベリフェロンによる膵癌間質抑制は腫瘍浸潤$\gamma\delta$T 細胞を増加させる)</p>	
<p>【目的】</p> <p>膵癌の高い生物学的悪性度や免疫・薬剤抵抗性の背景として、膵癌周囲間質増生の関与が指摘されている。4-Methylumbelliferone(MU)は、癌間質の主要構成成分であるヒアルロン酸(HA)の合成阻害作用を有する化合物であり、様々な癌腫に対して抗腫瘍効果を有することが報告されている。我々は以前、ヒト膵癌細胞株に対する MU の作用について、HA 合成と細胞外マトリックス(ECM)形成を抑制し、抗癌剤の抗腫瘍効果を増強することを報告した。しかし、MU の作用が免疫担当細胞に与える影響については明らかになっていない。今回我々は、MU の HA 合成抑制が免疫担当細胞の細胞障害性に与える影響について、ヒト膵癌細胞株およびヒト膵癌モデルマウスを用いて検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>10%ウシ胎仔血清を含むダルベッコ改変イーグル培地または RPMI-1640 培地で培養した4種のヒト膵癌細胞株(AsPC-1、BxPC-3、PANC-1、MIA PaCa-2)を用いて実験を行った。</p> <p>MU による細胞増殖能への影響は、セルカウンターを用いて培養細胞数を測定し検討した。ECM 形成への影響は、赤血球排除試験を行い ECM を可視化し、HA 特異的消化酵素(Streptomyces hyaluronidase、HYAL)処理群と比較して検討した。HA 合成への影響は、HA 結合タンパクを用いた免疫染色、競合法を用いた培地中 HA 定量を行い検討した。</p> <p>また、健常成人ドナーから採取した末梢血単核球分画(PBMC)を、10%ウシ胎仔血清を含む RPMI-1640 培地にヒトインターロイキン 2 とゾレドロン酸を加えて培養し、$\gamma\delta$ T-cell を培養増幅した($\gamma\delta$ T-cell-rich PBMC)。MU 処理したヒト膵癌細胞株に $\gamma\delta$ T-cell-rich PBMC を添加し、生存膵癌細胞数の測定を行い、PBMC の細胞障害性に MU が与える影響について検討した。</p> <p>生後 7 週の NOD/ShiJic:scid jcl マウスの背部皮下に BxPC-3 細胞($5 \times 10^5/0.2\text{ml}$)を接種し、膵癌皮下腫瘍モデルマウスを作成した。2 週後にマウスをランダム化し、コントロール群と MU 投与群に分け、MU の経口投与(2mg/g/day)を開始した。さらに 2 週後よりマウス腹腔内へ $\gamma\delta$ T-cell-rich PBMC ($1 \times 10^7/0.2\text{ml/week}$)を 4 週投与し、腫瘍体積($\text{mm}^3 = \text{length} \times \text{width}^2 \times 0.52$)を追跡した。摘出した腫瘍は HA 結合タンパクを用いた免疫染色、競合法を用いた HA 定量を行い、腫瘍組織 HA 量を検討した。加えて、ヒト CD3 抗体を用いた免疫染色を行い、CD3 陽性細胞の腫瘍内への浸潤を検討した。</p>	

【結果】

MU1.0mM 添加培地で培養した膵癌細胞(MU 添加群)では、コントロール群と比べて45~70%の有意な細胞増殖抑制を認めた。HA 免疫染色では、MU 添加群で HA 染色帯は減少していた。HA 定量では、MU 添加群で 55~80%の有意な HA 減少を認めた。赤血球排除試験により ECM を可視化すると、MU 添加群および HYAL 処理群で有意な ECM 形成抑制を認めた。MU 添加群に $\gamma\delta$ T-cell-rich PBMC を加えると、膵癌細胞は 14~32%の有意な生存率低下を認めた。

膵癌皮下腫瘍モデルマウスにおいて、接種から 56 日目の腫瘍体積は、MU および $\gamma\delta$ T-cell-rich PBMC 投与群では 1.18cm³、 $\gamma\delta$ T-cell-rich PBMC 単独投与群では 1.59cm³と、MU 投与群で有意に抑制された。腫瘍組織 HA 免疫染色では、MU 投与群で HA 染色帯は減少していた。腫瘍組織 HA 定量では、MU 投与群で 52%の有意な HA 減少を認めた。また、腫瘍組織の CD3 免疫染色にて、MU および $\gamma\delta$ T-cell-rich PBMC 投与群では、 $\gamma\delta$ T-cell-rich PBMC 単独投与群と比較して、腫瘍内への CD3 陽性細胞は有意に増加していた(p<0.05)。

【結論】

MU はヒト膵癌細胞株の増殖と HA 合成を *in vitro* および *in vivo* で抑制することが明らかとなった。加えて、MU の HA 合成抑制効果による細胞周囲の HA 減少は、膵癌細胞に対する $\gamma\delta$ T-cell-rich PBMC の細胞障害性を増強する可能性が示唆された。

MU は膵癌に対する免疫担当細胞の抗腫瘍効果を増強する新規治療として有用であると考えられた。

※1 乙の場合、○○領域○○教育研究分野にかえて、所属の○○講座を記入すること。

※2 論文題目が英文の場合は () 内に和訳を付記すること。