

氏名	千葉 文博
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 452 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 19 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	悪液質誘発における宿主側因子の検討—単一クローン腫瘍の移植部位の違いによる悪液質誘発—
論文審査委員	(委員長) 教授 山田 俊幸 (委員) 教授 簗田 清次 准教授 柏田 正樹

論文内容の要旨

1 研究目的

癌悪液質は食欲低下と骨格筋や蓄積脂肪の減少を伴う体重減少や代謝異常などを特徴とし、癌末期には大半の患者が陥る消耗状態である。癌悪液質は生命予後や生活の質を低下させる。よって、根治不能な進行癌患者に対する治療が生存期間の延長と生活の質の改善が主な目標となっている現状を考慮すると、癌悪液質の治療も癌治療と同等の意義があると考えられる。しかし、長年の研究によっても未だ治療法はない。

癌悪液質は癌の種類に関係なく発症し、癌の進行や転移の形成とともに発症することを考慮すると、腫瘍-宿主間の相互作用により誘発される因子が重要であることが示唆される。通常、腫瘍細胞はいくつかの細胞集団から構成され、移植した部位によって増殖する細胞集団が異なることが指摘されている。この研究では、このような要因を取り除き癌悪液質における宿主側因子をより明確にするため、マウス大腸癌コロネ 26 から限界希釈法によって得られた 1 個の細胞から樹立されたクローン 5 (C5) およびクローン 20 (C20) 腫瘍を用いた。C5 腫瘍をマウスの様々な組織や臓器に移植して、悪液質の状態を検討し、悪液質における宿主側の因子の重要性を明らかにするとともに、治療のターゲットとなる因子の同定を研究目的とした。

2 研究方法

C5 腫瘍は皮下移植で悪液質を誘発しないが、C20 腫瘍は悪液質を強力に誘発する。免疫機能や内分泌機能に異常のない CD2F1 マウス (オス) の鼠径部皮下 (C5 Cut)、腓腹筋内 (C5 Mus)、腹腔内 (C5 Per)、および胸腔内 (C5 Tho) に C5 腫瘍を移植した群と C20 腫瘍を鼠径部皮下に移植した群 (C20 Cut)、および腫瘍を移植しない群 (NTB) の 6 群で検討した。腫瘍移植後 14 日目に血液を採取し、各種臓器および腫瘍を摘出した。悪液質誘発の状態は、体重、餌摂取量および飲水量、精巢上体脂肪重量、および腓腹筋重量を指標とし、サイトカインやケモカイン濃度 (培養細胞ライセート、培養上清、移植腫瘍ライセート、マウス血清)、血中ホルモン濃度や血球検査と比較検討した。また、摘出した移植腫瘍の組織学的、免疫組織学的検討を行った。悪液質に特徴的な蓄積脂肪の減少に関与する肝臓内の Spermidine/Spemine N-1

Acetyltransferase (SSAT) の mRNA 発現量、アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) 量、マロニル CoA 量を測定し比較検討した。

3 研究成果

腫瘍移植 14 日後、NTB 群は体重が増加し C20 Cut 群は著明な体重減少を認めた。C5 Cut 群の体重は減少しなかったが、C5 Mus 群 > C5 Tho 群 > C5 Per 群の順で体重減少が著明であった。精巢上体脂肪重量および腓腹筋重量は C5 Cut 群では減少しなかったが、C5 Mus 群 > C5 Tho 群 > C5 Per 群の順で減少し、体重減少の順と一致していた。14 日間の総餌摂取量と体重減少との相関は必ずしも明確ではなかった。

C5 移植群間での検討において、末梢血白血球の上昇と悪液質の程度に相関がみられた。血中ホルモンでは悪液質の程度との関連が明確に認められるものはなかった。移植腫瘍ライセートのサイトカイン濃度は培養細胞ライセートの濃度の上昇傾向とは異なっており、さらにマウス血清中のサイトカインも、培養上清や移植腫瘍ライセートのサイトカイン濃度の傾向とは異なっていた。悪液質誘発因子として提唱されてきた血清中の IL-1 β 、IL-6、IFN- γ および GM-CSF は、悪液質の程度が強かった C20 Cut 群と C5 Mus 群で上昇がみられたが、悪液質を発症した C5 Per 群、C5 Tho 群では上昇していなかった。相関分析および重回帰分析では、悪液質と血清 IL-10 には密接な関係を認めたが、他のサイトカインとは関係を認めなかった。

C5 移植群の移植腫瘍の組織学的評価では、各群間における形態学的な違いは認められなかった。免疫染色では、悪液質に陥った C5 Mus 群、C5 Per 群、および C5 Tho 群の腫瘍内に著明な好中球の浸潤を認めた。

肝臓内 SSAT-mRNA 発現量は悪液質に陥ったマウスで上昇しており、C5 Mus 群、C5 Per 群、および C5 Tho 群では NTB や C5 Cut 群の約 2 倍であった。肝臓内の ACC 量やマロニル CoA 量は C5 Mus 群、C5 Per 群、および C5 Tho 群などの悪液質に陥ったマウスで減少していた。蓄積脂肪の減少を指標とした悪液質誘発状態と SSAT-mRNA 発現量やマロニル CoA 量との関係を検討したところ、全群 (C5 移植群、C20 Cut、NTB) のマウスの検討では脂肪重量と SSAT-mRNA 発現量に負の相関を認めたが、C5 移植群のマウスの検討では相関が認められなかった。一方、マロニル CoA 量は C5 移植群での検討と全群での検討で強い正の相関を認めた。

4 考察

皮下に移植しても悪液質を誘発しない C5 腫瘍の移植部位の違いによって、悪液質の誘発とその程度に大きな差を認めた。今回の検討では、免疫機能や内分泌機能に異常のないマウスに 1 個の細胞から樹立した腫瘍を移植していることや、腫瘍の移植部位の違いによる腫瘍の組織像の違いは指摘できなかったことから、悪液質の病態には宿主の反応が重要であることがわかった。このことは、移植腫瘍ライセートとマウス血清中のサイトカインやケモカイン濃度が、腫瘍の移植部位の違いによって異なっていたことから裏付けられる。

これまで悪液質誘発因子として指摘されてきた IL-1 β 、IL-6、および TNF- α と悪液質の病態との関係ははっきりしなかった。一方、癌患者で悪液質と密接な関係のあることが報告されている血清 IL-10 が、今回の動物モデルの悪液質誘発と密接な関係があった。また悪液質に陥った C5 Mus 群、C5 Tho 群、および C5 Per 群では、末梢血白血球数の上昇や移植腫瘍内

の好中球浸潤がみられた。悪液質患者では、末梢血好中球数や腫瘍内の好中球浸潤の多いことが報告されている。これらのことから、この動物モデルはヒトの癌悪液質の病態を検討する上で適切な動物モデルであると考えられた。しかし、今回の検討では、悪液質誘発に関与する単独もしくは少数のサイトカインやホルモンを指摘することができず、改めて悪液質の病態の複雑さを示す結果となった。

悪液質において蓄積脂肪の減少は重要な指標となる。マロニル CoA は ACC によってアセチル CoA から変換され脂肪酸の基質となるものである。加えて脂肪酸 β 酸化に関与するカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (CPT-1) を抑制している。そのためマロニル CoA 量の減少は脂肪酸合成低下と脂肪分解の亢進を誘発する。SSAT はサイトカインやホルモンによって活性化され、過剰発現すると補酵素であるアセチル CoA を消費してマロニル CoA の合成を減少させる。SSAT と脂肪重量の関係を検討したところ、C5 群のみでの検討では相関は認められず、C20 群を加えた検討で負の相関を認めた。ところが、マロニル CoA 量は C5 群のみの検討でも、C20 群を加えた場合でも脂肪重量と強い負の相関が認められた。このことより、SSAT の活性化に加えて、マロニル CoA を減少させるその他の因子も悪液質の病態に関与していることが推測された。

5 結論

悪液質の誘発には腫瘍-宿主間の反応が非常に重要であることがわかった。肝臓内マロニル CoA 量は悪液質の病態と密接な関係があり、今後新たな悪液質の指標や治療のターゲットとして検討対象になり得ると考えられた。

論文審査の結果の要旨

癌悪液質は癌末期に大半の患者が陥る消耗状態で、生命予後や生活の質を左右する。その機序を解明し、治療法を開発することは癌本体に対する治療とともに癌医療の大きなテーマである。癌悪液質とは、単なる慢性炎症状態ではなく、食欲低下と筋や脂肪組織の喪失による体重減少を特徴とする。その生物学的な背景は未だ不明な部分が多い。

本学総合医学2の外科グループは20年来このテーマに取り組んでいる。そのアプローチの一つは大腸癌コロネ26から樹立した2つのクローン(C20とC5)を用いた、培養ならびにマウスへの移植実験である。申請者はこのグループの研究に途中参加した形で、従前には以下のような知見が得られていた。

(1) 皮下移植でC20は悪液質を誘発するが、C5は誘発しない。(2) C20とC5の差異(発現分子など)は明確ではない。(3) C20の悪液質誘発の一部は宿主が反応性に産生するIL-6で説明できるが、完全ではない。その理由として、IL-6をチャレンジしても完全な悪液質は誘発されないことや、C5移植でもIL-6が少なからず誘導されることがあげられる。

そこで申請者は悪液質の誘発には癌細胞そのものだけでなく、それが移植された環境も重要な因子であるとする仮説を立て、皮下に移植しただけでは悪液質を誘発しないC5を筋肉内、腹腔内、胸腔内へ移植して悪液質が誘発されることを確認した上で、それぞれの移植での液性分子、細胞応答を検討した。なお、ここでは悪液質の客観的指標として、体重、餌摂取量

および飲水量、精巢上体脂量および腓腹筋量を評価している。

全体の研究の中での位置づけは不明であるが、当該細胞を培養し、悪液質誘発株である C20 と 10 種のサイトカイン産生能を比較した。しかし、少なくとも培養上清中には両株で差のあるサイトカインはなかった。そもそもこれら細胞株にはたしてサイトカイン産生能があるのか否かという根本的な疑問が委員から上がったが、厳密には mRNA 発現が確認されていないものもあるとの返答であり、参考程度の所見といえる。

以下は、移植マウスでの所見である。末梢血好中球は悪液質グループで多く、腫瘍組織中への好中球浸潤と一致した結果で、好中球の役割が重要であることを明確にした。しかし、全身炎症を表わす血清 IL-6 やその終末産物である血清アミロイド A と悪液質は筋肉内移植以外では相関せず、IL-6 が重要であることが確認された一方、そのみでは説明できないという従来のこのグループの結果に符号した。各種ホルモンについては正常対照マウスに比較すると高値ではあったが皮下移植群でより高値と悪液質を説明できるものはなかった。各種サイトカインでは悪液質と関連があるとされた IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 、GM-CSF は悪液質の程度が重い筋肉内移植で高値を示したが、腹腔・胸腔内移植では有意な所見が得られず、限定的な関与が想定された。

統計計算上、血清 IL-10 が体重、脂肪量、筋肉量の減少に相関するというデータが示されたが、測定値が検量線の検出限界に近いところでの値であり信頼性に問題があることが指摘された。審査後に確認した結果、かろうじて測定域にあるとのことであり、データを活かすこととした。

興味あるデータは脂質代謝の面から得られた。脂肪酸合成の基質となる肝臓内マロニル CoA は悪液質に陥ったマウスで減少していた。悪液質マウスではこのマロニル CoA を生成するアセチル CoA カルボキシラーゼ活性は減少し、減少させる SSAT 活性は増加していた。これら調節因子は炎症性サイトカインの影響を受けるため、結果を見ている可能性があるが、脂肪量減少という悪液質で問題となる表現型に密接に関連した所見として評価できる。これを治療のターゲットとして考えたいという千葉氏の展望も期待できる。委員からは肝臓内でのイベントが末梢の脂肪組織での現象に関係するのか疑問が呈された。申請者本人は今回の実験系では確認していないが、SSAT ノックアウトマウスでの論文を紹介して SSAT の直接的関連に言及した。

今回の C5 移植において、皮下では腫瘍が限局し、腹腔や胸腔では腫瘍が播種性に増殖することから、後者での悪液質の誘発は理解されやすいが、C20 が皮下でも悪液質を誘発する理由が最も知りたいところであるが、発表の後の質疑応答でも、未だその点は不明とのことであった。研究を継続し、この点の解明が待たれる。

全体を通して、今回用いたコロニ 26 と宿主動物の適合性、このモデルでヒト癌悪液質を論ずることの妥当性についてイントロダクションと考察が不十分であること、また、positive data と negative data が入り乱れ、それぞれに対する考察が不十分であるとの意見があり、論文の訂正が求められた。また、分析上の問題でデータ自体の信用性はどうか、取り上げた分子マーカー以外に重要なものの可能性を探るには網羅的な解析が必要ではないか、など研究自体にさらに厚みを加える必要性が指摘された。

以上のように結果的には不明な点は多いものの、癌を移植する部位を変えて、悪液質誘発

における宿主側の因子に着目した点は評価でき、好中球反応が重要であること、マロニル CoA の制御が診断・治療のターゲットとしての可能性を示した結果も評価できる。審査委員一致して学位に値すると判断した。

最終試験の結果の要旨

申請者は、グループで進行している研究に途中参加したとはいえ、膨大な実験を独力でこなした努力は評価できる。審査委員からの厳しい質問、意見にも適切に応えており、求められた論文修正にも適切に対応した。以上より、申請者の学識、および研究能力は学位を授与するに値すると審査委員全員一致して判断した。