

氏名	たか はし こう じ 高 橋 浩 二
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 493 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	薬学 研究科 生命薬科学 専攻
学位論文題目	マウス大腸癌腫瘍モデルを用いたヒスタミンの腫瘍増殖調節作用の研究

論文調査委員 (主査) 教授 市川 厚 教授 川 寄 敏 祐 教授 佐藤 公道

論 文 内 容 の 要 旨

ヒスタミンは産生細胞においてL-ヒスチジン脱炭酸酵素(L-histidine decarboxylase (HDC); EC4.2.1.22)の作用によりL-ヒスチジンから合成され、標的細胞のH1, H2等の受容体と反応し、炎症、アレルギー、胃酸分泌等の生体作用を惹起する生体アミンである。近年、腫瘍組織内に高いレベルのヒスタミンが存在すること、あるいは、臨床において、抗ヒスタミン剤が抗がん剤の効果を増強する例などが数多く報告され、ヒスタミンと腫瘍増殖との関連が注目されている。しかし、ヒスタミンの作用メカニズムはほとんどわかっていない。そこで、著者はマウス大腸癌細胞CT-26株をBalb/cマウスの背部皮内に移植することにより作製した腫瘍の増殖に対するヒスタミン作用を解析し、以下の研究成果を得た。

第一章 CT-26細胞移植マウスの腫瘍増殖に対するヒスタミンの作用

ヒスタミン非産生細胞株のCT-26細胞をマウスに移植すると、腫瘍の容積と重量は経時的に増大するが、それらはH2アンタゴニストのシメチジンにより有意に抑制された。しかし、ヒスタミンあるいはシメチジンは*in vitro*でのCT-26細胞の増殖には無効であった。これらのことからヒスタミンは腫瘍細胞の増殖を促進する作用を有するが、その作用は腫瘍細胞への直接作用ではないことがわかった。腫瘍の増殖は、浸潤免疫細胞の産生するサイトカインの作用により大きな影響を受けることが知られている。そこで、腫瘍組織内のサイトカインのmRNAの発現に対するシメチジンの作用を検討した。その結果、腫瘍増殖の亢進に伴ってTNF- α やIFN- γ といった抗腫瘍性サイトカインの発現は低下するが、シメチジン投与により、その低下は抑制された。また、ヒスタミンの産生能力を欠如するHDC欠損マウスにCT-26細胞を移植し、シメチジンの効果を調べたところ、腫瘍の増殖は抑制されなかった。しかし、HDCを安定発現させたCT-26変異細胞を移植したマウスにおいては、シメチジンの腫瘍増殖抑制効果が観察された。この増殖抑制効果と前述の抗腫瘍性サイトカインの発現抑制とは良い相関を示した。これらの結果から、シメチジンの抗腫瘍効果はH2受容体を介したヒスタミンによる抗腫瘍性サイトカインの発現低下作用の抑制であると考察した。

第二章 IFN- γ 産生におけるヒスタミンの作用についての解析

前章において、抗腫瘍性サイトカインが腫瘍増殖に伴って発現が低下する際、シメチジンはそれらの低下を抑制することが見出された。そこで、ヒスタミンとの関連がこれまで明らかにされていないIFN- γ 産生に対するヒスタミン作用について検討した。まず、担癌マウスの脾臓細胞とCT-26細胞との共培養によるIFN- γ 産生系を樹立し、それを用いてヒスタミン作用を解析した。IFN- γ 産生は、H2アゴニストのdimapritにより用量依存的に低下するが、H1アンタゴニストのpyrilamine及びdiphenhydramine, H3/H4アンタゴニストのthiopramideにより用量依存的に低下した。これらの結果から、共培養の系において、IFN- γ 産生はH1及びH3/H4受容体を介して促進され、H2受容体を介して抑制されることがわかった。

第三章 CT-26細胞移植マウスの腫瘍内におけるヒスタミン産生細胞についての解析

腫瘍組織内における主なヒスタミン産生細胞は明らかではない。そこで、腫瘍組織切片を作成し、HDCの*in situ*hybr-

dization 及び免疫組織化学的検討を行った。その結果、腫瘍組織内において数多く見出される浸潤好中球の集積部位に HDC が強く発現していることを見出した。好中球での HDC の発現はこれまで報告されていない。そこで、ヒスタミン産生細胞を同定するために、マウス腹腔にカゼインを投与し、回収した腹腔細胞から好中球を精製し、その HDC 活性を測定したところ、高い HDC 活性を見出した。しかし、マウスの末梢血中の好中球の HDC 活性は検出レベル以下であった。これらの結果から、マウス腫瘍組織に浸潤する好中球が主要なヒスタミン産生細胞として機能する可能性を示唆した。

以上、著者はマウス大腸癌腫瘍モデルを用いて、腫瘍増殖に対するヒスタミンとシメチジンの作用を解析し、ヒスタミンは浸潤免疫細胞に作用し、抗腫瘍性サイトカインの発現を抑制することで、腫瘍増殖促進作用を示すことを明らかにした。また、IFN- γ 産生においては、H2 を介した抑制作用の他、H1、H3/H4 を介した促進作用が考えられることから、ヒスタミンが IFN- γ 産生を調節する重要な因子となり得ることを示唆した。さらに、腫瘍組織内における主要なヒスタミン産生細胞は好中球である可能性を示唆した。これらの研究成果は腫瘍免疫におけるヒスタミンの作用を明らかにしたものであり、腫瘍増殖を抑制するヒスタミン関連医薬品を開発する上で重要な基礎知見である。

論文審査の結果の要旨

本論文は炎症・アレルギー、胃酸分泌や神経伝達物質などでの作用がよく知られているヒスタミンについて、新たに腫瘍増殖促進作用を有することを明らかにしたものである。

これまでの報告では、ヒスタミンが腫瘍組織に高濃度に存在すること、H2 アンタゴニストのシメチジンを抗癌剤と併用すると腫瘍増殖抑制効果が増強されることなどが知られていたが、ヒスタミンによる腫瘍増殖抑制作用のメカニズムはいまだ明らかにされていなかった。

著者はこのメカニズムの解明を目的として、まず実験に適する腫瘍モデルの探索を試み、マウス大腸癌細胞 CT-26 株を Balb/c マウスの背部皮下に移植することにより形成する腫瘍がシメチジンにより抑制されることを見出し、有効な実験系の樹立に成功した。次いで、このマウス腫瘍モデルを用い、ヒスタミンが作用する標的分子の検索を行った。腫瘍組織内に浸潤する免疫細胞の産生するサイトカインを標的分子と考え、その mRNA の発現を調べたところ、腫瘍増殖の亢進に伴って TNF- α と IFN- γ などの抗腫瘍性サイトカインの発現は低下し、シメチジンの投与によりその低下は抑制された。これらの結果から、著者はシメチジンの抗腫瘍効果は H2 受容体を介したヒスタミンによる抗腫瘍性サイトカインの発現低下作用の抑制であると結論付けた。

ヒスタミンが IFN- γ の産生を制御するという観察は初めての報告である。そこで、著者はこの結果の妥当性を証明するため、担癌マウスの脾臓細胞と CT-26 細胞との共培養による IFN- γ 産生系を樹立し、それを用いて反応に関与するヒスタミン受容体サブタイプの同定を行った。その結果、IFN- γ 産生は H1 および H3/H4 受容体を介して促進され、H2 受容体を介して抑制されることを明らかにした。

腫瘍組織内におけるヒスタミン産生細胞は明らかにされていない。そこで、著者は HDC の *in situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学的検討を行い、その結果、ヒスタミン産生細胞は主に腫瘍組織内に浸潤した好中球であると推論した。さらに、マウス循環血中に存在する好中球はヒスタミンを産生しないが、マウス腹膜炎モデルの腹腔好中球では多量のヒスタミンが顆粒内に貯留されていることを見出した。この発見は、腫瘍組織内に浸潤した好中球が何らかの刺激を受けてヒスタミン産生能を獲得するようになったことを示唆するものであり、炎症巣における好中球由来ヒスタミン作用を制御する新たな方法論を提供するものである。

以上、著者はヒスタミンと腫瘍との関係についてマウス大腸癌モデルを用いて検討し、腫瘍組織内に浸潤した好中球がヒスタミンを産生し、そのヒスタミンが免疫細胞上の H2 受容体を介して IFN- γ などの抗腫瘍性サイトカインの発現・産生を抑制する結果、腫瘍の増殖が促進されるという一連のメカニズムを解明した。これらの研究成果は腫瘍免疫におけるヒスタミンの作用を明らかにしたものであり、腫瘍増殖を抑制するヒスタミン関連医薬品を開発する上で重要な基礎的知見である。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成14年2月20日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。