

氏 名	なか じま あき お郎
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2744 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 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	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Beneficial effect of cepharanthine on overcoming drug-resistance of hepatocellular carcinoma (肝細胞癌の薬剤耐性克服に対するセファランチンの効果に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 乾 賢 一 教 授 千 葉 勉 教 授 田 中 紘 一

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

肝細胞癌患者の外科的切除後の予後は依然不良である。術後再発に対してはTAE, TAI, 持続動注化学療法が施行されるが、これらの障害が抗癌剤に対する耐性である。我々はタマサキツラフジから抽出した植物性アルカロイドであるセファランチンが、薬剤耐性に関与するP糖蛋白(MDR1 遺伝子産物)に伴うドキソルビシン耐性を克服することが報告されていることに注目し、セファランチンが肝細胞癌のドキソルビシン耐性を克服する効果について検討した。また肝細胞癌の手術切除標本を用いて肝細胞癌でのP糖蛋白発現も免疫染色で検討した。

【方法と結果】

1) in vitro 実験

2種のヒト肝細胞癌株PLC/PRF/5とHep3B, および薬剤選択で得られたドキソルビシン耐性株PLC/DORと3B/DORを用い、以下の実験を行った。まずMER1 mRNA 発現とP糖蛋白発現をそれぞれRT-PCRおよびWestern blot で検討し、ドキソルビシン耐性株でのP糖蛋白発現増強を確認した。MTTアッセイによる薬剤感受性試験では、10 μ g/ml以上の濃度でセファランチンは単独で細胞毒性を示した。単独では細胞毒性を示さない2 μ g/ml濃度でドキソルビシンと併用すると、耐性株でのみドキソルビシンの細胞毒性がドキソルビシン単独投与時より有意に増強された。FACS解析では2 μ g/ml濃度のセファランチンがドキソルビシンの細胞外への排出を阻害することにより、細胞内ドキソルビシン濃度を有意に上昇させた。さらにP糖蛋白特異的ATPass活性試験では、セファランチンは濃度依存的に活性を上昇させた。このことは、ドキソルビシンのP糖蛋白への結合に拮抗することでその細胞外への排出を阻害することが示唆すると考えられた。

2) 臨床検体を用いた実験

外科的切除を行った肝細胞癌107症例でのP糖蛋白発現を免疫組織染色で検討した。非腫瘍部のP糖蛋白発現は肝細胞の細胆管側にはほぼ一様に認めたが、腫瘍部での発現は分布、強度ともに腫瘍により様々で、高～中分化型では主に細胆管様構造の腺腔側に発現がある一方、低分化型腫瘍ではしばしば細胞極性を示さない発現を示す腫瘍細胞が認められた。発現強度をNIH imageにて数値化すると、全体として腫瘍部は非腫瘍部より有意に発現が減弱していたが、臨床組織学的背景とP糖蛋白発現強度の間には有意な関係は認めなかった。個々の症例における腫瘍部と非腫瘍部の発現強度を比較すると、36%の症例が腫瘍部で発現が増強していた。さらに術前アントラサイクリン系抗癌剤投与を受けた症例と全く未治療症例の2群を抽出して単変量解析を行うと、分化度、血管浸潤、腫瘍径、血清AFP値、術前アントラサイクリン系薬剤治療がP糖蛋白発現と有意な関係があった。多変量ロジスティック解析では、血清AFP値のみが有意な関係を示し、血清AFP値であることが腫瘍におけるP糖蛋白発現の減弱と関係していた。

【結論】

ドキソルビシン耐性肝細胞癌株に対し、セファランチンとドキソルビシンの併用投与は、P糖蛋白機能を阻害し細胞内ド

キソルピシン濃度を上昇させることで、ドキソルピシン耐性を克服した。また肝細胞癌でのP糖蛋白発現増強は化学療法にしばしば抵抗性を示すと言われる分化型腫瘍に多く見られた。セファランチンを用いたP糖蛋白阻害は、肝細胞癌に対する新たな化学療法となりうること、その臨床的応用のターゲットとしてはP糖蛋白発現増強群が想定されることが示された。

論文審査の結果の要旨

肝細胞癌患者の術後再発治療における障害の一つは化学療法に対する耐性である。今回P糖蛋白阻害作用を持つセファランチン（CEP）のドキソルピシン（DOX）新生克服効果を、肝細胞癌細胞株を用いて検討した。また肝細胞癌症例でのP糖蛋白発現を免疫染色にて検討した。

細胞株実験では、mRNA、蛋白レベルでDOX耐性株でのP糖蛋白発現増強を確認した。薬剤感受性試験では、DOX/CEP併用により耐性株でのみDOXの細胞毒性が増強された。またCEPがDOXの細胞外への排泄を抑制し細胞内DOX濃度を上昇させることも確認された。さらにCEPはP糖蛋白特異的ATPase活性を濃度依存的に刺激した。以上より、CEPはP糖蛋白を阻害し細胞内DOX濃度を上昇させることで、肝細胞癌株のDOX耐性を克服することが示された。

肝細胞癌症例でのP糖蛋白発現検討では、症例により発現程度は多様で、分化型腫瘍の多くに腺腔様部位の内腔に発現を認めたが、低分化型腫瘍では細胞極性を示さない発現を示す症例も認めた。腫瘍部と非腫瘍部との比較では、36%症例で腫瘍部での発現が増強していた。臨床病理学的背景との関係については、血清AFP値のみがP糖蛋白発現と有意な関係があった。

以上の結果から、CEPを用いたP糖蛋白阻害は、肝細胞癌に対する新たな化学療法となりうること、その臨床応用の標的としてP糖蛋白発現増強群が想定されることが示された。

以上の研究は肝細胞癌に対する新たな化学療法の開発に寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成16年2月26日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。