



| | |
|--------------|---|
| Title | グアニジン誘導体による癌細胞の浸潤抑制 |
| Author(s) | 小川, 晴幾 |
| Citation | 大阪大学, 1998, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.11501/3144143 |
| rights | |
| Note | |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 お 小 川 はる 晴 き

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 3 5 0 4 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 10 年 1 月 7 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 名 グアニジン誘導体による癌細胞の浸潤抑制

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 村 田 雄 二

(副査)
教 授 高 井 義 美 教 授 青 笹 克 之

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

癌の進展に関わるのはただ単に細胞の増殖だけではなく、癌浸潤、癌転移は治療に対する1つの大きな障害となっている。したがって浸潤の予防と抑制は癌治療の新しい指針となってきた。浸潤の機序を解明し、その抑制剤を検索するため、in vitro で浸潤能を測定できるモデルを開発した。このモデルではラットの中皮細胞を単層培養し、その上にラットの腹水肝癌を重層培養して浸潤能を測定するが、培養液には10%の胎仔血清 (FCS) が加えられている。血清を除くと浸潤は認められないが、再度血清を加えるとすぐに浸潤が開始される。血清に含まれている多種の生物活性物質が細胞表面にある受容体に結合すると初期の変化として細胞のイオン輸送の変化が観察され、この変化を抑制すると生物活性も抑制されることが報告されている。本論文では浸潤における細胞内情報伝達を知り、新しい抗浸潤薬を探索するためにラット腹水肝癌 (AH 細胞) の細胞内 pH (pHi) および細胞内カルシウムイオン ($[Ca^{2+}]_i$) に対する血清の効果を調べた。また癌の浸潤に対するアミロライドとその構造類似体の効果を調べた。

[方法ならびに成績]

ラット腹水肝癌 AH130 (AH 細胞) は Eagle's minimum essential medium に10% FCS を加えた培養液にて培養した。低浸潤株 W1 は AH 細胞から限界希釈法により分離された。高浸潤株 MM1 は AH 細胞から軟寒天法にて分離された。

W1 または MM1 の pHi は細胞内に取り込ませた BCECF の蛍光強度で、また $[Ca^{2+}]_i$ は細胞内に取り込ませた fura-2 の蛍光強度で計測した。

浸潤能の測定はラットの腸間膜より採取した中皮細胞を単層培養し (M 細胞層)、その上に W1 または MM1 細胞を蒔いて培養し、M 細胞層下に侵入した細胞とコロニー数を位相差顕微鏡を用いて数えて浸潤能とした。

HEPES-glucose 液 (pH 7.4) に浮遊した MM1 と W1 の pHi はともに7.40であったが、FCS を MM1 に加えると、5分間で0.12上昇した。しかし W1 ではこの効果は MM1 の4分の1程度であった。アミロライドを FCS とともに加えると MM1 の pHi の上昇は認められなかった。また FCS 添加後7分でアミロライドを加えた場合は MM1 のその後

のpHiの上昇は完全に抑制された。

[Ca²⁺]_iはpHiに反応して変化することが知られている。FCSの添加によるMM1の[Ca²⁺]_iの変化を測定したが、変化の度合いが小さいため、in vitro 浸潤の誘発においてFCSと同程度以上の効果を持つリゾフォスファチジン酸(LPA)を添加し[Ca²⁺]_iの変化を追跡した。LPA投与後48秒で鋭い上昇があり、その後ゆっくりとした下降が認められた([Ca²⁺]_i spike)。この現象はW1では認められなかった。グアネチデンはこの[Ca²⁺]_i spikeを濃度依存性に抑制した(IC₅₀=1 mM)。

浸潤に対するグアニジン誘導体であるアミロライド、グアネチデン、トリウムテレンの効果を検討した。3薬剤ともMM1のM細胞層への浸潤を濃度依存性に抑制した。アミロライドは浸潤測定時間(20時間)内で増殖を抑制しなかった。しかしさらに72時間まで調べると増殖抑制を示した。このことより浸潤における細胞内情報伝達経路は細胞増殖の経路と部分的に同一であることが推察された。

[総括]

グアニジウム基をもつアミロライド、グアネチデン、トリウムテレンの3薬剤についてラット腹水肝癌(AH細胞)の浸潤抑制作用を調べた。浸潤能の測定はラットの初代培養中皮細胞層上にAH細胞を重層培養し、AH細胞が中皮細胞層下に進入して形成されるコロニー数を測定する浸潤モデル系を使用した。これら3薬剤は濃度依存性に浸潤抑制効果を示した。この系では血清無しでは浸潤は認められない。血清をAH細胞の高浸潤株MM1に添加することにより、細胞内pH(pHi)の上昇、遊離カルシウムイオンの一過性の上昇([Ca²⁺]_i spike)がみられるが、低浸潤株W1ではこれらイオン変化はほとんど認められなかった。アミロライドは血清によるMM1のpHiの上昇を濃度依存的に抑制した。またグアネチデンは[Ca²⁺]_i spikeを濃度依存的に抑制した。この浸潤系において血清は癌浸潤を誘導するが、この作用はNa⁺-H⁺交換やカルシウムイオン交換に関わる細胞内情報伝達を賦活することにより、また、グアニジウム基をもつアミロライド、グアネチデン、トリウムテレンの3薬剤はこの作用を抑えることにより、浸潤を抑制すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は癌浸潤の機序を解明し、その抑制剤を検索するため、in vitroで浸潤能を測定できるモデルを用いて癌細胞内のpH及び遊離カルシウムイオン濃度の変化を解析した。このモデルはラットの中皮細胞を単層培養し、その上にラットの腹水肝癌(AH細胞)を重層培養して浸潤能を測定するが、培養液中に血清あるいはリゾフォスファチジン酸などの添加が必要とされる。これらをAH細胞の高浸潤株に添加すると、細胞内pHの上昇、遊離カルシウムイオン濃度の一過性の上昇が認められるが、低浸潤株ではこれらイオン濃度変化はほとんど認められない。またこれらのイオン濃度変化を濃度依存性に抑制するグアニジン誘導体であるアミロライド、グアネチデン、トリウムテレンの3薬剤が同時に浸潤を抑制することから、浸潤に伴って細胞内pHや遊離カルシウム、イオン濃度の一過性変化が誘起されることが示唆された。

上記の研究結果は培養液に含まれている血清による癌浸潤の誘導が、水素イオン交換やカルシウムイオン交換に関わる細胞内情報伝達を賦活することにより起こること、またこれを抑制する薬剤を検索することにより新たな抗癌剤を発見する可能性を見出したということで非常に価値ある業績であり、学位に値するものと考えられる。