



Title	PyNPase expression in human colon cancer
Author(s)	八幡, 暁直
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41715">https://hdl.handle.net/11094/41715</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	八幡 暁直
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 2 5 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 11 年 2 月 5 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科 外科系専攻
学 位 論 文 名	PyNPase expression in human colon cancer (ヒト大腸癌における PyNPase 発現)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 谷 口 直 之 教 授 野 口 眞 三 郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】 我々は、大腸癌に対して OK432 をヒト fibrinogen と混合して腫瘍内に局所注入することで腫瘍の退縮効果を得られることを見いだした。この局所免疫療法を行ったときの特徴的な組織所見として著明な血管新生と各種炎症細胞の浸潤が認められる。血管新生因子の中で、Platelet derived endothelial cell growth factor (以下 PyNPase) は、大腸癌を初めとする多くの癌組織で正常組織より発現が高いことが報告されている。しかしながら、癌の種類によってその主な産生細胞が異なることが知られており、大腸癌組織における PyNPase 産生細胞についてはまだ統一した見解は出ていない。本研究は、大腸癌組織内での PyNPase 発現細胞を明らかにするとともに、局所免疫療法における血管新生における PyNPase の影響について解析することを目的とした。

【方 法】 大阪大学医学部付属病院第 2 外科で切除手術を受けた 69 症例の術前生検及び切除大腸癌組織を用いた。38 症例については免疫賦活剤として臨床応用されている溶連菌製剤の OK432 をヒト fibrinogen とともに術前生検施行直後に内視鏡下に腫瘍内へ局注した症例の検体を用いた。

標本の一部を中性緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋組織として日本 Roche 株式会社より供与された抗ヒト PyNPase マウス monoclonal 抗体 654-1 を用いた免疫染色に使用し、単位面積当たりの PyNPase 陽性細胞数や染色レベルを検討した。平行して凍結切片を作成し、実体顕微鏡下に細い注射針を用いて組織を癌細胞分画と間質細胞分画に分けて切り出し (microdissection 手技)、それぞれより蛋白抽出を行った。各分画の PyNPase 発現レベルを Western blotting 法にて解析し、得られた結果を densitometry で半定量した。切り分けた分画成分は同時に抗 keratin 抗体での Western blotting で間質分画への上皮成分の混入の有無を検討した。

【成 績】 OK432 術前局注症例群と非局注症例群間に、患者年齢、性差および病期に有意差は無かった。免疫染色の結果、大腸癌組織内で間質に PyNPase 陽性細胞が多く、OK432 局注症例では非局注例に比較して単位面積当たりの PyNPase 陽性細胞数が多かった。さらにそれら陽性細胞の染色レベルが高い傾向が認められた。抗 keratin 抗体を用

いた Western blotting 法による解析の結果により、間質分画への上皮成分の混入は僅かで癌上皮細胞成分と間質細胞成分の切り分け手技の sensitivity は確認された。

抗 PyNPase 抗体を用いた Western blotting 法で癌上皮細胞と間質細胞の各分画の PyNPase 量を調べた。得られた結果を densitometry を用いて半定量すると、OK432 局注症例・非局注症例でともに術前の生検時から間質成分の PyNPase 活性が ( $31.5 \pm 9.5$ ,  $30.0 \pm 9.3$ ) が癌上皮成分 ( $12.0 \pm 9.5$ ,  $11.8 \pm 8.6$ ) に比し有意に高かった。また術前生検組織と手術標本との比較では、癌上皮成分の発現レベルは非局注症例で  $11.8 \pm 8.6$  から  $12.5 \pm 8.9$  と変化無く、局注症例でも  $12.0 \pm 9.5$  から  $12.4 \pm 9.8$  と変化は認めなかった。一方間質成分の PyNPase 発現レベルは非局注症例で  $30.0 \pm 9.3$  から  $31.5 \pm 10.2$  と変化が無かったのに対し、OK432 局注症例では  $31.5 \pm 9.3$  から  $58.9 \pm 19.8$  へと著明に上昇した。

**【総括】** 大腸癌組織の PyNPase 発現は間質細胞がその主たる役割を担っており、その発現は OK432 の腫瘍内局注による免疫刺激により増強した。

局所免疫療法により、Macrophage を初めとする間質細胞が免疫刺激を受け PyNPase の産生を増強する。これが局所免疫療法を行った際に誘導される著明な血管新生に関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、大腸癌組織内での PyNPase 発現細胞を明らかにするとともに、局所免疫療法を行ったときの特徴的な組織所見である著明な血管新生に対する PyNPase の影響について解析することを目的としたものである。

免疫染色、および癌組織を癌細胞分画と間質細胞分画に分ける microdissection 手技を応用した Western blotting 法による解析の結果、大腸癌組織の PyNPase 発現に間質細胞がその主たる役割を担っていること、さらにその発現は OK432 の腫瘍内局注による免疫刺激により増強することが明らかとなった。

本研究は、癌組織における血管新生への間質細胞の関与について重要な示唆を与えており、さらに免疫刺激により著明な血管新生が誘導される機序の解明に大きく寄与するものであり、学位に値するものとする。