

Title	Role of the Fas/FasL pathway in combination therapy with interferon- $\alpha$ and fluorouracil against hepatocellular carcinoma in vitro
Author(s)	中村, 将人
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47477">https://hdl.handle.net/11094/47477</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。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏 名	中 村 将 人
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 4 2 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 3 月 23 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	Role of the Fas/FasL pathway in combination therapy with interferon- $\alpha$ and fluorouracil against hepatocellular carcinoma in vitro (肝細胞癌に対する IFN- $\alpha$ /5-FU 併用化学療法における Fas/FasL 系の <i>in vitro</i> における役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人  (副査) 教 授 林 紀 夫 教 授 青 笹 克 之

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [ 目 的 ]

門脈内腫瘍栓を伴う高度進行肝細胞癌の予後はきわめて不良である。われわれはこのような高度進行肝細胞癌に対するインターフェロン- $\alpha$  (IFN) の皮下注射と 5-FU の肝動脈内投与の併用療法の有用性に関して、その劇的な奏効率と予後延長効果について報告してきた。また、本療法の肝細胞癌に対する抗腫瘍効果の機序についても研究をおこない、現在までに細胞周期遅延効果、アポトーシス誘導効果、TRAIL/TRAIL-R を介した腫瘍免疫賦活効果などの関与について報告してきた。本研究においては、これらの成果に加えて T 細胞、NK 細胞を介した免疫系のひとつである Fas/FasL 系と抗腫瘍効果の関係について検討した。

#### [ 方 法 ]

##### 1) 肝癌細胞株における Fas 受容体の発現および感受性

肝細胞癌株 6 種 (HuH7、PLC/PRF/5、HLE、HLF and HepG2) に対して Flowcytometry を用いて各々の肝癌細胞株表面の Fas 受容体を測定し、agonistic な抗 Fas 抗体である CH-11 添加後 48 時間の細胞数の変化と IFN/5-FU による影響について、MTT assay をもちいて検討した。

##### 2) IFN/5-FU によるアポトーシス誘導増強作用の機序

IFN/5-FU による Fas 受容体の変化を測定した。さらに、肝細胞癌株を CH-11 および IFN/5-FU にて併用刺激し、12 時間後の各種カスパーゼ活性を caspase assay にて検討した。

##### 3) IFN/5-FU の末梢血単核球の免疫能に及ぼす作用

末梢血単核球を IFN/5-FU で 24 時間刺激し肝癌細胞株に対する細胞障害活性の変化を  $^{51}\text{Cr}$  放出試験で解析し、Fas/FasL 系の関与を検討した。

##### 4) 正常肝組織に対する Fas/FasL を介した IFN/5-FU の細胞障害活性の検討

IFN/5-FU 治療の正常肝組織に対する安全性について確認するため、非腫瘍性肝細胞株 THLE-2 を用いて CH-11 および IFN/5-FU による細胞障害活性の増強効果を検討した。

#### [ 成 績 ]

##### 1) 肝癌細胞株における Fas 受容体の発現および感受性

HLE、HLF、HepG2の3株において細胞表面にFas受容体が発現しており、これら3株については、CH-11による濃度依存性の細胞数増殖比の減少を認めた。CH-11とIFN/5-FUの併用についての検討では、CH-11単剤では26.7%、IFN/5-FUでは18.0%の細胞数増殖比の減少を認めたのに対し、両者の併用では83.8%とその影響は相乗的であった(HepG2)。さらにこの減少は、annexin V assayによりアポトーシスであることが確認された。

#### 2) IFN/5-FUによるアポトーシス誘導増強の機序

IFN/5-FUによる肝癌細胞株上のFas受容体の発現については、抗腫瘍効果の増減と相関はなかった。Caspase assay (HepG2)では、CH-11単剤では平常状態と比較し2.2倍、IFN/5-FUでは3.1倍のカスパーゼ-3活性を示したのに対し、CH-11とIFN/5-FUの併用では19.9倍に急増し、この活性上昇がアポトーシス誘導作用の増強につながったと考えられた。カスパーゼ8にても同様の結果が認められた。さらに、カスパーゼインヒビターを用いたMTT assayでは、CH-11とIFN/5-FUによるアポトーシス誘導作用は阻害された。

#### 3) IFN/5-FUの末梢単核球の免疫能に及ぼす作用

IFNで前刺激を受けた末梢血有核細胞は肝細胞癌株に対し21.0%の細胞障害活性を示し、これは平常状態(3.3%)と比較し有意に増強していた。特にNK細胞および単球だけをIFNで前刺激したところ、IFN/5-FUで前刺激を加えられたFas感受性肝癌細胞株(HepG2)に対し41.5%とさらに高い細胞障害活性を示した。これらの効果は中和作用をもつ抗Fas抗体ZB4によって阻害され、Fas/FasL系の関与が示唆された。

#### 4) 正常肝組織に対するFas/FasLを介したIFN/5-FUの細胞障害活性の検討

THLE-2は、CH-11によって11.6%の細胞数増殖比の低下を示したが、IFN/5-FUを併用しても効果の増強は認めなかった。このことより、IFN/5-FUがFas/FasL系を介して、正常肝組織に対して与える影響は少ないと考えられた。

### [ 総 括 ]

肝細胞癌に対するIFN/5-FU併用療法の抗腫瘍効果増強の機序の一つとしてFas/FasLを介したアポトーシス誘導経路の活性化の関与について確認した。IFN/5-FU併用療法は、このような免疫賦活作用をも有し、その他の抗腫瘍効果と併せて進行肝細胞癌に対して劇的な治療効果を示すと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

近年、進行肝細胞癌に対するinterferon (IFN)- $\alpha$ の皮下投与と5-FUの肝動注化学療法(以下IFN併用化学療法)の有効性に関する報告が散見されるが、その作用機序はいまだ明らかではない。本研究においては、IFN併用化学療法の抗腫瘍効果におけるFas/FasL系を介した腫瘍免疫賦活作用の関与について、*in vitro*での検討をおこなった。

まず、肝癌細胞株におけるFasの発現および感受性の検討においては、HLE、HLF、HepG2の3株において細胞表面にFasが発現しており、これらはagonisticな抗Fas抗体であるCH-11によって、濃度依存性に増殖抑制効果を認めた。CH-11とIFN/5-FUの併用効果の検討では、両者の併用において相乗的な効果の増強を認め、annexin V assayによりアポトーシスであることが確認された。IFN/5-FUによるアポトーシス誘導増強の機序については、IFN/5-FUによる肝癌細胞株上のFasの発現は抗腫瘍効果の増減と相関はなかったが、CH-11とIFN/5-FUの併用でカスパーゼ活性の上昇をみとめた。カスパーゼインヒビターを用いたMTT assayで、CH-11とIFN/5-FUの併用によるアポトーシス誘導作用は阻害されたため、カスパーゼ活性とアポトーシス誘導作用の増強との関係が示された。IFN/5-FUの末梢単核球の免疫能に及ぼす作用に関しては、IFNで前刺激を受けた末梢血有核細胞の肝細胞癌株に対する細胞障害活性は有意に増強し、特にNK細胞だけをIFNで前刺激したところ、さらに高い細胞障害活性を示した。これらの効果は抗Fas抗体ZB4によって阻害され、Fas/FasL系の関与が示唆された。

以上より、本研究において、Fas/FasLを介した腫瘍免疫賦活作用にもとづくアポトーシス誘導経路の活性化が、肝細胞癌に対するIFN/5-FU併用療法の抗腫瘍効果増強の機序の一つとして関与していることが、明らかになった。

このことは、進行肝細胞癌の予後改善と新規治療の開発に寄与することをしめすものであり、学位に値する業績であると考えられる。