The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Combination therapy of interferon-alpha and 5-fluorouracil inhibits tumor angiogenesis in human hepatocellular carcinoma cells by regulating vascular endothelial growth factor and angiopoietins
Author(s)	和田, 浩志
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48927
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【５】

氏　　名	和　田　浩　志（わだ　ひろし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２１４６１　号
学位授与年月日	平成 19 年４月 23 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学　位　論　文　名	Combination therapy of interferon-alpha and 5-fluorouracil inhibits tumor angiogenesis in human hepatocellular carcinoma cells by regulating vascular endothelial growth factor and angiopoietins. （肝細胞癌に対するインターフェロン-α、5-フルオロウラシル併用化学療法は、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）とアンジオポエチンの発現を調節することにより腫瘍血管新生を阻害する）
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　〕

門脈内腫瘍栓を伴った肝細胞癌の予後はきわめて不良であり、有効な治療法は確立されていない。われわれは、このような高度進行肝細胞癌に対して、インターフェロン（IFN)-αの皮下注射による全身投与と 5-フルオロウラシル（5-FU）の肝動注化学療法の併用（IFN/5-FU）により、良好な奏効率とその予後延長効果について報告してきた。この IFN/5-FU の作用機序解明を解明することにより、さらなる肝細胞癌の予後向上と新たな治療体系を構築することが可能になると考え、ヒト肝細胞癌株のヌードマウス皮下腫瘍モデルを作成し、IFN/5-FU の抗腫瘍効果を検証するとともに、肝細胞癌の特徴の一つである hypervascularity に注目し、腫瘍の発育・進展および転移の過程に不可欠な血管新生に対する IFN/5-FU の抑制効果と血管新生因子の発現調節について検討した。

〔　方　　法　〕

１）ヒト肝細胞癌株のヌードマウス皮下腫瘍モデルの作成

ヒト肝細胞癌株（HuH7）を用いて、4-6 週齢のヌードマウス（BAL B/c nu/nu）の皮下に腫瘍細胞（$5x10^6$ cell/body）を接種し、腫瘍径が 5-7 mm に増大した時点（接種後 10 日目）で、各群８匹ずつを４群に分けて、治療を開始した。a）IFN-α単独群；IFN-α（20,000 units/body）週３回皮下投与、b）5-FU 単独群；5-FU（30 mg/kg）週３回腹腔内投与、c）IFN/5-FU 併用群；IFN-α、5-FU を共に週３回投与、d）対照群；PBS のみ週３回投与とし、４週間治療を行った。週に２回、腫瘍径を測定し、長径×(短径)^2×0.5 にて腫瘍体積を算出し、腫瘍増殖を比較した。

２）in vivo における抗腫瘍効果の評価

IFN/5-FU による抗腫瘍効果が細胞増殖の抑制、アポトーシスの誘導に関与しているかについて、皮下腫瘍における細胞増殖を PCNA 免疫組織染色法、アポトーシスを TUNEL 法にて検出し、４群間で比較検討した。

３）腫瘍血管密度による血管新生抑制効果の評価

腫瘍細胞における血管新生効果は、CD34 免疫組織染色にて腫瘍内のマウス血管内皮細胞を染色し、腫瘍内の血管数を Count し、腫瘍血管密度（MVD）を算出、各群間で比較検討した。

４）IFN/5-FU による血管新生因子発現調節

肝細胞癌の血管新生に深く関与する VEGF、アンジオポエチン（Ang)-1、-2 の発現を免疫組織染色および定量的 RT-PCR にて蛋白レベル、mRNA レベルで比較検討した。

〔 成　　績 〕

１）治療開始 27 日後の腫瘍体積（cm^3）は、対照群；3.8±1.2、IFN-α単独群；2.6±1.3、5-FU 単独群；2.5±1.2、IFN/5-FU 併用群；1.4±0.4 であり、併用群において有意に腫瘍体積の縮小が認められた（$p<0.05$）。また、IFN-α単独、5-FU 単独群では、対照群と比較して腫瘍体積の縮小を認めたが有意な差ではなかった。

２）PCNA 陽性細胞の割合（%）は、対照群；81.6±6.7、IFN-α単独群；72.5±5.9、5-FU 単独群；70.8±4.8、IFN/5-FU 併用群；55.4±3.8 であり、併用群で他の３群と比較して有意な増殖抑制効果（$p<0.01$）を認めた。TUNEL 陽性細胞数は、コントロール群；12.4±6.2、IFN-α単独群；19.1±3.0、5-FU 単独群；19.2±3.5、IFN/5-FU 併用群；33.7±4.5 であり、IFN-α単独、5-FU 単独群では、対照群に比べてアポトーシスの増加を認めた（$p<0.05$）。また、併用群で他の３群と比較して有意なアポトーシスの誘導を認めた（$p<0.01$）。

３）腫瘍内血管数（MVD）は、対照群；29.6±2.9、IFN-α単独群；18.1±2.9、5-FU 単独群；22.0±3.8、IFN/5-FU 併用群；10.3±2.1 であり、併用群で有意な血管数の減少を認めた（$p<0.01$）。

４）免疫組織染色にて IFN/5-FU 併用治療後の腫瘍細胞における VEGF、Ang-2 の発現低下と Ang-1 の発現上昇を認めた。定量的 RT-PCR では、Ang-2/Ang-1 mRNA 比は、対照群；1.08±0.37、IFN-α単独群；1.15±0.24、5-FU 単独群；0.83±0.34、IFN/5-FU 併用群；0.57±0.24 であり、併用群で対照群、IFN-α単独群と比較して有意に Ang-2/Ang-1 mRNA 比の低下を認めた（$p<0.05$）。

〔 総　　括 〕

IFN-α/5-FU 併用療法の作用機序として、増殖抑制、アポトーシスの誘導、血管新生抑制のいずれもが関与しており、特に血管新生抑制については VEGF、アンジオポエチンの発現調節が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

門脈内腫瘍栓を伴った高度進行肝細胞癌の予後は極めて不良である。この高度進行肝細胞癌に対してインターフェロン-α併用 5-フルオロウラシル肝動注化学療法（IFN/5-FU）の臨床効果が期待されているが、その作用機序は十分には解明されていない。そこで、本研究では、IFN/5-FU 併用療法による抗腫瘍効果を *in vivo* にて検証するモデルを確立し、IFN/5-FU の抗腫瘍効果を検証するとともに、肝細胞癌の特徴の一つである hypervascularity に注目し、IFN/5-FU の血管新生抑制効果と血管新生因子の発現調節について検討した。

IFN/5-FU 併用療法の抗腫瘍効果を *in vivo* にて検証した結果、細胞増殖抑制、アポトーシスの誘導、血管新生抑制のいずれも関与していることがわかった。また、IFN/5-FU 併用療法の血管新生抑制効果については、血管内皮細胞に対する直接作用と腫瘍細胞からの血管内皮細胞増殖因子（VEGF）、アンジオポエチン（Ang)-1、Ang-2 の発現調節が関与していることがわかった。これらの結果は、IFN/5-FU 併用療法の作用機序を解明し、肝細胞癌に対する新たなる治療体系の構築につながるものであり、学位の授与に値すると考えられる。