

平成22年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790973
 研究課題名 (和文) ジエチルニトロソアミン誘発ラット肝発癌モデルにおける T-614 の効果
 研究課題名 (英文) Inhibitory effects of an anti-rheumatic agent T-614 on experimental
 hepatocellular carcinoma models

研究代表者
 坂本 太郎 (SAKAMOTO TARO)
 東京慈恵会医科大学・医学部・助教
 研究者番号：60366234

研究成果の概要 (和文)：ラット肝細胞癌モデルに、IL-8 抑制作用を有する抗リウマチ薬：T-614 を投与したところ、血中 IL-8 濃度、腫瘍径および腫瘍数が有意に抑制された。さらに摘出肝を血管上皮マーカーの CD31 で染色したところ、有意に CD31 陽性面積の減少を認めた。これにより、生体内でも IL-8 抑制による抗血管新生療法が期待できると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：Anti-rheumatic agent T-614 significantly suppressed serum concentration of interleukin-8(IL-8), tumor size, and the number of tumors in the rat hepatocellular carcinoma(HCC) models. In addition, immunohistochemical staining of the rat liver (both normal hepatocytes and HCC cells) using anti-CD31 revealed significant decrease in CD 31 positive cells. Since IL-8 plays an important role in angiogenesis through CD31 molecule, these results suggest that T-614 may contribute as an anti-angiogenic therapy in HCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：T-614, 血管新生, 肝細胞癌, 治療

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は多血性の腫瘍であり、その発癌及び増殖には血管新生が大きく関与するこ

とが知られている。我々の施設では既に基礎的にDiethylnitrosamine (DEN)ラット肝発癌モデルを用いて、血管鋳型標本の作製、血

管新生阻害剤の効果、血管新生関連因子の免疫組織学的発現、血管新生関連サイトカインを測定し、臨床的には肝細胞癌切除標本を用いて血管新生関連Matrix metalloproteinase (MMP)の発現及び血管新生関連サイトカインを測定し、抗血管新生抑制療法が肝細胞癌に対する新しい治療戦略として期待されることを報告してきた。

一般に抗血管新生療法は、その複雑な血管新生の機序から、単剤ではその効果が不十分と考えられる。大腸固形癌に対して国内外で適応となった抗 VEGF 薬においても、単独での効果は無く、抗癌剤との併用が条件となっている。そこでさらなる進展 (Combination anti-angiogenic treatment) を目指し、今回は抗リウマチ薬として開発された T-614 に焦点を当てた。本薬剤は炎症性サイトカイン (IL-1, 6, 8 および TNF α) の産生抑制効果を有し、NF- κ B を抑制することが報告されている。慢性肝炎、肝硬変と炎症を繰り返して発癌する肝細胞癌の特徴から見れば、IL-8 という血管新生関連因子を抑制すると共に、NF- κ B の抑制で抗炎症作用を期待することが出来、発癌の抑制あるいは癌の進展を抑制できる可能性が示唆される。

2. 研究の目的

今回の研究目的は、再生・壊死を繰り返し発癌する点でヒトの肝細胞癌の発癌過程に類似している DEN ラット肝発癌モデルにおける T-614 の発癌および増殖に対する効果を検討することにある。重要なポイントとなるのは、DEN ラット肝発癌モデルにおける発癌過程の各段階で T-614 の投与時期をいくつか設定することにより、抗サイトカイン・抗血管新生療法としての T-614 の至適投与時期を確立することである。

現時点で臨床における肝細胞癌に対する治療は、主に外科的肝切除、局所凝固療法および肝動脈塞栓化学療法術である。一般に肝

細胞癌に対しては化学療法の奏功率は低い。そこで肝細胞癌が多血性であることに着目し、抗血管療法が良好な抗腫瘍効果を有するとの仮説をたて、今回の研究を計画した。T-614 は抗リウマチ薬として新薬承認申請中の薬剤であり、臨床比較試験においても重大な副作用は認めていない。今回の実験により肝細胞癌の発癌・増殖抑制効果が確認できれば、肝細胞癌に対する抗サイトカイン療法・抗血管新生療法という理論に沿った新しい治療法を開拓できると期待され、非常に臨床的価値が高い。

3. 研究の方法

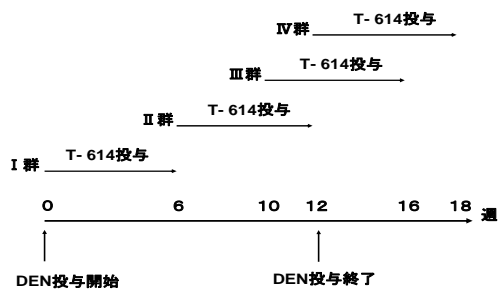
1) DEN 誘発ラット肝発癌モデルを作製する。

Fisher 系 5 週齢雄性ラットを使用する。ラットに発癌性物質 DEN 100ppm を 12 週自由飲水させた肝細胞癌モデルを使用する。このモデルは我々の施設で過去に用いたモデルであり、また世界的にも頻回に用いられている信頼性の高いものである。100ppm の自由飲水により、4~6 週目頃より肝の腺維化が目立つようになり、8 週になると灰白色結節を認め、10 週で高分化型 HCC が発生し、12 週では肝全体に多発する。そして 18 週までに、肝の占拠率が高くなるとともに、中分化から低分化 HCC の割合が高くなる。

2) T-614 投与群での発癌・増殖抑制効果を分子生物・免疫組織学的に検討する。

T-614 を経口投与するが、投与時期は DEN 投与開始時・投与 6 週後 (両群を発癌抑制群とする)、投与 10 週後・投与終了時 (両群を癌増殖抑制群とする) から 6 週間投与とする。各群はそれぞれ n=5 とし、各々に対照群 n=5 を設定する。T-614 はその溶解安定性が実証されているメチルセルロース液に溶解する。5mg/kg/day の投与量を週に 5 日間、カニューレを用いて胃内投与し、各々のコントロール群には同量のメチルセルロース液を投与す

る。



I、II群は12週で、III群は16週で、IV群は18週で解剖とする。動物解剖時にはネブタール、吸入麻酔薬による十分な無痛処置を施し、動物への苦痛を最小限にする。解剖時に採血を行い、同時に脱血死とする。速やかに肝臓を摘出し、肉眼的所見を確認した後、病理学的検討のため保存する。一部の検体については赤・青の着色樹脂を肝動脈、門脈より注入・固定処理を行い、肝実質を水酸化ナトリウム溶液で溶解処理して血管鑄型標本を作製する。

・評価項目

ラット肝の肉眼的所見：最大結節径、結節数
病理学的検討：CD31の免疫染色（血管新生への影響）、p65の免疫染色（NF- κ Bの活性を検討）

血管鑄型標本：ミクロでの血管構造の検討

血清サイトカイン：IL-1 β , 6, 8およびTNF- α

腫瘍マーカー：AFPの測定

血清生化学：ALT, ALP, T-Bilの測定

体重測定：全身状態の評価

4. 研究成果

ラットに発癌性物質DEN 100ppmを12週自由飲水させた肝細胞癌モデルを作成し、抗リウマチ薬であるT-614の投与時期により4群に分けて、計画通りに解剖した。摘出肝の肉眼的評価では、発癌抑制群（I・II群）・治療群（III・IV群）共に、腫瘍性結節の最大径・結節数が対照群に比べてT-614投与によって有意に抑制されていた。この結果により、

T-614が何らかの抗癌作用を有することが証明された。解剖時に血液を採取し、各サイトカインの測定を行った。われわれが注目した血管新生関連サイトカインであるIL-8は、ラット生体内でT-614投与により有意に抑制されていた。さらに摘出肝を血管上皮のマーカーであるCD31で染色した。CD31陽性面積を画像解析したところ、II群・III群において、T-614投与群では有意にCD31陽性面積の減少を認めた。これにより、生体内でもIL-8抑制による抗血管新生療法が期待できると考えられた。

もう一つの大きな評価項目として、T-614投与によるラット肝臓内のNF- κ Bの活性について検討を行った。NF- κ Bの構成蛋白であるp65の免疫染色を摘出肝に対して行ったが、染色性が不十分であり、評価対象としては不確実なものと考えられた。本実験系は、T-614が持つIL-8抑制効果による抗血管新生療法という観点と、NF- κ B抑制による抗サイトカイン療法の相乗効果を狙ったものであるため、NF- κ Bに関する検討が不可欠と考えた。そこでNF- κ Bの定量化を行い、再評価することを目標とした。解剖時に凍結保存していたラット摘出肝臓から核蛋白を抽出し、NF- κ BをELISA kitを用いて定量化した。しかしながら、定量結果には個体によるばらつきが激しく、また数値化できない個体も見られた。これは解剖時に肝を摘出してから凍結するまでの時間にばらつきがあったことや、凍結するまでの時間経過が長かったことが原因として考えられた。結局NF- κ Bの抑制効果に関しては検討に値するデータが得られず、今回の実験では結果を出すことが出来なかった。しかしながら、当初目的としていた、血管新生関連サイトカインであるIL-8と肝細胞癌の関係については十分な評価が出来たと考えられ、肝細胞癌に対する抗血管

新生療法としての可能性が示された。今後 T-614 と HCC の関係について更なる研究を進めると共に、現在までの結果に関して論文を作成中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 太郎 (SAKAMOTO TARO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60366234