

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：11101  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2009～2012  
 課題番号：21591718  
 研究課題名(和文) 大腸癌の浸潤および転移とヒアルロン酸との関連性～大腸癌の再発ゼロを目指して～  
 研究課題名(英文) Association with permeation and metastasis of colon cancer and the hyaluronic acid ~For recurrent zero of colon cancer~  
 研究代表者  
 村田 暁彦(MURATA AKIHIKO)  
 弘前大学・医学部附属病院・准教授  
 研究者番号：10344607

研究成果の概要(和文)：4-methylesculetin(ME)の効果を確認と可視下により、データの集積が行われた。癌細胞のヒアルロン酸産生を低下させる事により、更にはその細胞接着能および遊走能を相対的に低下させていることが判明した。また間接的にその大腸癌細胞レベルでの毒性が確認された。MEの細胞外マトリックスへの影響も、少なからず認められることが推測されたため、その程度や濃度との関係など、細胞活性などを観察することや、接着性を可視化するため顕微鏡でのデジタル化を行った。

研究成果の概要(英文)：The accumulation of data was carried out by an effect of ME by confirmation and a visible bottom. Besides, it was recognized that we relatively reduced the cell adhesion ability and migration ability by reducing the hyaluronic acid production of the cancer cell. Also, the toxicity at the colon cancer cells level was confirmed indirectly.

Because that the effect on extracellular matrix of ME was not a little found was inferred, we performed the digitization with the microscope to visualize a thing and adhesive property to observe the cells activity including relations with the degree and level.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医科学・消化器外科学

キーワード：ヒアルロン酸、大腸癌

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 増加する大腸癌：日本における大腸癌の頻度は増加傾向にあるため、その癌を対象にすることが、今後の癌治療に於いての研究成果の効果が最も臨床的に重要にな

るものとなり、実際に恩恵をうける患者さんが多いのではという発想である。

(2) 化学療法の奏功性：大腸癌に対する化学療法は、近年有効性の高い薬剤が開発さ

れ、様々な角度からその浸潤性や転移機構についての研究がされてきているため、応用できる機材、薬剤は十分に活用可能と思われたため。

(3) 有効な治療法が開発されてきた事により、その生命予後の延長は図られたが、進行再発大腸癌における決定的な治療法が確立されたわけではないため。

(4) HA の構造と役割：ヒアルロン酸(HA)はグルクロン酸(GlcUA)と N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)の 2 糖単位の連続構造であり、細胞外マトリックスの主要な構成成分のひとつとして生体内に広く分布していることや、乳癌・膵癌・前立腺癌・大腸癌など様々な癌で HA の腫瘍内の増加が確認されていること。

(5) 4-methylesculetin(ME)の抗腫瘍効果の実績：膵癌における抗腫瘍効果が確認されていること。

以上の背景・実績などのより、今回 ME に関しての、特に進行大腸癌の浸潤・転移機構に関わる重要な因子を解析せんとして、申請したまでである。

## 2. 研究の目的

ヒト大腸癌細胞を用いて HA 合成阻害剤である ME の HA 合成阻害効果、HA 合成阻害によって生じる大腸癌細胞への接着能、遊走能に与える影響を検討し、同時に ME のヒアルロン酸合成に関する作用機序についても探る目的である。次に、*in vitro* の実験データを基に、ヌードマウスの皮下に大腸癌細胞を移植して大腸癌腫瘍結節を形成し、ME 投与による大腸癌腫瘍中の HA 合成阻害阻害効果、増大阻害効果を検討する。その上で、進行大腸癌を想定し、ヌードマウスの腹腔内に大腸癌細胞を移植させ、末期大腸癌状態モデルを作成し、ME が大腸癌の増殖・転移を抑制することで、マウスの生命予後を延長させるかを検討する事を目的とした。

## 3. 研究の方法

2009 年には大腸癌細胞培養を行い、ヒアルロン酸合成阻害剤である ME に対する接着能・遊走能を解析する。2010 年以降はヌードマウスの対して臨床的な抗腫瘍実験を行う方針とした。

### (1) Cell growth assay

ME の大腸癌細胞に対する細胞毒性を探るため、大腸癌細胞を培地 90  $\mu$ l あたり

6.25 $\times 10^2$ 個になるように 96 ウェルプレートに蒔き、細胞を接着させるため、24 時間インキュベートする。ME を 0~100  $\mu$ M になるように各ウェルに加え、24 時間毎に細胞増殖活性を測定する。測定はアラマーブルーアッセイにて行う。

### (2) ME の培養液中の HA 分析

ME の細胞培養液中のヒアルロン酸合成抑制効果を知るべく、培養皿で大腸癌細胞を 2.0 $\times 10^4$  ずつ蒔き、24 時間インキュベートする。のの培地内に ME を添付し、72 時間後に培養液と細胞を回収し、ヒアルロン酸測定キットを用いて、培地中のヒアルロン酸量を測定する。

### (3) ME の細胞外マトリックスの可視化

ME の細胞外マトリックスへの影響を可視化するため、大腸癌細胞を 35mm ディッシュに 1.5 $\times 10^3$  個ずつ蒔き、細胞を 24 時間インキュベートして細胞接着させる。ME を各ディッシュに加え、72 時間インキュベートする。その後培地を除き、顕微鏡で観察し、デジタルカメラで撮影し、可視化データとした。

### (4) Adhesion assay

ME の大腸癌細胞に対する接着能を検討するため、フラスコ型 dish に 5 $\times 10^6$  個の大腸癌細胞を蒔き、一晩インキュベートする。ME を調整し 72 時間インキュベートする。前処理した大腸癌細胞をトリプシン/EDTA 溶液で葉がした後に 5 $\times 10^5$  cell/ml に調整し、35mmdish で 60 分間インキュベートし、PBS 2ml で洗浄する。Dish に残った細胞数を血球計算版で測定し、コントロール群の接着細胞に対する ME 群の接着細胞数の比率を測定する。

### (5) Locomotion assay

ME の大腸癌細胞に対する遊走能を検討するために、ME 調整培地で 72 時間培養する。Matrigel invasion chamber を室温にし、無血清培地存在下でインキュベートする。メタノールで細胞固定し、HE 染色し、マトリゲルを通過した細胞数の平均を測定する。

### (6) UGT assay

ヒアルロン酸合成制御機序を調べるために、ME が UDP-glucuronyl transferase によって glucuronidation されるかについて検討する。UDP-glucuronyl transferase と ME を UDP 存在下でインキュベートする。反応液中に UDP-ME が存在するかを分析する。

- (7) 遺伝子解析  
ME 存在下に培養した大腸癌細胞の遺伝子学的変化の有無をマイクロアレイで解析する。
- (8) ME 投与下大腸癌移植マウスにおける大腸癌腫瘍体積の測定  
ヌードマウスの背部皮下に大腸癌腫瘍  $5.0 \times 10^6$  cells/ml に調整して移植した。3 週間経過後に ME が 3mg/g/day になるように調整した餌を連日投与する。投与期間中のマウスの体重および皮下腫瘍の体積を測定する。
- (9) 大腸癌組織の免疫組織学的分析  
皮下移植 9 週間後に皮下腫瘍を摘出し、ホルマリン固定・パラフィン包埋する。インキュベート後 DAB 基質溶液で発色する。
- (10) 大腸腫瘍中の HA 測定  
遠心エバポレータを用いて乾燥重量を測定する。タンパク質分解酵素溶液を添加し 55 度、24 時間反応させる。100 度、10 分間煮沸失活後、遠心分離、濾過し、上清を採取し、HA を測定する。
- (11) ME 投与下腹腔内大腸癌移植マウスにおける生存曲線作成  
大腸癌を  $5.0 \times 10^6$  cells/ml に調整し、ヌードマウスの腹腔内に移植し、癌性腹膜炎を作成。ME 調整した餌を連日投与して、その生存日数を解析する。

#### 4. 研究成果

- (1) Cell growth assay  
ME の大腸癌細胞に対する細胞毒性が、細胞増殖活性することで証明された。
- (2) ME の培養液中の HA 分析  
ME の細胞培養液中のヒアルロン酸合成はコントロールに比して、完全に低下していた。
- (3) ME の細胞外マトリックスの可視化  
ME の細胞外マトリックスへの影響を細胞接着させ、顕微鏡で観察し、デジタルカメラで撮影できた。
- (4) Adhesion assay  
ME の大腸癌細胞に対する接着能の検討では、コントロール群の接着細胞に対して、ME 群の接着細胞数の比率が有意差をもって低値であった。
- (5) Locomotion assay

ME の大腸癌細胞に対する遊走能を検討したが、やはり ME の効果によりマトリゲルを通過した細胞数の平均は ME 群で低かった。

- (6) UGT assay  
ヒアルロン酸合成制御機序を調べるために、ME が UDP-glucuronyl transferase によって glucuronidation されるかについて検討したが、UDP-ME が存在していた事を確認できた。
- (7) 遺伝子解析  
ME 存在下に培養した大腸癌細胞の遺伝子学的変化の有無をマイクロアレイで解析したが、明らかに遺伝子に影響を与えるデータは集積出来なかった。このため、遺伝子レベルでの影響は少ないと考えられた。
- (8) ME 投与下大腸癌移植マウスにおける大腸癌腫瘍体積の測定  
ME が 3mg/g/day に調整した餌を連日投与した群では、体重増加および腫瘍体積増加を抑制していた。
- (9) 大腸癌組織の免疫組織学的分析  
腫瘍に対する免疫関与を示唆するデータは認めなかった。
- (10) 大腸腫瘍中の HA 測定  
大腸腫瘍中の HA は、ME 投与群で低いデータであった。
- (11) ME 投与下腹腔内大腸癌移植マウスにおける生存曲線作成  
生存日数においても、有意な差を持って ME 投与群で延長を認めた。

全体をまとめると、ME の効果を確認と可視化を行った。癌細胞のヒアルロン酸産生を低下させる事により、更にはその細胞接着能および遊走能を相対的に低下させていることが判明した。また間接的にその大腸癌細胞レベルでの毒性が確認された。ME の細胞外マトリックスへの影響も、少なからず認められることが推測されたため、その程度や濃度との関係など、細胞活性などを観察することや、接着性を可視化するため顕微鏡でのデジタル化を行った。

また、動物実験においても、ME が作用することで、HA の作用が低下し、明らかに生命後に寄与することが証明されたといえる。

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)

[雑誌論文] (計1件)

局所進行直腸癌に対する放射線照射の効罰  
村田暁彦、小山基、坂本義之、諸橋一、神寛之、長瀬勇人、袴田健一 癌の臨床：58、  
367-373、2012、  
URL：<http://www.shinoharashinsha.co.jp>

[学会発表] (計1件)

進行直腸癌に対する術前化学療法の成績  
村田暁彦、小山基、坂本義之、諸橋一、袴田健一 67回大腸肛門病学会、福岡、  
2012.11.16-11.17

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 暁彦 (MURATA AKIHIKO)  
弘前大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：10344607

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

吉原 秀一 (YOSHIHARA SHUICHI)  
弘前大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：00261454

