

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861398

研究課題名(和文) がん性腹水の進展におけるアクアポリンチャネルの関与と機能解析 新薬開発をめざして

研究課題名(英文) Does Aquaporin channel have an important role in cancer ascites?

研究代表者

栗山 俊之 (Toshiyuki, Kuriyama)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：10405467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： がん性腹膜炎に伴うがん性腹水はがん患者の難治性の腹部膨満感をまねくため、腹水貯留量を軽減させることは症状緩和にとって極めて重要である。しかし、腹水生成のメカニズムについて不明な点が多いため、腹水貯留を軽減させることは困難を極める。本研究では、水分子を通すチャネルとして1993年に発見されたアクアポリンチャネルががん性腹水の発生ならびに進展に関与するという仮説を立てて研究を進めていった。

がん性腹膜炎を高頻度に惹起するヒト由来胃がん細胞株 85As2細胞をマウス腹腔内に投与することによって、著明ながん性腹水貯留を認めたが、アクアポリンチャネルと腹水の直接の関与は証明できなかった。

研究成果の概要(英文)： Malignant peritonitis is one of the most intractable symptom of abdominal distension for cancer patients and it depends on amount of malignant ascites. However, it remains unclear the mechanism of production of malignant ascites. So we can hardly manage this symptom. We hypothesized that novel water channel "aquaporin" channel might have an important role in production of malignant ascites. The aim of this study was the proof of this hypothesis. After we implanted 85As2 cells, which is derived from human gastric cancer and induces cancer peritonitis to mice, we observed that severe cancer ascites was observed, but we failed to prove the hypothesis.

研究分野：緩和医療

キーワード：がん性腹水 アクアポリン 胃がん細胞

1. 研究開始当初の背景

- (1) 大部分の正常細胞においては、細胞膜脂質は水を通過させる。しかし、ある種の上皮細胞やがん化細胞では、水の透過性が高くなっていることが知られていた。このため他の機構によって水の透過性が制御されていると予想されていた。1993年、Agreらはアクアポリン (Aquaporin, AQP) とよばれる、水分子のみを選択的に透過させ、他のイオンや物質を透過させない水チャネル (water channel) を発見した。これまでに AQP0 から AQP12 までの 13 種類の異なる遺伝子にコードされたチャネルが発見され、ファミリーを形成している。
- (2) 2003 年のノーベル医学生理学賞受賞期に AQP が原因となるさまざまな疾患との関連が研究されている。これまで、水分代謝異常を来す先天性尿崩症は AQP2 変異によるもので、急性視神経炎と急性脊髄炎を繰り返す Devic ' s disease は AQP4 に対する自己免疫疾患であることが明らかにされている。
- (3) 近年、がん研究の領域でも AQP に関する研究が行われており、がん種によって AQP subset 発現パターンが異なっていること、例えば星状細胞腫では病理組織学的異型度と AQP4 の発現に相関があり [3,4]、脳浮腫形成に関わっているとの指摘がある。また卵巣がんでは AQP5 の発現が亢進している。さらに、AQP1 は腫瘍血管内皮に広く存在しており、これらのことから AQP が腫瘍の増大・浸潤・転移に関与しているのではないかという仮説も立てられている。
- (4) がん性腹膜炎を有するがん患者では難治性の腹水がしばしばみられる。この腹水貯留は、腹部膨満、さらに消化管運動障害、食物通過障害をきたし、がん患者の QOL の著しい低下を招くことは周知である。がん性腹水の成因には低栄養・低アルブミン血症・リンパ管閉塞・腫瘍が産生するサイトカインなど多くの要因が考えられているが、その実態は不明である。AQP の機能異常はさまざまな病態を招来し、またがん研究分野においても病態との関連が研究されている。しかし、これまで AQP とがん性腹水の関連について、その成因、そして進展への関与という観点から研究された報告は全くない。
- (5) がん性難治性腹水の現在の対処法としては、利尿薬投与、ならびに胸腹水穿刺による腹水除去が行われているが、利尿薬はその効果が薄く、さらに腹水穿刺によ

る水分除去は必要となるアルブミンなどの体性成分を喪失することが大きな問題となる。水分のみを制御できる方法があればがん性腹水を有する多くのがん患者の QOL を向上させることは明らかである。特に水分の細胞内外への移動を行う AQP に関する腹水生成のメカニズム、さらには AQP に作用する薬物への開発という道筋を開拓することは、これからさらに増えることが予想されている本邦における進行がん患者の QOL 向上という観点から大変重要な研究課題であると確信している。

2. 研究の目的

がん性腹水の貯留は、がん患者の QOL を著しく低下させる病態である。これまで、難治性腹水の貯留に対して、利尿剤投与、腹腔内への抗癌剤投与、腹水穿刺などおこなわれてきたが、どれも効果的な方法がないままである。がん性腹水貯留のメカニズムとしては、低栄養・低アルブミン血症・リンパ管閉塞・腫瘍が産生するサイトカインなどが考えられている。低アルブミン血症に対する補充療法以外は、現在のところメカニズムに対する対処ができないものばかりである。

AQP は水分子を選択的に透過させるが、イオンや他の物質は透過させない水チャネル (water channel) である。1993 年に AQP が発見されて以来、さまざまな分野で AQP に関する研究がおこなわれている。がん生物学領域においてはがん増殖に関する研究は進められているが、がん性腹膜炎モデルにおいて AQP に関する報告は未だかつてない。がんによる生体内の水移動の障害を AQP という観点から研究をおこなうという点で、本研究の独創性がある。

本研究では、がん性腹膜炎モデルで AQP 発現を確認し、がん性腹水の原因のひとつとして AQP が関与していることを確認し AQP 阻害剤を適用することによって、腹水貯留が改善することを検証する。がん性腹水のメカニズムならびに治療薬の開発を AQP とがん性腹水との研究を通して解明し、腹水を伴うがん性腹膜炎の症状緩和治療に応用できれば、同症状に悩む多くのがん患者の QOL 向上に大い貢献すると確信する。

3. 研究の方法

- (1) 《85As1 細胞を移植して作成したがん性腹膜炎モデル動物を用いた解析》
ヒト由来胃がん細胞株である MKN45 細胞を

週令 10 週(平均 25g)のマウス腹腔内に接種させ、術後 30 日間がん性腹膜炎の進行・病態をモニターした。その指標として、腫瘍容量、体重・血清アルブミン値・腹水量・食餌摂取量を観察した。

また、ラットの腹腔内に接種すると高頻度のがん性腹膜炎を引き起こす 85As1 細胞をラット腹膜へ移植し、同様に観察をおこなった。

(2) 《胃がん細胞 85As1 細胞での AQP 発現の解析》

MKN45 細胞、85As1 細胞を 100mm dish 上で RPMI1640 medium を用いて培養した。confluent となったところで培養細胞を回収し、細胞数の計測および、BCA assay にてタンパク質定量をおこなった。

MKN 細胞・85As2 細胞から回収した同用量のタンパク質を調整したのち、ウエスタンブロッティング法を用いて電気泳動した。電気泳動させたのちに、ニトロセルロース膜へ転写させたのちに、AQP 抗体を用いて、AQP タンパクの検出をおこなった。

4. 研究成果

(1) 《85As1 細胞を移植して作成したがん性腹膜炎モデル動物を用いた解析》

シャム手術(MKN45 細胞、85As2 細胞いずれの細胞も投与しなかった)をおこなったラットは、経過に伴い体重は増加し、術後 30 日で体重 27g に増加した。MKN45 細胞を接種されたラットは週数の経過に伴い体重は減少傾向であったが、個体のうち 60%は体重減少がみられなかった。

MKN45 細胞を接種した個体すべてに腹膜の腫瘍形成を認められたが、腹水を検出できた個体はなかった。85As2 細胞を接種した個体については、すべての個体において、腫瘍形成のみならず腹膜播種とがん性腹水を検出することができた。

85As2 細胞を接種させたマウスはすべて体重減少が認められた。腹腔内に 1×10^6 の細胞数を接種したラットは術後 30 日には体重は平均 17g にまで減少した。一方、接種した細胞数を 5×10^6 まで増加させると、術後 3 - 4 週間までは体重減少すしたが、それ以降は腹水貯留とともに体重増加がみられた。術後 30 日の体重は平均 23g であった。

マウスの生存は、シャム手術のみをおこなったものについては、術後 5 週まで

死亡する個体はなかった。85As 細胞 1×1 を接種したマウスは、術後 5 週の生存率が 25%、 5×10^6 接種した個体のうち最長生存期間が術後 35 日であった。

(2) 《胃がん細胞 85As1 細胞での AQP 発現の解析》

MKN45・85As2 細胞より抽出されたタンパク質で AQP の発現量を比較したが、明らかな差はなかった。

(3) 以上の結果を踏まえて、マウス腹腔内に 85As2 細胞を接種することによって作成したがん性腹膜炎モデルにおいて、腹水貯留が著しく、全身状態の悪化により生存期間が著しく短縮することが明らかにはなかった。しかしながら、がん性腹水量と AQP の関連性については証明することができなかった。本研究において、がん性腹水発生と AQP の関連が全くなかったということは結論付けることはできない。

従来から処方されている、五苓散という漢方薬が AQP チャネルを阻害することによって過剰な水貯留を抑え込むことができるのではないかと、近年着目されている。

また、がん性腹水を有する患者の腹水コントロールに五苓散が有効かもしれないという症例報告もある。

今後は、他の研修アプローチからさらなる検討を進めていくことができるかもしれない。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗山俊之 (Toshiyuki Kuriyama)
和歌山県立医科大学. 医学部. 講師
研究者番号：10405467

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

上園保仁 (Yasuhiro Uezono)
寺脇潔 (Kiyoshi Terawaki)