

| | | | |
|---------|--|--------|--------|
| 氏名（本籍） | 丸山 岳人（東京都） | | |
| 学位の種類 | 博士（医学） | | |
| 学位記番号 | 博甲第 7054 号 | | |
| 学位授与年月 | 平成 26 年 3 月 25 日 | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 | | |
| 審査研究科 | 人間総合科学研究科 | | |
| 学位論文題目 | (-)-Epigallocatechin-3-gallate suppresses liver metastasis of human colorectal cancer ((-)-Epigallocatechin-3-gallate はヒト大腸癌肝転移を抑制する) | | |
| 主査 | 筑波大学教授 | 医学博士 | 兵頭 一之介 |
| 副査 | 筑波大学准教授 | 博士（医学） | 松坂 賢 |
| 副査 | 筑波大学講師 | 博士（医学） | 加野 准子 |
| 副査 | 筑波大学講師 | 博士（医学） | 阿久津 博義 |

論文の内容の要旨

(目的)

(-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) は緑茶に含まれるカテキンの主成分の一つであり、大腸癌をはじめとして様々な種類の癌細胞に対して増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが報告されてきた。大腸癌の遠隔転移の中で最も多い臓器は肝臓であるが、これまで肝転移腫瘍に対する EGCG の作用は報告されていない。そこで、本研究では *in vitro* でのヒト大腸癌細胞株に対する EGCG の抗腫瘍効果の検討に加え、ヒト大腸癌肝転移モデルマウスを作成し *in vivo* での EGCG の抗腫瘍効果を検討した。

(対象と方法)

ヒト大腸癌細胞株 RKO および HCT116 に EGCG を添加し、以下の検討を行った。細胞生存率と細胞増殖率をそれぞれ cell counting kit-8 と BrdU にて検討した。アポトーシス細胞の検出は TUNEL 染色にて行った。シグナル伝達は western blot を用いて、また、チロシンキナーゼ型受容体の発現は real time RT-PCR を用いて、それぞれ検討した。

ヒト大腸癌肝転移モデルは 2×10^6 個の RKO 細胞を SCID マウスの脾臓に注入し作成した。control 群 (n = 12), EGCG 群 (n = 12) の 2 群に分け、control 群は無治療とし、EGCG 群は癌細胞移植後 7 日目から 2 週間にわたって 1 日毎に計 7 回 EGCG 30 mg/kg body weight を腹腔内投与した。癌細胞移植後 21 日目にマウスを犠牲死させ、肝臓を摘出した。抗腫瘍効果の検討として、摘出した肝臓の 4 葉をそれぞれ 2 つに分割しホルマリン固定した。それぞれの標本から 1 切片ずつ計 8 切

片を hematoxylin-eosin 染色し、正常肝臓に対する転移腫瘍面積を計測した。肝転移腫瘍内のアポトーシス細胞の有無を TUNEL 染色にて検出した。また、腫瘍内の新生血管を anti-CD31 antibody で免疫染色し評価した。副作用の検討として、体重変化、血清 AST, ALT 値の測定を行った。

(結果)

ヒト大腸癌細胞株に EGCG を添加すると、細胞生存率、細胞増殖率は EGCG 50 μ M 以上でも有意に低下し、TUNEL 染色でアポトーシス細胞の出現を認めた。シグナル伝達系の解析では EGCG により Akt の脱リン酸化および p38 のリン酸化を認めた。Real time RT-PCR の検討では EGFR, HER2, c-Met の発現に変化は見られなかったが、EGCG 25 μ M 以上で VEGFR2 の発現が有意に低下した。

EGCG 群では control 群と比較して肉眼像および病理組織像ともに腫瘍サイズの縮小を認めた。肝転移面積は control 群に比べて EGCG 群で有意に減少した。TUNEL 染色では EGCG 群で肝転移腫瘍内のアポトーシス細胞の増加を認めた。また、anti-CD31 antibody での免疫染色では、EGCG 群で肝転移腫瘍内の新生血管の低下を認めた。control 群、EGCG 群ともに体重減少および肝逸脱酵素の上昇は認めず、明らかな副作用は認めなかった。

(考察)

これまで大腸癌で最も遠隔転移の多い肝臓における EGCG の腫瘍増殖抑制効果については不明であったが、我々はヒト大腸癌肝転移モデルを作製し EGCG が肝転移腫瘍を抑制することを明らかにした。今回の *in vitro* の実験結果から、EGCG の抗腫瘍効果のメカニズムの一つとして VEGF 受容体の抑制を介して Akt の活性を低下させる経路が考えられた。すでに EGCG にはヒト血管内皮細胞の毛細管形成や遊走を抑制したり、VEGFR2 の発現を低下させたりする作用があることが報告されている。肝転移腫瘍内の新生血管が少なかった結果を考慮すると、EGCG は癌細胞に対する直接的な作用だけではなく、周囲の血管内皮細胞に作用し血管新生を抑制することで腫瘍の増大を抑制した可能性がある。今後は癌細胞と血管内皮細胞との共存下での EGCG の作用を検討し、より詳細なメカニズムを明らかにしていく予定である。

審査の結果の要旨

(批評)

本論文の著者らは EGCG が VEGF 受容体の抑制を介して Akt を抑制し、また p38 を活性化させヒト大腸癌細胞のアポトーシスを誘導し増殖を抑制したこと、さらには *in vivo* においてヒト大腸癌肝転移腫瘍内の血管新生の抑制とアポトーシスが誘導されることを確認している。しかし血管新生と細胞増殖に関するシグナル伝達経路の詳細な検討はなされていないため、作用機序の解明は不十分であり、今後のさらなる検討が望まれる。

平成 26 年 1 月 6 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。