

本研究によって、これまで主観的に評価されてきた乳房再建の諸要因の数値化ができ、その臨床応用が可能となった。

研究内容は乳房再建の発展に大きく貢献する内容であり医学博士の学位論文に値する研究として評価した。本研究に関連して乳房の解剖学的知識、乳腺腫瘍の病理、乳房再建の術式とその形成外科的考察についても審査を行ったがいずれも優れた成績であった。

氏 名	しる た でつ ぎ 城 田 哲 哉
学位の種類	博 士 (医学)
学位記番号	医 第 8 5 2 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cells Induced by Eicosapentaenoic Acid (エイコサペンタエン酸によるヒト膵癌細胞株に 対するアポトーシス誘導の機序)
論文審査委員 (主 査)	教 授 大 柳 治 正
(副主査)	教 授 塩 崎 均
(副主査)	教 授 東 野 英 明

論文内容の要旨

【目的】

肺癌はまだまだ難治性癌であり、その予後改善には集学的治療を必要とする。一方、 ω -3 系多価不飽和脂肪酸は癌細胞増殖の抑制作用を有することが近年明らかにされ、 ω -3 系多価不飽和脂肪酸の一つであるエイコサペンタエン酸の投与が切除不能肺癌患者の悪液質の症状緩和に有効であることが報告されている。しかし肺癌細胞に対する EPA の直接的な効果に関しては、ほとんど検討されていない。この研究の目的は EPA によるヒト肺癌細胞株に対する細胞増殖抑制効果及びその機序を解明することである。

【方法】

ヒト肺癌細胞株 (SW1990, AsPc-1, PANC-1) を用いて EPA を 0, 100, 300, 500 μ M の濃度で添加し 48 時間後に細胞を回収し、細胞増殖抑制効果を MTS assay で、アポトーシス誘導は DNA 断片化細胞を FITC-TUNEL 法を用いて蛍光染色し Flow cytometry を用いて解析、アポトーシス陽性細胞率を測定した。アポトーシス誘導促進酵素である Caspase3 活性は FITC 標識 Active Caspase3 抗体で蛍光染色した後、Active Caspase3 抗体陽性細胞率を Flow cytometry で解析した。また、EPA による肺癌細胞の形態学的変化は電子顕微鏡にて確認した。さらに、EPA 投与によるアラキドン酸カスケードの代謝酵素である cyclooxygenase-2 (COX-2) 蛋白発現への関与を Western blotting 法にて検討した。

【結果】

EPA 添加群ではすべての肺癌細胞株において有意に細胞増殖抑制効果を示した。アポトーシス陽性細胞率及び Active Caspase3 抗体陽性細胞率は EPA 添加にて有意に増加し、その程度は SW1990 において特に顕著であった。電子顕微鏡による細胞の形態学的変化では、EPA 添加群においてアポトーシスに特徴的なクロマチンの凝縮・核膜辺縁への偏在及びアポトーシス小体を認めた。COX-2 蛋白発現も EPA 添加によりいずれも有意に低下した。

【考察】

EPA はヒト肺癌細胞株に対し、アポトーシスを誘導することにより細胞増殖抑制効果を有する事が明らかとなった。さらにアポトーシス誘導には Caspase3 の活性化が関与すると推測されるがその発現の程度は細胞間にて差異が存在し、EPA の効果には細胞特異性が存在するものと考えられた。また、COX-2 蛋白発現の低下は Caspase3 の活性化を介してアポトーシスを誘導するとされており、本研究では EPA は COX-2 蛋白発現の低下を介して肺癌細胞のアポトーシスを誘導している可能性が示唆された。

【考察】

EPA は肺癌細胞株に対し、アポトーシス誘導による細胞増殖抑制の直接作用を有する事が示唆された。またこのアポトーシス誘導には Caspase3 活性化及び COX-2 蛋白発現の低下が関与するものと考えられた。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2005年8月日 公表予定	出版物名 NUTRITION
	公 表 内 容	2005年8月日 発行予定
	全 文	

論文審査結果の要旨

本論文では、 ω -3系多価不飽和脂肪酸(ω 3 polyunsaturated fatty acids: PUFAs)の一つであるエイコサペンタエン酸(eicosapentaenoic acid: EPA)によるヒト膵癌細胞株に対する細胞増殖抑制能及びその機序について着目した。以前よりPUFAsを豊富に含むとされる魚を多量に摂取しているアラスカやグリーンランドのエスキモー人では、癌の死亡率が低いと報告されている。一方、膵癌は未だ悪性度の高い難治癌とされ、5年生存率は5%以下、切除率は20~30%以下とされ、手術不能例では体重減少、悪液質から患者のQOLも著しく障害され集学的治療を要する。近年、Fearonらの臨床研究において悪液質を有する膵癌末期患者にEPAを投与することで体重減少の軽減、安静時エネルギー消費量の低下、脂質酸化の改善など、その有用性が報告されている。今回申請者は今迄ほとんど報告の見られないEPAのヒト膵癌細胞株に対する細胞増殖抑制能、アポトーシス誘導及びその機序をin vitroにて検討した。

ヒト膵癌細胞株として高転移株であるSW1990、AsPC-1、低転移株であるPANC-1の三種を使用した。これらをフラスコで37°C、5%CO₂の環境下にて培養し、90%コンフルエンス後、エタノールで溶解したEPAを0, 100, 300, 500 μ Mの濃度で添加、48時間後に細胞を回収し、以下の項目を検討した。MTS assayにて細胞増殖抑制効果を検討した。さらにアポトーシス誘導能をフローサイトメトリーを用いたFITC-TUNEL法、電子顕微鏡像の細胞形態学的変化にて検討した。さらにアポトーシス関

連蛋白であるCaspase-3活性をFITCで標識された active caspase-3抗体をフローサイトメトリーで検討した。cyclooxygenase-2(COX-2)蛋白は、EPAからエイコサノイドが産生されるのに重要な酵素であり、またCOX-2の発現が癌制御に関与するとの報告があり、今回、Western blotting法にてこれを測定した。統計学的処理として、測定値はmean \pm SDで示し、各グループ間の比較はone-way ANOVAを使用し、危険率5%未満を有意差ありと判定した。

MTS assayにおける細胞増殖抑制能の検討では、3種の膵癌細胞株すべてに対し、有意にEPA添加にて細胞増殖抑制効果を見た。アポトーシス誘導の検討では、FITC-TUNEL法にて有意にアポトーシス抗体陽性細胞率の増加を確認、特にSW1990に著明であった。電子顕微鏡による細胞形態学変化では、アポトーシスに特徴的な核クロマチンの凝集像、核クロマチンの核膜への偏在、核DNAの断片化、アポトーシス小体を認め、EPAにてすべての膵癌細胞株にアポトーシスを生じさせていることを証明した。Caspase-3活性に関してもEPA投与にてすべての膵癌細胞株で有意に活性型Caspase-3抗体陽性細胞率の増加を認め、アポトーシス発現の証明になった。Western blotting法によるCOX-2蛋白への関与については、3種の膵癌細胞株すべてにおいてEPA添加にて発現の減弱を認め、アクチンを用いた定量化にて有意に低下していることを証明した。

EPAはヒト膵癌細胞株に対し、アポトーシスを誘導することにより細胞増殖抑制効果を有する事が明らかとなった。

さらにアポトーシス誘導にはCaspase3の活性化が関与すると推測されるがその発現の程度は細胞間にて差異が存在し、EPAの効果には細胞特異性が存在するものと考えられた。また、COX-2蛋白発現の低下はCaspase3の活性化を介してアポトーシスを誘導するとされており、本研究ではEPAはCOX-2蛋白発現の低下を介して肺癌細胞のアポトーシスを誘導している可能性がされた。今回、同時に *in vivo* の検討も施行したが、*adlib* の経口摂取のため摂取量の問題もあり、有効量と毒性を証明することは出来なかった。しかし、*in vivo* の検討において乳癌に対する ω -3系多価不飽和脂肪酸の適量と抗癌剤との併用投与が抗癌剤単独投与に比べ、腫瘍抑制効果の増大及び副作用の軽減をもたらしたとの報告がある。現在、投与量を一定にすべくEPAを含む脂肪乳剤等の開発に着手している。本研究は ω -3系多価不飽和脂肪酸の癌細胞に対する直接の抗腫瘍効果をアポトーシスを中心にその機序を明らかにした学問的価値の非常に高いものである。今後の検討予定である*in vivo* 実験に対する基礎データを提供し、悪性腫瘍の患者管理に適応の可能性を示したことは、将来の肺癌患者に対する栄養管理法の一分野を示唆する臨床的意義の高いものと思われる。

氏名	よね 米 阪 仁 雄
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医 第 8 5 3 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	small interfering RNA による survivin 阻害が肺癌細胞株の増殖とアドリアマイシン感受性に与える影響
論文審査委員 (主査)	教授 福 岡 正 博
(副主査)	教授 宗 像 浩
(副主査)	教授 植 村 天 受