

論 文 の 内 容 の 要 旨

論文提出者氏名	小 野 元 紀
論文審査担当者	主 査 副島 雄二 副 査 中沢 洋三・山田 充彦・高野 政志 (防衛医科大学校)
<p>論 文 題 目</p> <p>Anti-tumor effect of Wasabi component, 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate, against endometrial carcinoma cells</p> <p>(ワサビ成分 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate の子宮内膜癌細胞に対する抗腫瘍効果)</p>	
<p>(論文の内容の要旨)</p> <p><b>【背景と目的】</b> 本邦において子宮体がん (EMC: endometrial carcinoma) 患者は急速に増加しており、予後は一般的に良好であるが、進行例や再発例では依然として不良である。近年、再発例に対する多標的チロシンキナーゼ阻害薬 Lenvatinib や免疫チェックポイント阻害薬 Pembrolizumab の有用性が報告されているが、同時に深刻な副作用 (AE: adverse effect) も報告されており、安全性の高い新規治療薬が望まれる。そこで我々は長野県の特産品であり、古くから食材として親しまれているワサビに注目した。ワサビは抗菌作用を持つことで知られていたが、近年、カラシなどに含まれる allyl isothiocyanate (AITC)、ブロッコリーに含まれる sulforaphane (4-MITC) などのイソチオシアネート類 (ITCs) の様々な作用が報告されており、ワサビの主要化合物である 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate (6-MITC) についても抗炎症作用など様々な機能が報告されてきた。6-MITC の抗腫瘍効果は乳癌や皮膚癌、膵癌、大腸癌、血液腫瘍などで報告されているが、EMC に対する報告はないことから、本研究では、6-MITC の EMC 細胞株に対する抗腫瘍効果を in vitro および in vivo で検討した。</p> <p><b>【方法】</b> EMC 細胞株 (Ishikawa, HEC265, HEC108, KLE, HEC1B) と、非癌正常細胞としてヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC、不死化正常子宮内膜細胞 EM-E6/E7-hTERT2 における、6-MITC の細胞生存率に対する作用を WST-1 アッセイにより測定し、その作用を positive control である AITC、4-MITC と比較した。また EMC 細胞株の細胞生存に対する抗癌剤シスプラチン (CDDP) と 6-MITC の併用効果を WST-1 アッセイにより評価した。6-MITC の誘導する細胞死について、Annexin V と Ethidium Homodimer III の蛍光染色によるアポトーシス/ネクローシス/正常細胞検出キットおよびウエスタンブロット法を用いて検討した。EMC 細胞を免疫不全ヌードマウスの右臀部 (Ishikawa)、左臀部 (HEC1B) を異種移植し、6-MITC 2<math>\mu</math> mol/kg/day もしくは 4<math>\mu</math> mol/kg/day を強制経口投与し、子宮体癌細胞異種移植片の腫瘍量や体重変化を経時的に計測し、実験終了時に摘出した異種移植腫瘍の Ki-67 と cleaved-caspase 3 (CC3) の免疫染色を行い、6-MITC の細胞増殖や細胞死への関与について検討した。さらに同時に摘出した脾臓よりナチュラルキラー (NK) 細胞を抽出し、NK 細胞活性を測定した。</p>	

**【結果および考察】** 6-MITC は全ての EMC 細胞株の増殖を抑制し、50%阻害濃度 (IC50) は 9.6 $\mu$ M (Ishikawa) から 17.6 $\mu$ M (HEC1B) の間であった。一方、HUVEC や EM-E6/E7-hTERT2 に対する増殖抑制作用は乏しく、IC50 を算出できなかった。また 6-MITC による EMC 細胞の増殖抑制作用は AITC や 4-MITC より強く、特に Ishikawa で差が大きかった。CDDP との併用では、6-MITC 単独では増殖抑制効果の乏しい 5 $\mu$ M の投与により、CDDP の殺細胞効果を増強し、特に HEC265 および HEC1B に対しては顕著な相乗効果を示した。蛍光染色による検討では、Ishikawa、HEC108、HEC265 では 6-MITC 用量依存的にアポトーシスが増加したが、HEC1B では有意な増加は観察されなかった。ウエスタンブロットでは、全ての EMC 細胞において 6-MITC により抗アポトーシスタンパク BCL2 の発現が抑制され、アポトーシスマーカーである CC3 発現は Ishikawa、HEC108、HEC265 で増強したが HEC1B では発現を認めなかった。次に Ishikawa と HEC1B の異種移植マウスを用いた検討では、6-MITC を 4 $\mu$ mol/kg/day 経口投与群で対照群と比較して移植 5 週間後に Ishikawa、HEC1B の異種移植腫瘍体積が有意に減少した (P=0.01、0.02)。また、摘出した腫瘍の免疫染色では、Ki-67 発現の減少 (P=0.28、0.03) と CC3 発現の増強 (どちらも P<0.01) を認めた。6-MITC は in vitro では HEC1B に CC3 発現増強を誘導しなかったが、in vivo では誘導したことから、ヌードマウスにも存在する NK 細胞が HEC1B のアポトーシス誘導に関与する可能性を考え、検討を行った。特に EMC 細胞の異種移植 4 週間前から 6-MITC を連日投与することで、NK 細胞活性の有意な増強が観察された (P<0.05)。一方、6-MITC 投与により、マウスは飲水量の低下や体重減少を認めず、明らかな AE はみられなかった。

**【結論】** 本研究により、6-MITC は EMC 細胞に対して抗腫瘍効果を有することが示された。一方、非癌正常細胞に対しては殺細胞性を示さず、生体内でも明らかな AE は認めないことから、安全性が高いと考えられた。6-MITC は生体内においては、直接作用だけでなく NK 細胞活性増強を介して EMC 細胞のアポトーシスを誘導する可能性が考えられた。以上のことから、6-MITC は EMC の新規治療薬候補となりうることが示唆された。