

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	小林 陽子
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 792 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Effect of Histidine on Sorafenib-induced Vascular Damage: Analysis using Novel Medaka Fish Model (分子標的薬ソラフェニブによる血管障害とヒスチジンによる軽減効果の検討: トランスジェニックメダカモデルを用いた解析)
論文審査委員	主査 教授 小松 雅明 副査 教授 佐藤 昇 副査 教授 寺井 崇二

博士論文の要旨

【背景及び目的】

ソラフェニブ (sorafenib、以下 SFN) は、肝細胞癌患者 (Hepatocellular carcinoma 以下 HCC) の生存期間の延長が報告されている分子標的治療薬であるが、その副作用である手足症候群 (Hand Foot syndrome 以下 HFS) は投与中止の主な原因となるため、その予防と軽減が重要である。申請者らは、これまでに SFN 投与により手足の末梢血流量が減少するために、HFS が発症することを報告した。さらには、その飲用によってヒトの手足血流量が改善することが報告されている鰹だし (Dried-bonito broth 以下 DBB) によって、HFS の発症率低下することを明らかとしてきた。さらに DBB 中の全アミノ酸の 40% を占めるヒスチジン (Histidine、以下 His) は、脳卒中自然発生高血圧ラット (Spontaneously hypertensive rats 以下 SHR) で脳血流を増加し、その発症を抑制することが報告されている。

そこで、申請者らは、ヒスチジンが SFN による血管障害を軽減、予防する効果を有するかどうか、検証することを目的として、血管を可視化できるトランスジェニックメダカを用いて検討した。

【方法】

SFN 投与による血管障害の影響を検討するため、血管構造が蛍光的に可視化できる GFP トランスジェニックメダカモデル (FLI-GFP メダカ) において SFN 投与が血管に与える影響を血管面積の観点から検証した。具体的には、FLI-GFP メダカの尾ひれ血管切断モデルを作製し、SFN 含有水槽で飼育し、尾ひれの全血管面積から切除領域の血管面積を引いた面積を既存血管面積、切除領域から再生される血管面積を再生血管面積と定義し、既存血管面積と再生血管を蛍光顕微鏡で経時的に観察し、それぞれの血管面積変化を解析した。

さらに、SFN による血管面積変化に対して、His が軽減・予防効果を示すかどうか、検討するため、SFN と各種濃度で His を含有した水槽で飼育した FLI-GFP メダカの既存血管面積と再生血管面積変化についても同様に解析した。

一方で、His の血管面積回復効果が、腫瘍増殖に与える影響を検討するために血管内皮細胞由来

の HUVEC 細胞、肝癌細胞株である HLE, HepG2 を対象として、SFN 単独群、SFN と His 含有投与時の細胞増殖率を MTT assay で検証し His の細胞増殖に与える影響を検証した。

【結果】

- SFN による血管面積への影響

FLI-GFP メダカに対して SFN 各濃度投与した際の、7 日後の各濃度における既存血管面積の変化率を測定すると SFN 0、75、150、300、600、2400 µg/L において、1.8%±4.3%、-8.1%±8.3% (p <0.05)、-9.7%±9.3% (p <0.05)、-15.8%±5.8% (p <0.05)、-13.5%±25.7%、-20.0%±15.5% であり、血管障害の指標とする血管面積減少率は SFN 濃度依存的であった。

- His による血管障害の軽減効果の検証

His 単独投与時の既存血管面積の変化率は、His 濃度 12 µg/ L、60 µg/ L 含有によりそれぞれ 12.3%±7.8% (p <0.05)、17.8%±5.0% (p <0.05) と増加傾向が著明で、His の血管拡張作用を再現確認し、また、その変化が His 濃度依存的であることが明らかにした。

さらに SFN 75 µg/L 含有時に His を併用した際に、既存の血管面積変化率は、His 濃度 12 µg/L、60 µg/ L において、SFN 75µg/ L 単独投与時の-8.1% から、それぞれ 5.6%±1.0% (p <0.01)、10.9%±12.1% (p <0.05) と濃度依存的にその効果を確認した。

SFN 濃度を 150、300、600 µg/L 投与時でも同様な結果が得られ、His が SFN の血管障害としての面積減少効果を軽減、改善すること、この改善傾向は His 濃度依存的であることが示された。一方で、新生血管に対する伸張増強作用は認めず、腫瘍血管の新生に関わる可能性は低く安全に使用できることが示唆された。

- His の細胞増殖に与える影響について

Huvec、HLE および HepG2 において、SFN によって、その濃度依存的な細胞増殖抑制効果を確認し、その効果が His によって阻害されないこと、すなわち His に SFN の効果を減弱する作用が無いことを証明し、His が安全に使用できることを確認した。

【考察】

SFN 投与による血管障害作用の一部が、血管面積減少効果に関与する可能性があることが示唆された。また、その変化が His の投与によって、減弱し、既存血管の血管面積が維持されることが明らかとなった。さらには、新生血管の増生や腫瘍細胞の増加には関与しないことが示された。すなわち、SFN の血管障害による副作用対策として、アミノ酸の His を摂取することが有用であることが示唆され、この結果はこれまでの申請者らの鰹だしの飲用によって得られた臨床効果を裏付けるものと考えた。

また、その効果が腫瘍細胞の増殖には関与しないことから安全に摂取できることも明らかとなった。

審査結果の要旨

【背景及び目的】 申請者は、肝細胞がん患者に対するソラフェニブ (sorafenib 以下 SFN) の

投与が手足の末梢血流量が減少することにより手足症候群 (Hand Foot syndrome 以下 HFS) が発症すること、そして鰹だし (Dried-bonito broth 以下 DBB) により HFS の発症率が低下することを報告してきた。本研究では、DBB に高濃度に含まれるヒスチジン (His) による SFN による血管障害回復効果を、血管を可視化できるトランスジェニックメダカを用いて検討した。

【方法】 血管構造が可視化できる GFP トランスジェニックメダカモデル (FLI-GFP メダカ) を利用し、既存血管面積と再生血管面積を評価できる「尾ひれ血管切断モデル」を開発した。この系を用い SFN 単独あるいは SFN と His 併用による血管障害を検討した。一方で、血管内皮細胞由来の HUVEC、肝がん細胞株である HLE, HepG2 を対象として、SFN 単独あるいは SFN と His 併用時の細胞増殖率を検証した。

【結果】 FLI-GFP メダカに対して SFN 各濃度投与した際の、7 日後の各濃度における既存血管面積の変化率を測定すると SFN 0、75、150、300、600、2400 $\mu\text{g/L}$ において、 $1.8\% \pm 4.3\%$ 、 $-8.1\% \pm 8.3\%$ ($p < 0.05$)、 $-9.7\% \pm 9.3\%$ ($p < 0.05$)、 $-15.8\% \pm 5.8\%$ ($p < 0.05$)、 $-13.5\% \pm 25.7\%$ 、 $-20.0\% \pm 15.5\%$ であった。

His 単独投与時の既存血管面積の変化率は、His 濃度 12 $\mu\text{g/L}$ 、60 $\mu\text{g/L}$ 含有によりそれぞれ $12.3\% \pm 7.8\%$ ($p < 0.05$)、 $17.8\% \pm 5.0\%$ ($p < 0.05$) と増加傾向が著明であった。

SFN 75 $\mu\text{g/L}$ 含有時に His を併用した際に、既存の血管面積変化率は、His 濃度 12 $\mu\text{g/L}$ 、60 $\mu\text{g/L}$ において、SFN 75 $\mu\text{g/L}$ 単独投与時の -8.1% から、それぞれ $5.6\% \pm 1.0\%$ ($p < 0.01$)、 $10.9\% \pm 12.1\%$ ($p < 0.05$) と濃度依存的にその効果が確認された。SFN 濃度を 150、300、600 $\mu\text{g/L}$ 投与時でも同様な結果が得られた。一方で、新生血管に対する伸張増強作用は認めず、腫瘍血管の新生に関わる可能性は低く安全に使用できることが示唆された。

Huvec、HLE および HepG2 において、SFN によって、その濃度依存的な細胞増殖抑制効果を確認し、その効果が His によって阻害されないことを確認した。

【考察】 SFN 投与による血管障害作用の一部が、血管面積減少効果に関与する可能性があることが示唆された。また、その変化が His の投与によって減弱し、既存血管の血管面積が維持されることが明らかとなった。さらには、His が新生血管の増生や腫瘍細胞の増加には関与しないことが示された。すなわち、SFN の血管障害による副作用対策として、His を摂取することが有用であることが示唆され、この結果はこれまでの申請者らの鰹だしの飲用によって得られた臨床効果を裏付けるものと考えられた。また、その効果が腫瘍細胞の増殖には関与しないことから安全に摂取できることも明らかとなった。

【学位論文としての価値の有無】

上述の新規性を鑑みて、学位論文としての価値を有すると判断した。