

氏 名	井 元 章
(ふりがな)	(いもと あきら)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成 25 年 1 月 12 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題名	Neural invasion induces cachexia <i>via</i> astrocytic activation of neural route in pancreatic cancer (膵癌の神経浸潤は脊髄のアストロサイト活性を介して悪液質を促進する)
論文審査委員	(主) 教授 内 山 和 久 教授 官 武 伸 一 教授 岡 田 仁 克

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《背 景》

悪液質は主に脂肪組織と骨格筋の重量減少を中心とする体重減少と、肝機能異常、貧血、低栄養、performance status (PS) 低下などの全身状態の悪化を呈する症候群である。膵癌患者では悪液質を高頻度に認めるため、抗癌治療の実施および継続が困難になることが多い。膵癌では腫瘍進展様式の一つとして神経浸潤が知られており、悪液質に関わることが示唆されている。また、癌の神経浸潤などによる末梢神経損傷は脊髄におけるグリア細胞の活性化を惹起し、その神経支配領域で痛覚過敏などの神経症状を誘発するとされる。脊髄グリア細胞の活性化は、遠心性の神経を介して支配する臓器の代謝に影響することが考えられることから、膵癌が神経浸潤すると脊髄グリア細胞を活性化させ、悪液質を誘導する可能性がある。

《目 的》

本研究は膵癌患者、膵癌剖検例、動物モデルを用いて、1)膵癌の神経浸潤の生体に及ぼす影響を悪疫質という観点から検討するとともに、2)脊髄グリア細胞の活性化が神経浸潤由来の悪液質に関わるかどうかを検討した。

《対象・方法》

1) 膵癌患者の臨床データを用いた検討

- ・2008年6月から2009年11月の間に国立がんセンター東病院で組織学的検討を含めて進行性膵癌と診断された、過去に手術を含めた抗癌治療を受けたことのない患者のうち、化学療法が施行されて3ヵ月後まで経過のおえた50例を対象とした。
- ・内訳は男21人、女29人。平均年齢は66.5歳(44-85歳)。膵頭部癌が22例、膵体部癌が23例、尾部癌が5例であった。体組成、血液検査、CTを化学療法開始前に評価した。
- ・50人の患者をCT画像における腫瘍から連続する上腸間膜動脈周囲の脂肪濃度の程度によって高度神経叢浸潤群(high N-inv 群)と低度神経叢浸潤群(low N-inv 群)に分けた。体組成、血液検査を2群間で比較した。

2) 剖検検体を用いた検討

- ・2006年に国立がんセンター東病院にて死亡し、組織学的に膵臓癌であると確認された4例を対象とした。
- ・組織学的(H&E染色)に膵外神経叢浸潤の有無を確認した(あり:2例、なし:2例)。
- ・死亡2ヶ月以内に撮影したCT画像において、組織学的な膵外神経叢浸潤と上腸間膜動脈周囲の血管周囲脂肪組織(PVST)の程度との相関を検討した。
- ・組織学的な膵外神経叢浸潤の有無と脊髄グリア細胞の形態変化を検討した。

3) マウスモデルを用いた検討

- ・雄性SCIDマウスの左坐骨神経に 2.5×10^4 個のCapan-1細胞(ヒト膵癌細胞株)を直接注入し、神経浸潤モデルを作製した(N-inv 群、n=8)。坐骨神経にPBSを注入したPBS

群(n=4)、左臀部に同量の Capan-1 細胞を皮下接種して皮下腫瘍群(SC 群、n=8)を作製し、コントロールとした。

- Capan-1 あるいは PBS を注入した部位よりも中枢側の坐骨神経を 3-0 絹糸で強く結紮し、N-inv + ligation 群(n=5)、PBS + ligation 群(n=3)を作製した。対照として N-inv 群(n=5)、PBS 群(n=3)を作製した。
- サイクリック AMP 分解を阻害することでグリア細胞内のシグナル伝達を抑制するプロペントフィリン (PPF 群、n=3)を N-inv 群に神経浸潤作製 3 日前から屠殺日まで 10mg/kg 連日腹腔内投与を行い、これをグリア細胞活動性抑制群とした。対照として生食 (Saline 群、n=3)を同様に投与した群を作製した。
- いずれも N-inv 作製から 6 週目に屠殺した。
- 体重、食事摂取量を 1 週間ごとに測定した。
- 屠殺時に精巣上体脂肪組織、大胸筋、腫瘍重量を測定した。
- 精巣上体脂肪組織の H&E 染色を行い、脂肪細胞径を測定した。
- アストロサイトのマーカーとして glial fibrillary acidic protein (GFAP) とミクログリアのマーカーとして ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) を第 13 胸髄 (Th13) に免疫染色(+Luxol Fast Blue (LFB) 染色)を行い、マーカー陽性細胞の形態学的検討および陽性細胞面積率の定量により、グリア細胞形態変化を評価した。

《結 果》

- 1) 高度神経叢浸潤群は低度神経叢浸潤群に比して、体重、BMI は高度神経叢浸潤群で低値であり、CRP は高値をとる傾向にあった。
- 2) 剖検検体の脊髄において、アストロサイトのマーカーである GFAP とミクログリアのマーカーである Iba1 を、免疫染色を定量化することで比較すると、腓外神経叢浸潤あり群 (n=2) では、腓外神経叢浸潤なし群 (n=2) より高値をとる傾向にあった。
- 3) マウスの坐骨神経に腓癌細胞株を注射して神経浸潤モデルを作製した。このモデルは対照マウスに比べて食事摂取量は変わらないものの有意に体重が減少し、脊髄でグリア細

胞の形態変化は有意に高度であった。次に、癌の神経浸潤が中枢方向（脊髄）へ刺激を送ることが悪液質を促進させると仮説をたて、それを遮断するため、癌細胞の打ち込み部より中枢側の坐骨神経を 3-0 絹糸で結紮する実験を行った。体重減少と脊髄アストロサイトの増殖（グリオシス）は結紮により抑制された。これより、癌部と中枢側の脊髄との交通が悪液質に重要であることが示唆された。最後に、脊髄グリア細胞の抑制が悪液質に寄与していることを確かめるため、脊髄グリア細胞を抑制することが知られているプロペントフィリン（PPF）を投与する実験を行った。PPF に投与によってグリア細胞を抑制した群では体重減少が抑制された。

《考 察》

剖検検体、膵癌患者の臨床データを用いた検討から、膵癌患者において癌が腹腔内神経叢に浸潤すると、脊髄グリア細胞の形態変化がおこり、より悪液質を呈する傾向にあることが示唆された。膵癌細胞株を用いた神経浸潤マウスモデルは、食事摂取量に差はないものの体重が減少するという実験的悪液質の定義を満たした成績が得られたことより、神経浸潤による悪液質を検証するモデルとして妥当であると考えられた。このモデルを用いて行った坐骨神経結紮実験からは、癌の神経浸潤部と脊髄との交通が、脊髄のグリオシス抑制実験からは、脊髄のグリオシスが、それぞれ悪液質に影響を与えている可能性が示唆された。以上より、膵癌の神経浸潤は悪液質を誘導し、脊髄グリア細胞の形態変化と活動性がその一部に関与していることが、膵癌患者、動物モデルでの検討で示された。本研究は今後の悪液質の病態の解明と、将来的な悪液質治療の開発に寄与すると思われる。

《結 論》

膵癌が神経浸潤すると悪液質が誘導され、これには脊髄グリア細胞を介した神経経路が関与している可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

致死率の高い腫瘍性疾患である膵癌の予後改善のためには有効な抗癌剤治療が欠かせないが、その実施や継続には積極的な病状のコントロールが必要である。しかし、高頻度に悪液質を呈する進行膵癌患者の病状改善に有効な治療は存在せず、今なお重要な研究課題となっている。本論文では膵癌患者の悪液質を、神経浸潤という視点から検討し、膵癌患者検体、および動物モデルを用いて膵癌の神経浸潤と悪液質との因果関係を立証している。また、神経浸潤による悪液質に、神経浸潤部と脊髄との交通が関与している可能性を報告している。申請者はさらに脊髄におけるグリア細胞に着目し、脊髄のグリオシスを抑制するプロペントフィリンの投与実験により、神経浸潤による悪液質の一部に脊髄グリア細胞が関与する可能性についても述べている。膵癌の神経浸潤と悪液質とに関しては既報にて関連が示唆されていたが、これに神経経路であるグリア細胞の形態変化や細胞内シグナル伝達抑制が関与するという報告はこれまでになく、本論文に新規な点であり、非常に独創的である。申請者らの注目した、膵癌の神経浸潤における脊髄のグリア細胞を介した悪液質はほとんど検討されていない分野であり、このメカニズムの解明は、将来的な癌の悪液質の病態の解明と治療に大きく寄与するものと考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

International Journal of Cancer 131(12): 2795-2807, 2012