

学位論文題名

血小板凝集抑制剤による実験的術後肺転移の抑制

学位論文内容の要旨

I 研究目的

腫瘍の転移形成過程において、血小板を中心とした血液凝固系は腫瘍の着床および血栓形成に重要な役割を果たしている。血中の癌細胞が血小板の凝集を促し、癌細胞-血小板凝集塊による腫瘍塞栓の形成を容易にすることにより、標的臓器内皮細胞への着床を有利に導くと考えられている。このような見地から、各種血小板凝集抑制剤の転移抑制効果の検討が行われてきたが、必ずしも良好な結果が得られてはいない。これは腫瘍細胞の種類によって血小板凝集誘導機序が異なること、血小板凝集抑制剤の作用機序が多様であることなどに起因していると考えられる。本研究ではこの点を明確にするため血小板の c - AMP phosphodiesterase 阻害により血小板凝集抑制作用を有するイミダゾキナゾリン誘導体である、DN-9693の肺転移抑制効果について、ラット肝癌細胞 KDH-8 を用いて、投与時期、Cyclophosphamide との併用効果および薬剤の作用機序について検討を加えた。

II 材料と方法

1) WKA ラット（体重約200 g）に DAB（4 - dimethylaminoazobenzene）を投与して誘発した肝癌細胞 KDH-8 を用いた。この細胞は腹水系で維持されており、 10^5 個の皮下移植によって宿主ラットを50日前後で腫瘍死させる。血小板凝集抑制剤（DN-9693）は $150 \mu\text{g}$ を一日2回腹腔内投与とした。

2) KDH-8 細胞、 10^5 個を WKA ラットの背部皮下に移植し20日後に外科切除を行った。切除の20日後にラットを犠牲死させ、切除前投与（I群）、切除前後投与（II群）、切除後投与（III群）、非投与（IV群）の4群に分けて肺重量および肺転移数を比較検討した。

3) KDH-8 細胞を尾静脈から接種することにより人工的肺転移を作成したラットに、当日から DN-9693を7日間腹腔内投与し、非投与群と肺重量、肺転移数を比較検討した。

4) 前述の実験系を用い、DN-9693投与と併用して、Cyclophosphamide (CY) 8 mg (40

mg/kg)を皮下投与し、CY 単独投与群 (A群)、DN-9693単独投与群 (B群)、CY+DN-9693 投与群 (C群)、非投与群 (D群)の4群において、外科切除後の生存期間の観察を行った。

5) 正常 WKA ラットに DN-9693 300 μ g を腹腔内投与し、血漿 TXB₂、6-keto-PGF_{1 α} の経時的变化を、投与1, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 48, 72時間後に測定した。

6) WKA ラットより採取した血液から多血小板浮遊液 (PRP) を $4 \times 10^8/ml$ に調整し、PRP450 μ l に腫瘍細胞浮遊液50 μ l を添加しアグリゴメーターを用いて KDH-8 細胞の血小板凝集を測定した。

7) KDH-8 細胞の血小板凝集に対する ADP 阻害剤 (アピラーゼ、クレアチンリン酸、クレアチンリン酸キナーゼ)、トロンビン阻害剤 (ヘパリン、MD-805)、および DN-9693の抑制効果を検討した。

8) KDH-8 細胞の皮下移植に対する DN-9693の連日投与と KDH-8 細胞の培養液中での ³H-thymidine の取り込み試験により、DN-9693の直接作用を検討した。

III 結 果

II群、III群はIV群に比較し、有意に肺転移数、肺重量の減少を示した。しかし I 群ではIV群との差異は認められなかった。人工的肺転移の場合にも、DN-9693投与により肺転移数の減少が観察された。また、C群はA群、B群と比較し、術後50日で有意の生存率の向上が認められた。術後腫瘍死までの平均生存期間はB群がD群に比較して有意の延長が観察された。6-keto-PGF_{1 α} はDN-9693投与後、2時間から12時間で高値を示し、18時間後は漸減した。

TXB₂は投与後2時間から12時間で急峻な一過性の上昇を見たが、18時間以後は漸減した。

KDH-8 細胞はクエン酸加 PRP に対しては解離型の血小板凝集を誘導した。カルシウムを添加した場合には解離型凝集の後に非解離型の凝集が認められる、二相性のパターンが示された。これらの血小板凝集は ADP 阻害剤とトロンビン阻害剤の両方で抑制された。また DN-9693は KDH-8 細胞が誘導する解離型、非解離型凝集を用量依存的に抑制した。一方、DN-9693の KDH-8 細胞に対する直接作用は *in vivo* でも *in vitro* でも認められなかった。

IV 考 察

DN-9693の切除後投与群では著明な肺転移抑制効果が認められたが、切除前投与群では肺転移抑制効果は認められなかった。癌転移に関与する凝固線溶系の作用は転移の各ステップにおいて亢進は腫瘍血栓を形成する場では転移促進に働くが、原発巣ではむしろ腫瘍細胞の増殖、離脱

を抑える。したがって切除前における血小板凝集抑制剤の投与は、原発巣における癌細胞の遊離を促進する結果となり、これが肺転移抑制効果を示し得なかった要因と考えられた。腫瘍細胞の静脈内接種による人工的肺転移のモデルでは、血小板凝集抑制剤の原発巣への影響を無視することができる。この系での肺転移抑制効果が観察されたことは、薬剤が着床段階で働いていることを示唆していた。血小板凝集抑制剤によって着床が抑えられ、腫瘍細胞が血中に遊離した状態であれば、CYのような化学療法剤による殺細胞効果が期待できる。DN-9693の血小板凝集抑制作用がc-AMP phosphodiesterase 阻害効果によることから、本薬剤が細胞膜のc-AMP濃度を増加させる、という薬理学的特性によるものと考えられた。また本薬剤の肺転移抑制効果はプロスタグランジン代謝とは直接関係がない可能性が強い。KDH-8細胞が誘導した血小板凝集はADP阻害剤とトロンビン阻害剤の両方で抑制された。このことから、KDH-8細胞はADP介在性凝集とトロンビン介在性凝集という2種類の血小板凝集機序を有していることかわかり、DN-9693はそのいずれに対しても抑制効果を示した。

癌治療の主体は依然として外科手術と抗癌剤である。手術は腫瘍量の減少という利点を有する反面、血行転移の促進という危険性も孕んでいる。本研究で行った血小板凝集抑制剤による転移の抑制は、従来の抗癌化学療法という癌治療とは一線を異にする治療法であり、今後、癌の外科手術への応用が期待できると考えられる。

V 結 論

- 1) 血小板凝集抑制剤、DN-9693は腫瘍切除後投与において、術後肺転移を有意に抑制した。
- 2) 腫瘍細胞の静脈内接種による人工的肺転移においても、DN-9693投与によって肺転移数の減少が観察された。
- 3) DN-9693と Cyclophosphamide の併用によって、術後生存率の有意の向上が認められた。
- 4) DN-9693の KDH-8細胞に対する直接的な抗腫瘍効果は認められず、その作用機序は、KDH-8細胞が誘導するトロンビン介在性凝集およびADP介在性凝集の阻害によるものであった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 邊 達 三

副 査 教 授 細 川 真 澄 男

副 査 教 授 小 山 富 康

血小板凝集抑制による肺転移抑制を検討するため、血小板凝集抑制剤 DN-9693を投与して術後肺転移抑制効果について、ラット肝癌細胞 KDH-8 を用いて、投与時期、Cyclophosphamide との併用効果および薬剤の作用機序について検討を加えた。

材料及び方法

1) WKA ラット (体重約200 g) に DAB (4 - dimethylaminoazobenzen) を投与して誘発した肝癌細胞 KDH-8 を用いた。この細胞は腹水系で維持されており、 10^5 個の皮下移植によって宿主ラットを50日前後で腫瘍死させる。血小板凝集抑制剤 (DN-9693) は $150 \mu\text{g}$ を一日2回腹腔内投与とした。

2) KDH-8 細胞、 10^5 個を WKA ラットの背部皮下に移植し20日後に外科切除を行った。切除の20日後にラットを犠牲死させ、切除前投与 (I 群)、切除前後投与 (II 群)、切除後投与 (III 群)、非投与 (IV 群) の4群に分けて肺重量および肺転移数を比較検討した。

3) KDH-8 細胞が尾静脈から接種することにより人工的肺転移を作成したラットに、当日から DN-9693 を7日間腹腔投与し、非投与群と肺重量、肺転移数を比較検討した。

4) 2) の実験系を用い、DN-9693 投与と併用して、Cyclophosphamide (CY) $8 \text{ mg} (40 \text{ mg/kg})$ を皮下投与し、CY 単独投与群 (A 群)、DN-9693 単独投与群 (B 群)、CY + DN-9693 投与群 (C 群)、非投与群 (D 群) の4群において、外科切除後の生存期間の観察を行った。

5) 正常 WKA ラットに DN-9693 $300 \mu\text{g}$ を腹腔内投与し、血漿 TXB_2 、6 - keto - $\text{PGF}_{1\alpha}$ の経時的变化を、投与1, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 48, 72時間後に測定した。

6) WKA ラットより採取した血液から多血小板浮遊液 (PRP) を $4 \times 10^8 / \text{ml}$ に調整し、PRP $450 \mu\text{l}$ に腫瘍細胞浮遊液 $50 \mu\text{l}$ を添加しアグリゴメーターを用いて KDH-8 の血小板凝集を測定した。

7) KDH-8 の血小板凝集に対する ADP 阻害剤 (アピラーゼ、クレアチンリン酸、クレアチンリン酸キナーゼ)、トロンビン阻害剤 (ヘパリン、MD-805)、および DN-9693 の抑制効果を検討した。

8) KDH-8細胞の皮下移植に対する DN-9693の連日投与と KDH-8細胞の培養液中での³H-thymidineの取り込み試験により、DN-9693の直接作用を検討した。

結 果

II群、III群はIV群に比較し、有意の肺転移数、肺重量の減少を示した。しかしI群ではIV群との差異を認められなかった。人工的肺転移の場合には、DN-9693投与により肺転移数の減少が観察された。また、C群はA群、B群と比較し、術後50日で有意の生存率の向上が認められた。術後腫瘍死までの平均生存期間はB群がD群に比較して有意の延長が観察された。6-ke-to-PGF₁はDN-9693投与後2時間から12時間で高値を示し、18時間後は漸減した。TXB₂は投与後2時間から12時間で急峻な一過性を上昇を見たが、18時間以後は漸減した。

KDH-8細胞はクエン酸加PRPに対しては解離型の血小板凝集を誘導した。カルシウムを添加した場合には解離型凝集の後に非解離型の凝集が認められる。二相性のパターンが示された。これらの血小板凝集はADP阻害剤とトロンビン阻害剤の両方で抑制された。またDN-9693はKDH-8細胞が誘導する解離型、非解離型凝集を用量依存的に抑制した。一方、DN-9693はKDH-8細胞に対する直接作用はin vivoでもin vitroでも認められなかった。以上から本薬剤の肺転移抑制効果はKDH-8細胞が誘導する血小板凝集を抑制した結果であると考えられた。

口頭発表において細川教授よりDN-9693切除前投与群(I群)とCY単独投与群(A群)における結果をどのように解釈するかについて、また小山教授より癌細胞-血小板凝集塊の形成過程についての質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をなした。また両教授には個別に審査を頂き合格と判定された。

本研究は血小板凝集剤DN-9693の術後肺転移抑制効果を明らかにするとともに、その作用機序も詳細に解析したものであり、学位の授与に値するものとする。