

氏 名 ( 本 籍 )	い 市	か 川	つ 恒	じ 次
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	医 博 第	7 4 0	号	
学 位 授 与 年 月 日	昭 和	4 7 年	3 月	2 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当			
研 究 科 専 門 課 程	東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科 ( 博 士 課 程 ) 病 理 学 系 専 攻			
学 位 論 文 題 目	脂 肪 酸 の 腹 水 癌 細 胞 へ の 移 送 と 細 胞 内 代 謝 に 関 する 実 験 的 研 究			

( 主 査 )

論 文 審 査 委 員 教 授 齊 藤 達 雄 教 授 佐 藤 春 郎

教 授 立 木 蔚

# 論文内容要旨

## 1 緒言

癌細胞における脂質代謝の異常の一つとして脂肪酸の *de novo* 合成障害が指摘されているが、癌細胞には多くの脂肪酸が存在し、特に癌細胞自身合成し得ない *Linoleic acid* が存在しているので、癌細胞脂質の一部は宿主から供給されていることは明らかである。脂肪酸は細胞の内発呼吸の基質として、また細胞機能の発現に必要な各種脂質構成成分として重要な物質であるので、その癌細胞への移送及び細胞内代謝の状態を理解することは重要な課題である。この観点から著者は *Ehrlich* 腹水癌細胞及び  $MM_2$  腹水癌細胞を用いて、*palmitic acid-1-<sup>14</sup>C* の癌細胞への移送及びその細胞内代謝を検討した。

## 2 実験材料及び方法

i) 移植後10日目の *Ehrlich* 腹水癌細胞、 $MM_2$  腹水癌細胞を  $\bar{v}$  (*Palmitic acid* と *albumin* の分子比) = 5, 2.5, 1.66, 1.25 に調整した *Palmitic acid-1-<sup>14</sup>C-bovine serum albumin* を含む *medium* 中で *incubate* し、各癌細胞の遊離脂肪酸 (FFA) 量及び細胞内各脂質分画の放射活性を時間的に追求すると共に呼出  $^{14}CO_2$  量を測定して、癌細胞の標識脂肪酸のとり込み、細胞内代謝を検討した。ii) 移植後12日目の *Ehrlich* 腹水癌 dd 雄性マウス、 $MM_2$  腹水癌  $C_3H$  雄性マウス (腹水約 10 ml 貯溜) の腹腔内に  $\bar{v} = 4$  に調整した *Palmitic acid-1-<sup>14</sup>C-albumin* 液 0.25 ml (*Palmitic acid-1-<sup>14</sup>C* の 454963 dpm) を一回注入し、1, 3, 5, 10 分後に腹水 1 ml ずつ採取し、腹水中の標識脂肪酸の *turn over*、癌細胞へのとり込み、細胞内各脂質分画の標識脂肪酸の分布を検討した。細胞放射活性は液体シンチレーションカウンター (Aloka LSC-601) で測定した。脂質の抽出は *Folch* 法に従い、脂質の分画は薄層クロマトグラフィーで行なった。Spot の検出は 2'-7'-*dichlorofluorescein* と  $I_2$  蒸気の併用で発色させ、またマクロオートラジオグラフィーにより放射活性を確認した。各脂質の放射活性は各 spot をかきとり 4% - *Cab-O-Sil* の *toluene* 系シンチレーターで測定した。

## 3 実験結果及び考按

i) *Incubation* 1分後と60分後における癌細胞中の総放射活性は両腫瘍株とも  $\bar{v} = 5$  で最も高かった。 $\bar{v} = 5$  における1分間の細胞内総放射活性は *Ehrlich* 腹水癌細胞では60分におけるその7.41%で、 $MM_2$  腹水癌細胞では2.62%であった。その他の  $\bar{v}$  においては *Ehrlich* 腹水癌細胞で30%台、 $MM_2$  腹水癌細胞で20%以下であった。*Incubation* 45秒、60秒における両癌細胞内 FFA の増加、細胞内総放射活性の増加から癌細胞では *medium* 中の FFA を *inco-*

incorporate することがわかった。in vitroの条件では癌細胞のmedium中FFAのとり込みはFFAに結合するalbumin量に左右されるが、本実験条件ではとり込みの量及び時間的経過は腫瘍株によってかなり異なるものようである。Incubation 60分間に呼出された $^{14}\text{CO}_2$ 量は $\bar{v}=5$ においてEhrlich腹水癌細胞ではとり込まれたPalmitic acid- $1-^{14}\text{C}$ の13%、 $\text{MM}_2$ 腹水腫瘍細胞では50%であり、各 $\bar{v}$ 値における呼出 $^{14}\text{CO}_2$ を検討した結果 $^{14}\text{CO}_2$ の呼出量は必ずしもFFAの摂取量とは関係ないことが認められた。このことはFFAのとり込みが少ない $\text{MM}_2$ 腹水癌細胞でも内発呼吸の基質として、摂取されたFFAがかなり利用されていることを示すものである。Incubation 60分後における細胞内各脂質分画の放射活性をみると、 $\bar{v}=5$ においてEhrlich腹水癌細胞では全量の57.4%がTriglyceride+Cholesterol esterに、29.9%がPhospholipidに、10.9%がmono-diglycerideに、1.4%がFFAに見いだされ、 $\text{MM}_2$ 腹水癌細胞では夫々32.8%、47.9%、11.1%、7%であった。ii) マウス腹腔内に注入された標識脂肪酸の腹水中の動態をみると、両者とも標識脂肪酸は注入1分後すでに半減し10分後においてはEhrlich腹水癌マウスでInitial concentrationの13.6%、 $\text{MM}_2$ 腹水癌マウスで8.9%に減少した。この系を一次反応とすると、Ehrlich腹水癌マウスでの半減期は0.8分、turn overは $5.67 \times 10^4$  dpm/min、 $\text{MM}_2$ 腹水癌マウスの半減期は0.9分、turn overは $5.04 \times 10^4$  dpm/minであった。注入された標識脂肪酸の腫瘍細胞へのとり込みをみると、Ehrlich腹水癌細胞では最初の1分間で36.8%、3分間で約60%であったが、それ以後のとり込みは比較的緩徐であった。 $\text{MM}_2$ 腹水癌細胞でもほぼ同様な結果が得られた。標識脂肪酸を注入後の細胞内各脂質分画における放射活性分布の推移をみると、Ehrlich腹水癌細胞、 $\text{MM}_2$ 腹水癌細胞とも注入1分後、FFA分画では夫々42.4%、47.3%を示し、3分後に7.3%、9.0%に減じ、10分後には5.3%、3.2%となった。リン脂質分画では1分後夫々30.2%、32.7%であったが、次第に増加し、10分後には夫々57.0%、65.8%に達した。Triglyceride+Cholesterol ester分画も夫々11.1%、6.8%から次第に増加し、10分後には34.5%、25.9%となった。mono-diglyceride分画では1分後夫々16.0%、12.8%であったが時間と共に減少した。これらの成績から腹水癌細胞への脂質の移送には腹水中のFFAにその役割を与えることが出来ると考えられる。細胞内にとり込まれたFFAはすみやかに代謝され、Phospholipid, Triglyceride+Cholesterol esterに組み入れられ、細胞内脂質を構成し、細胞内構成成分として、その構築と種々の細胞機能に参与するものと思われる。

#### 4 結 語

脂肪酸の癌細胞への移送と細胞内代謝を検討するため、Ehrlich腫瘍細胞及び $\text{MM}_2$ 腫瘍細胞を用いて実験を行ない、次の結果を得た。即ち1) 標識FFAの癌細胞への移送はIncubation 1分間で60分間の夫々74.1%、26.2%にみられ、 $\bar{v}=5$ において最大であった。2) マウス腹腔内に投与された標識FFAの腹水中でのturn overは両腫瘍系とも極めて早く、担癌体腹水中のFFAは宿主から癌細胞への脂質移送の役割を果たしていると考えられた。3) 腹水から癌細胞に移送されたFFAはすみやかに代謝を受け、他の脂質、特にリン脂質に組み込まれ、一部は内発呼吸の基質として利用されると考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

癌細胞の物質代謝の一つである脂質代謝は重要な問題であるが、殊に最近、癌細胞における遊離脂肪酸利用について注目が向けられている。本来、血中の遊離脂肪酸は、細胞、組織に必要な脂質の供給に関与するものとして重視されてきたが、癌細胞における脂質代謝異常の一つとして、脂肪酸の *de novo* 合成障害が指摘されている反面、癌細胞には多くの脂肪酸が存在し、特に癌細胞自身合成し得ないとされている *Linoleic acid* も存在するので、癌細胞内脂質の一部は、宿主から供給されていることが明らかである。従つて、その癌細胞への移送及び細胞内代謝を究明することは、極めて重要な課題と考えられる。

このような観点にたつて、著者は、Ehrlich 腹水癌細胞及び  $MM_2$  腹水癌細胞の 2 系を用い、*Palmitic acid-1- $^{14}C$*  の、癌細胞への移送及び細胞内代謝を検討した。

すなわち、まず *in vitro* の実験として、移植後 10 日目の上述の両癌細胞を、 $\bar{v}$  すなわち、*Palmitic acid* と *Albumin* の分子比が、5, 2.5, 1.66 および 1.25 に調整した *Palmitic acid-1- $^{14}C$ -bovine serum albumin* を含む *medium* 中で *incubate* し、各癌細胞の遊離脂肪酸量及び細胞内各脂質分劃の放射活性を時間的に追求すると共に、呼出  $^{14}CO_2$  量を測定して、癌細胞の標識脂肪酸のとりこみ及び細胞内代謝を検討した。

次に *in vivo* の実験として、両系の担癌マウス腹腔内に、*Palmitate-1- $^{14}C$*  ( $\bar{v}=4$ ) を注入し、 $^{14}C$  放射活性の腹水からの消失状態、細胞内総放射活性、ならびに細胞内各脂質分劃における放射活性の分布を検討した。

その結果として、標識遊離脂肪酸の癌細胞への移送は、*Incubation* 1 分間で、6.0 分間の夫々 7.41%, 26.2% に認められ、 $\bar{v}=5$  において最大であつたこと、マウス腹腔内に投与された標識遊離脂肪酸の腹水中での *turn over* は、両腫瘍系とも極めて早く、担癌体腹水中の遊離脂肪酸は、宿主から癌細胞への脂質移送の役割を果していると考えられたこと、及び腹水から癌細胞に移送された遊離脂肪酸は、すみやかに代謝を受け、他の脂質、特にリン脂質に組み込まれ、一部は、ある条件下において内発呼吸の基質として利用されることなどを推定している。なお、Ehrlich 癌細胞と  $MM_2$  癌細胞の両腫瘍系の比較では、前者において、遊離脂肪酸の細胞内取り込みが、より活発であつたが、細胞内代謝速度は、両系ともほぼ同一速度であつたことを述べている。

以上のことから、本論文は、遊離脂肪酸の癌細胞への移送と細胞内代謝に関して研究を行い、癌細胞の脂質代謝解明に寄与するところが大きく、学位授与に値するものと認める。