

原 著

外科的に皮下移植された Lewis 肺癌の増大および 肺転移にシメチジンが及ぼす影響

菅 理晴^{1,2)} 森田理一郎¹⁾ 金子 公一¹⁾ 許 俊鋭¹⁾

要旨: Lewis 肺癌肺転移モデルを用い、経口シメチジンが皮下移植した腫瘍の増大および肺転移に及ぼす影響を検討した。以下の3群を設定し、Lewis 肺癌小切片を C 57 BL/6 マウスの皮下へ移植した。CO 群: 無処置コントロール, LD 群: シメチジン 0.1 mg/ml を移植 1 週間前より飲水投与, HD 群: シメチジン 1 mg/ml を移植 1 週間前より飲水投与。移植後 4 週目の皮下腫瘍血管密度(/mm²)は CO: 56 ± 24, LD: 88 ± 16, HD: 123 ± 17 で各群間に有意差を認めた (p < 0.05)。移植後 6 週目の皮下腫瘍重量(g)は CO: 6.0 ± 2.1, LD: 7.9 ± 1.2, HD: 10.0 ± 1.9, 肺転移個数は CO: 7.5 ± 6.0, LD: 17.0 ± 3.0, HD: 19.8 ± 7.4 で共に CO/HD 間に有意差を認めた (p < 0.05)。本モデルの条件下では、シメチジンは皮下移植された Lewis 肺癌の血管密度を増大させ腫瘍の成長や肺転移を促進すると考えられた。

キーワード: シメチジン, Lewis 肺癌, 移植, 血管新生, 肺転移

Cimetidine, Lewis lung cancer, Transplantation, Angiogenesis, Lung metastasis

緒 言

ヒスタミンは H1 受容体を介して血管拡張, 血管透過性亢進, 平滑筋収縮などを誘導し I 型アレルギー反応を引き起こす重要な因子であり, また胃壁細胞に対しては H2 受容体を介して胃酸分泌を促進させる。シメチジンはヒスタミンの構造類似体で, H2 受容体を競合的に阻害することにより胃酸分泌を抑制し, 抗潰瘍薬として広く使用されている。近年ヒスタミンの H2 受容体を介した作用には胃酸分泌促進だけでなく種々の免疫調節作用のあることがわかってきたが, シメチジンはこれらの作用に対しても拮抗的に働くと考えられる¹⁾。

シメチジンの癌に対する作用に関しては, 1979 年に Armitage らが胃腸症状に対してシメチジンを投与された気管支癌患者で特別な抗癌治療を行わなかったにもかかわらず腫瘍径の縮小を認めたと報告したのが最初である²⁾。その後, 大腸癌, 胃癌, 腎細胞癌, 悪性黒色腫などにおいてシメチジンの抗腫瘍効果や生存期間の延長が相次いで発表された³⁾⁻⁶⁾。癌免疫調節機構に関する研究では, シメチジンによる NK 細胞活性亢進, IL-2, IL-12 産生亢進などが指摘されている⁷⁾⁻⁹⁾。またヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に対しては E-selectin の発現

を阻害し大腸癌株化細胞 HT-29 の HUVEC への接着を抑制することが示された¹⁰⁾。しかしながら, シメチジンに抗腫瘍効果を認めなかったとする報告や, 逆にシメチジンの内服が腫瘍の発生, 成長および転移を促進したとする Barna らや Caignard らの報告もあり, シメチジンの癌細胞や癌免疫に対する作用は依然 controversial であると言える¹¹⁾⁻¹⁴⁾。

筑波大学の船越らは Lewis 肺癌株化細胞浮遊液を皮下注射した C 57 BL/6 マウスに発生した肺転移巣を同系マウスの皮下へ移植し, その後移植マウスに発生した肺転移巣を別の同系マウスに皮下移植するという継代操作を 10 代以上繰り返すことで, 確実に移植後一定期間で肺転移を生じる肺癌肺転移モデルを作製した¹⁵⁾。

今回我々はこのモデルを用いて, マウスに経口投与したシメチジンが皮下に移植された Lewis 肺癌の成長および肺転移に及ぼす影響を検討した。

対象と方法

1. 動物および試薬: 6~8 週齢の雄性 C 57 BL/6 マウス (体重 20~25 グラム, 日本クレア社) を使用した。シメチジンは注射剤 (200 mg/ml, スミスクラインピーチャム製薬株式会社) を蒸留水で希釈して使用した。

2. Lewis 肺癌移植切片: 雄性 C 57 BL/6 マウス (Lewis 肺癌肺転移巣の背部皮下への同系移植を繰り返すことで作成した肺癌肺転移モデル, 筑波大学臨床医学系外科塚塚正孝氏らより提供) の背部皮下 Lewis 肺癌腫瘍巣を摘出し, 15 mg の立方体切片を 30 個作成した。

〒350 0451 埼玉県入間郡毛呂山町大字毛呂本郷 38

¹⁾ 埼玉医科大学心臓血管外科呼吸器外科

〒565 8565 大阪府吹田市藤白台 5 7 1

²⁾ 現: 国立循環器病センター研究所再生医療部

(受付日平成 15 年 1 月 6 日)

3. 移植手術: マウス腹腔内へペントバルビタール 1 mg を注射し伏臥位とした。背部皮膚を 70% エタノールで消毒後に長さ 5 mm の皮膚切開を置き, そこから鈍的に皮下ポケットを作成した。Lewis 肺癌移植片を皮下ポケット内へ挿入し皮膚を 4-0 ポリグラクチン系 (エチコン社) で縫合閉鎖した。

4. マウス飲水量の計測: 各ケージ 5~6 匹のマウスを飼育し, ケージ毎のマウス飲水量を 2~3 日毎に計測した。尚, 給水には液漏れのないボール付給水口を持った給水瓶を使用した。

5. 実験群: 以下の 3 群 (各群 N=10) を設定した。CO 群: 無処置コントロール。LD 群: 0.1 mg/ml のシメチジンを飲水投与した。HD 群: 1 mg/ml のシメチジンを飲水投与した。処置群では Lewis 肺癌の移植 1 週間前よりシメチジンの投与を開始した。移植後 4 週目に各群 5 匹ずつを, また 6 週目に生存するマウスを全例犠牲死させ, 皮下の移植腫瘍重量および肺転移数を計測した。

6. Factor VIII 免疫組織染色および血管密度計測: ホルマリン固定した皮下腫瘍をパラフィン包埋した後, 5 μ m 厚切片のスライドを作製した。切片のパラフィンを除去した後, Proteinase K (DAKO 社) で酵素処理し Protein Block Serum-Free 液 (DAKO 社) でブロッキングを行った。100 倍希釈した抗 Factor VIII rabbit 抗体 (DAKO 社) を切片に滴下し, 4 で一晩反応させた。2 次抗体は Envision rabbit 2 次抗体 (DAKO 社) を使用し, 反応時間は 1 時間とした。発色には DAB Chromogen (DAKO 社) を用い, 最後に各スライドをヘマトキシリンでカウンター染色した。尚, 陰性対照では抗 Factor VIII rabbit 抗体の代わりに 0.1% BSA 添加 PBS を滴下した。次いで, 倒立顕微鏡 (TE 300, ニコン社) と撮影装置 (デジタルカメラ DMX 1200 (ニコン社) およびソフトウェア Nikon ACT-1 Version 1.11 (ニコン社)) を用いて, 各 Factor VIII 染色切片で腫瘍表面直下の強拡 ($\times 200$) 5 視野を無作為に選択し, 撮影した像をコンピュータに取り込んだ。各視野で Factor VIII 陽性部位数を計測し, 5 視野の合計を単位面積で補正し微小血管密度 (微小血管数/ mm^2) とした。

7. 統計分析: 測定結果は平均値 \pm 標準偏差で表した。分散分析は One-way ANOVA で行い, 多重比較には Student-Newman-Keuls 検定を用いた。統計分析用ソフトウェアは SigmaStat version 1.0 (Jandel Scientific 社, 米国) を使用し, $P < 0.05$ をもって有意とした。

結 果

1. マウスの飲水量およびシメチジン摂取量: マウスを 5~6 匹入れた 3 つのケージで飲水量を 1 週間計測し

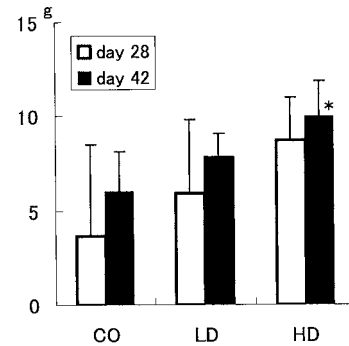


Fig. 1 Weights of subcutaneous tumors in each group on days 28 and 42. Values are expressed as mean \pm SD. *: $P < 0.05$ vs. CO (day 42)

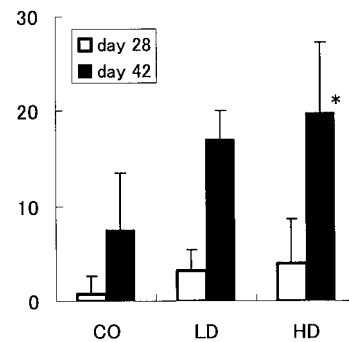


Fig. 2 Numbers of lung metastatic tumors in each group on days 28 and 42. Values are expressed as mean \pm SD. *: $P < 0.05$ vs. CO (day 42)

たところ, ケージ毎のマウス 1 匹当たりの一日飲水量は 3.89 ml, 4.46 ml, 3.79 ml で平均 4.04 ± 0.36 ml であった。また Lewis 肺癌皮下移植後に CO 群, LD 群, HD 群の飲水量を 3 週間計測したところ, マウス 1 匹当たりの一日飲水量は順に 3.87 ml, 4.38 ml, 4.20 ml で平均 4.15 ± 0.26 ml であった。以上より, 本実験に用いたマウスの一日飲水量は約 4 ml と考えられ, シメチジンの一日摂取量は LD 群で 0.4 mg (16 mg/kg), HD 群で 4 mg (160 mg/kg) と推定された。LD 群の摂取量は臨床において体重 50 kg の成人に投与されるシメチジン量 (800 mg/body) に相当する。Lewis 肺癌組織片を皮下移植されたマウスは移植後 4 週時には全例生存していたが, その後 6 週目までに CO 群の 1 匹と LD 群の 2 匹が死亡した。HD 群に死亡例はなかった。

2. 皮下腫瘍重量: 移植した皮下腫瘍を 4 週目または 6 週目に摘出し, 重量を測定した。4 週摘出群の平均重量は, CO 群: 3.6 ± 4.8 g に対し処置群では LD 群: 5.9 ± 3.9 g, HD 群: 8.7 ± 2.3 g と統計学的な有意差は無いものの用量依存的な増加傾向を認めたとした。6 週摘出群の平均

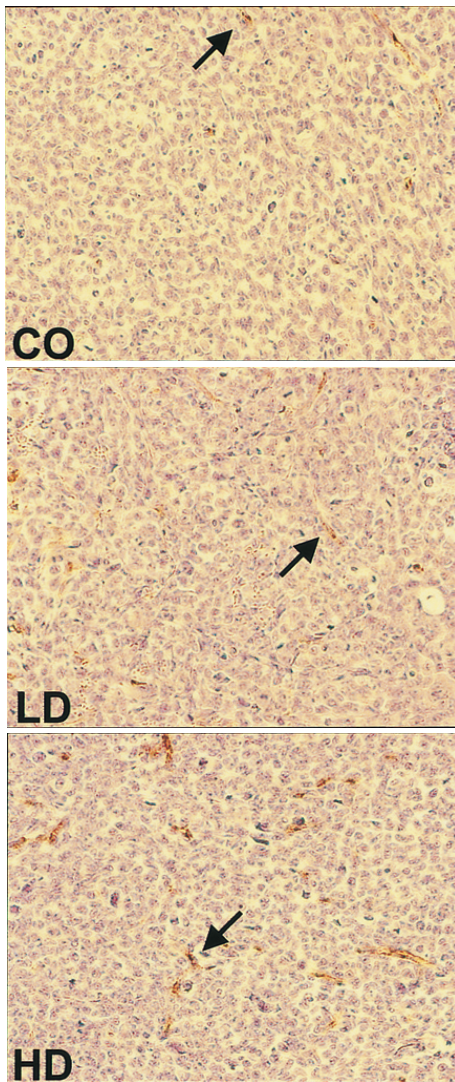


Fig.3 Photomicrographs of specimens with Factor VIII immunohistochemical staining. Arrows indicate representative microvessels that are positively stained.

重量は各群とも4週時より漸増し，CO群： 6.0 ± 2.1 g，LD群： 7.9 ± 1.2 g，HD群： 10.0 ± 1.9 gで，やはり処置群で用量依存性に増加しており，CO群/HD群間に有意差を認めた (Fig. 1)。

3. 肺転移個数：4週目で摘出した群の平均肺転移個数はCO群： 0.85 ± 1.8 個に対し，LD群： 3.2 ± 2.2 個，HD群： 4.0 ± 4.6 個であり統計学的な有意差は無いものの処置群で転移個数が多かった。6週目になると各群とも肺転移個数が著増し，CO群： 7.5 ± 6.0 個，LD群： 17.0 ± 3.0 個，HD群： 19.8 ± 7.4 個となった。4週目と同様に，対照群と比較して処置群で平均転移個数が多く，CO群/HD群間に有意差を認めた (Fig. 2)。

4. 腫瘍血管密度：4週群の皮下腫瘍の微小血管密度はCO群： 55.7 ± 23.9 ，LD群： 88.0 ± 16.3 ，HD群：

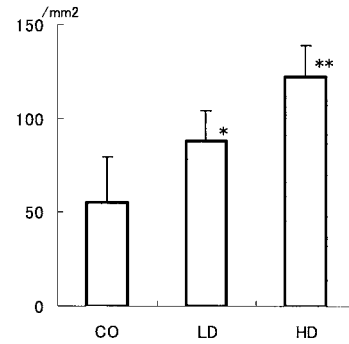


Fig.4 Vascular density of subcutaneous tumors in each group on day 28. Values are expressed as mean \pm SD. *: P < 0.05 vs. CO or HD. **: P < 0.05 vs. CO or LD.

122.6 ± 16.9 で，投与シメチジンの濃度依存的に血管密度が増加しており，各群間に有意差を認めた (Fig. 3, 4)。

5. 6週目までにCO群，LD群各2匹で腫瘍移植部に皮膚潰瘍を形成したがHD群では発生を認めなかった。

考 察

ある物質の *in vivo* での抗腫瘍効果を評価するには投与する量，経路，タイミングなどとともに腫瘍の種類や宿主側の因子を考慮した上で判断する必要がある。

今回我々はシメチジンの飲水投与を術前より開始し，同系マウスの皮下に移植したLewis肺癌への影響を検討した。この条件下で，シメチジン投与群において皮下移植されたLewis肺癌の辺縁部血管密度が用量依存的に増大するとともに，腫瘍の成長が促進し肺転移個数も増加した。腫瘍の成長や転移に影響を与える因子は多く存在するが，一般に新生血管が多く血行豊富な腫瘍組織は成長が早く血行性転移を生じる可能性も高いと考えられるため，血管密度は重要な因子の一つであると言える¹⁶⁾。シメチジンは潰瘍病変部のbFGF産生を亢進させるという報告や逆にVEGFなどの血管新生因子を抑制するという実験結果もあるが，本モデルにおいてシメチジンが直接Lewis肺癌の血管新生を刺激したのか，あるいはシメチジンに調節された因子により間接的に血管密度が増大したのか詳細なメカニズムに関しては不明であり今後の更なる検討を要する¹⁷⁾¹⁸⁾。

本研究モデルの特徴としてLewis肺癌を外科的に皮下移植していることとシメチジンを移植一週間前から経口投与していることが挙げられる。腫瘍移植の手術侵襲は比較的軽度であるため全身の影響は少なかったと考えられるが，局所においては細胞浸潤やサイトカイン産生といった炎症反応が引き起こされたはずであり，当然そこに移植されたLewis肺癌切片へも影響があったもの

と推察される．ところで，移植一週間前からシメチジンを服用していたマウスでは，移植時にヒスタミンの H₂ 受容体を介する作用が用量依存的に抑制されていたと考える．Tayama らは高用量のシメチジンを周術期に患者に投与することで，体外循環を伴う心臓手術後の好中球エラストーゼや IL-8 といった炎症性サイトカインの上昇が抑制されることを報告し，Mikawa らはシメチジンが好中球の活性酸素産生を抑制することを実験的に明らかにしているが，シメチジンのこうした作用は外科的に移植された腫瘍の生着，成長に好都合であると思われる^{19,20)}．

本研究は皮下移植した Lewis 肺癌の成長および肺転移をみており，臨床における原発性肺癌の通常の進展とは上述点を含め幾つかの点でメカニズムが異なると思われる．むしろ，外科手術などで胸腔内や手術創に播種した腫瘍の進展形式に近いかもしれない．肺転移を評価する実験系としては腫瘍細胞を静脈注射する動物モデルがしばしば利用されてきたが，腫瘍細胞が自ら血管内へ移行することで転移が始まることを考えると本モデルはより臨床に即していると言える．逆に外科侵襲の影響を伴わない系で腫瘍成長を評価するには腫瘍細胞浮遊液の皮下接種モデルや静注肺転移モデルが適していると思われる．また本モデルにおいてシメチジンを周術期のみ或いは移植後から投与しその効果を比較することもシメチジンの果たす役割を解明する上で有用と考える．

ヒスタミンの持つ免疫調節作用に関しては現在も多くの研究が行なわれており，今後更に解明が進むにつれ癌免疫の分野でもその役割が明らかになっていくと思われる．しかし，癌免疫のような生体内現象を研究する際に大切なのは，個々の癌は異なる生物学的特徴と周囲環境を持ち，癌免疫にかかわる種々の生理活性物質はその濃度や作用時間により機能が大きく変化する可能性があり，更に生体内の生理現象は常に他の物質との複雑な相互作用の上に生じることなどを理解しておくことである．ヒスタミンの癌免疫調節作用を検討した多くの研究で異なる結果が報告されているのは，このような理由が関係していると考えられる．

結 語

本研究モデルの条件下では，内服投与したシメチジンは用量依存的に皮下移植された Lewis 肺癌の血管新生を亢進し，腫瘍の成長および肺転移を促進すると考えられた．

謝辞：Lewis 肺癌肺転移モデルを提供していただいた筑波大学の鬼塚正孝先生，船越尚哉先生，畑川裕哉先生，また Factor VIII 免疫組織染色を手伝っていただいた竹田えい子氏に深謝いたします．

文 献

- 1) Valle JD, Gantz I: Novel insights into histamine H₂ receptor biology. *Am J Physiol* 1997; 273: G 987 G 996.
- 2) Armitage JO, Sidner RD: Antitumour effect of cimetidine? *Lancet* 1979; 1: 882 883.
- 3) Adams WJ, Morris DL: Short-course cimetidine and survival with colorectal cancer. *Lancet* 1994; 31: 1768 1769.
- 4) Tonnesen H, Knigge U, Bulow S, et al: Effect of cimetidine on survival after gastric cancer. *Lancet* 1988; 2: 990 992.
- 5) Kinouchi T, Saiki S, Maeda O, et al: Treatment of advanced renal cell carcinoma with a combination of human lymphoblastoid interferon- α and cimetidine. *J Urol* 1997; 130: 1064 1067.
- 6) Borgstrom S, von Eyben FE, Flodgren P, et al: Human leukocyte interferon and cimetidine for metastatic melanoma. *N Engl J Med* 1982; 307: 1080 1081.
- 7) Kikuchi Y, Oomori K, Kizawa I, et al: Augmented natural killer activity in ovarian cancer patients treated with cimetidine. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986; 22: 1037 1043.
- 8) Nakajima I, Chu TM: Synergistic antitumor activity of interleukin-2 and cimetidine against syngeneic murine tumor. *cancer Immunol Immunother* 1991; 33: 9 14.
- 9) Elenkov IJ, Webster E, Papanicolaou DA, et al: Histamine potently suppresses human IL-12 and stimulates IL-10 production via H₂ receptors. *J Immunol* 1998; 161: 2586 2593.
- 10) Kobayashi K, Matsumoto S, Morishima T, et al: Cimetidine inhibits cancer cell adhesion to endothelial cells and prevents metastasis by blocking E-selectin expression. *Cancer Res* 2000; 60: 3978 3984.
- 11) Dorr RT, Alberts DS: Cimetidine enhancement of cyclophosphamide antitumour activity. *Br J Cancer* 1982; 45: 35 43.
- 12) Hannant D, James K, Bolton RE, et al: Cimetidine and therapy of rodent tumours. *Br J Cancer* 1982; 45: 613 614.
- 13) Barna BP, Haines R, Edinger M, et al: Tumour-enhancing effect of cimetidine. *Oncology* 1983; 40: 43 45.
- 14) Caignard A, Martin M, Reisser D, et al: Effects of cimetidine and indomethacin on the growth of dimethylhydrazine-induced or transplanted intestinal cancers in the rat. *Br J Cancer* 1984; 50: 661

- 665.
- 15) Funakoshi N, Onizuka M, Yanagi K, et al : A new model of lung metastasis for intravital studies. *Microvasc Res* 2000 ; 59 : 361 - 367.
- 16) Weidner N : Tumor angiogenesis : review of current applications in tumor prognostication. *Semin Diagn Pathol* 1993 ; 10 : 302 - 313.
- 17) Folkman J, Szabo S, Stovroff M, et al : Duodenal ulcer. Discovery of a new mechanism and development of angiogenic therapy that accelerates healing. *Ann Surg* 1991 ; 214 : 414 - 425.
- 18) Ghosh AK, Hirasawa N, Ohuchi K : Enhancement by histamine of vascular endothelial growth factor production in granulation tissue via H (2) receptors. *Br J Pharmacol* 2001 ; 134 : 1419 - 1428.
- 19) Tayama E, Hayashida N, Fukunaga S, et al : High-dose cimetidine reduces proinflammatory reaction after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2001 ; 72 : 1945 - 1949.
- 20) Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K, et al : The effects of cimetidine, ranitidine, and famotidine on human neutrophil functions. *Anesth Analg* 1999 ; 89 : 218 - 224.

Abstract

Impact of Cimetidine on Growth and Metastasis of Surgically Transplanted Lewis Lung Cancer

Michiharu Suga^{1,2)}, Riichiro Morita¹⁾, Koichi Kaneko¹⁾ and Shunei Kyo¹⁾

¹⁾Department of Cardiovascular and Respiratory Surgery, Saitama Medical School

²⁾Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute

Purpose : Histamine has multiple biological functions and its immunomodulatory actions are not fully understood. In the current study, we investigated the effect of cimetidine, which is a histamine-2 receptor antagonist, on the progress of transplanted Lewis lung cancers using a mouse model. **Methods :** A piece of Lewis lung cancer weighing 15 mg was transplanted into the subcutaneous space on the back of each C 57 BL/6 mouse. Mice were randomized into a no-treatment control group (CO) or one of two treatment groups. In the treatment groups, 16 mg/kg/day (LD) or 160 mg/kg/day (HD) of cimetidine was orally administered from one week before the day of transplantation to the time of sacrifice. Subcutaneous tumors and lungs were excised on the 28th or 42nd post-operative day. **Results :** The mean vascular densities of the subcutaneous tumors on day 28 were $55.7 \pm 23.9/\text{mm}^2$ in CO, $88.0 \pm 16.3/\text{mm}^2$ in LD and $122.6 \pm 16.9/\text{mm}^2$ in HD ($p < 0.05$; CO vs. LD or HD, LD vs. HD) On day 42, mean weights of the subcutaneous tumors and the numbers of metastatic lung tumors were 6.0 ± 2.1 g in CO, 7.9 ± 1.2 g in LD and 10.0 ± 1.9 g in HD ($p < 0.05$; CO vs. HD) and 7.5 ± 6.0 in CO, 17.0 ± 3.0 in LD and 19.8 ± 7.4 in HD ($p < 0.05$; CO vs. HD) respectively. **Conclusions :** These results suggest that cimetidine dose-dependently enhances the angiogenesis, growth and metastasis of surgically transplanted Lewis lung cancer in a mouse model of this type.