

学位論文題名

Estrogen Receptor (ER) 陽性ラット
3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene

誘発肝癌株の樹立とホルモン療法に関する研究

学位論文内容の要旨

I. 目的

肝細胞癌には性差があり、発癌には性ホルモンが何らかの関連をもっていることが推測されてきた。原発性肝癌の性ホルモンレセプターの測定は広く行われるようになり、estrogen receptor (ER) dependentなのか、androgen (AR) dependentなのかを巡って論議されている。しかし臨床的にはホルモン療法単独での著効例はなく、乳癌や前立腺癌のような強いホルモン依存性とは異なったレセプターの存在様式、作用機序が考えられている。肝臓自体が本来estrogen-responsiveな組織であることに着目し、ER陽性肝癌株を樹立してERが腫瘍増殖にどのように関わっているのかをin vitroおよびin vivoで検討した。

II. 方法

北大第一外科で継代中のDAB cell lineから予備的に性ホルモンレセプターを測定し、ER陽性株を選択的に継代してC-DABとして樹立し以下の実験に供した。

1. 基本的特性の検討 1) 標準的RPMI1640+10%FBS培地とPhenol red free RPMI1640+DCC treated 10%FBS培地で増殖曲線(倍加時間)を比較した。2) ER, progesterone receptor (PgR), ARの性ホルモンレセプターを細胞pelletおよび皮下移植腫瘍で測定した。3) 腫瘍マーカー(AFP, CEA, ferritin)を培地をPBSに変えて48時間後のconditioned mediumを用いて測定した。4) 対数増殖期の細胞をコルセミド処理し染色体分析を行った。核型分析はtrypsin G-band法で行った。5) 細胞pelletおよび腫瘍組織について核DNA分析をflow cytometryを用いて行った。

2. in vitro実験 C-DAB 10^3 個をRPMI1640+10%FBS培地に播き、24時間後に培地により以下の3群にわけ、増殖曲線を比較した。1) 対照群: phenol red free RPMI1640+ DCC treated 10%FBS 2) estradiol(E_2)群: 対照群の培地に E_2 10^{-6} ~ 10^{-10} M/L添加 3) tamoxifen(TAM)群: 対照群の培地にTAM 10^{-6} ~ 10^{-10} M/L添加

3. in vivo実験 週齢30週(体重400~500g)の雄性WKA/Hokラット60匹を用いた。背部皮下にC-DAB 10^7 個を移植し、腫瘍径が約10mmとなる10日後に半数を去勢して以下の6群にわけた。連日強制経口投与を行い、経時的に腫瘍径を測定した。12週目に犠牲死させ、腫瘍組織の性ホルモンレセプターの測定、組織病理学的検討、血中性ステロイド- E_2 , testosterone(Te), 腫瘍マーカー(AFP, CEA, ferritin)の測定に供した。I群: 対照非去勢群 II群: 対照去勢群 III群: E_2 非去勢群 IV群: E_2 去勢群 V群: TAM非去勢群 VI群: TAM去勢群、経口投与 I, II群: 5%TWEEN80 0.4ml/kg III, IV群: 17beta- E_2 1mg/5%TWEEN80 0.4ml/kg V, VI群: TAM 1mg/5%TWEEN80 0.4ml/kg

得られた数値は実測値を示す以外は平均値±標準誤差で表した。二群間の有意差検定はStudent's t-testにより行った。

Ⅲ. 結果

1. 基本的特性 1) 培養細胞をHE染色すると、好塩基胞体を有する未熟な腫瘍細胞が単層敷石状に発育し、肝細胞癌型であった。対数増殖期での倍加時間は標準的培地で約10.5時間、estrogen(-)培地で約12.2時間であった。lag phaseでestrogen(-)培地の増殖抑制が著明であったが、有意差はなかった。2) ERは細胞pelletで2/3に、腫瘍組織で3/3に陽性であった。PgRはそれぞれ1/3, 2/3に陽性であった。ARは全例陰性であった。3) CEA, AFPは全例検出された。ferritinは2/3で検出された。4) 染色体モードは56で、核型分析では第1染色体長腕の過剰、第13染色体の欠出などがみられ、4種類のマーカー染色体が検出された。5) 核DNA分析では細胞pellet, 腫瘍組織いずれもaneuploid patternを示した。

2. in vitro実験 TAM群でlag phaseでの増殖抑制が認められた。E₂群では増殖刺激、抑制作用とも認められなかった。

3. in vivo実験 1) 推定腫瘍重量=長径×短径²/2(mg)で求め、各群の腫瘍重量の増加を比較した。4週以降の対数増殖期の対照非去勢群の倍加時間は約7.2日であった。I群に対しII, III(P<0.05), IV, V群で4週での増殖抑制が認められた。VI群では認められなかった。2) 2週時点の腫瘍重量を100として各群の重量増加率を比較した。I群に対しII, V群(P<0.05)で4週での著明な増殖抑制が認められた。III, IV群では抑制傾向がみられたが著明でなく、VI群では抑制は認められなかった。3) ERは全群で検出された。BmaxはI群で19.8±16.41fmol/mgpと高く、VI群で1.6±0.47fmol/mgpと低値であったが有意差はなかった。PgRは全群で検出されなかった。4) 血中E₂はVI群で1454.9±950.78pg/mlともっとも高かったが多群との間に有意差はなかった。血中TeはV群で非去勢にも関わらず5/7に検出されなかった。5) AFPはI群の1例のみ2.3ng/mlの低値で検出された。CEAは12例に0.95±0.232ng/mlで検出され、VI群で9例検出と高率であった。ferritinは4例を除いて検出され、いずれも低値であった。6) 組織学的にはhepatocellular carcinoma pattern(HCC)が主体で悪性度が高く、壊死傾向が強かった。I, III群ではHCCが大部分を占めcholangiocell carcinoma pattern(CCC)は少なかった。V, VI群ではHCCの壊死傾向がより強く、腸上皮化生が目立った。

Ⅳ. 考察

今回樹立された株はER, PgR陽性, AR陰性という特徴があった。DABによる発癌時の条件、細胞培養に移してからの特徴がこの特徴をもたらしたと思われる。皮下移植腫瘍のERはhigh affinity, low capacity patternを示し、PgRも陽性で、ERとの結合性が高く特異的でfunctionalであると考えられた。しかしin vitroでE₂依存性は明確でなく、in vivoでは増殖刺激作用認めた。一方TAMは直接作用が加わった可能性もあるが、in vitro・in vivoで増殖初期に腫瘍増殖を明確に抑制した。in vivoで外科的去勢も有効なホルモン療法であることが示された。これは臨床で男子乳癌に行われている治療法であり、TAMと去勢の併用はむしろ増殖抑制効果を相殺することから去勢により大量estrogen療法と同様の内分泌学的機序が働いたと考えられた。E₂, TAMの投与により血中Teは減少し内科的去勢効果がみられたが、去勢との相乗効果は認めなかった。腫瘍マーカーと組織学的所見との関連では、主体がHCCであったがAFPは1例のみ検出と壊死傾向の強さのみならず、未分化な細胞への転化も考えられた。またTAM投与でCEA検出率が高く、CCCが優勢な傾向がみられたが、さらに検討を要すると思われる。

Ⅴ. 結語

1) ER陽性ラットDAB肝癌株を樹立した。この株はAFP, CEA, ferritinを産生した、ER, Pg

Rが陽性でARは陰性であった。染色体モードは56, マーカーは4種で, DNA分析でaneuploid patternであった。2) in vitroでの倍加時間は約10.5時間で, lag phaseでのTAMの腫瘍増殖抑制が認められた。3) in vivoではE₂, TAM投与と外科的去勢はいずれも増殖初期に腫瘍増殖を抑制した。4) TAM投与によりER(Bmax)の減少, 内科的去勢効果, CCCへの組織学的変化がみられた。5) 以上よりこのラット肝癌株は少なくとも増殖初期においてestrogen dependentであり, 肝癌のホルモン療法研究の上で有用と思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 藤 本 征 一 郎

副 査 教 授 小 野 江 和 則

学 位 論 文 題 名

Estrogen Receptor (ER) 陽性ラット 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene

誘発肝癌株の樹立とホルモン療法に関する研究

肝細胞癌には性差があり、発癌には性ホルモンが何らかの関連をもっていることが推測されてきた。原発性肝癌の性ホルモンレセプターの測定は広く行われるようになり、estrogen receptor(ER) dependentなのか、androgen receptor(AR) dependentなのかを巡って論議されている。しかし臨床的にはホルモン療法単独での著効例はなく、乳癌や前立腺癌のような強いホルモン依存性とは異なったレセプターの存在様式が考えられている。著者は肝臓自体が本来estrogen-responsiveな組織であることに着目し、ER陽性肝癌株を樹立して、ERが腫瘍増殖にどのように関わっているのかを、 $17\text{-}\beta\text{estradiol}(E_2)$ と抗estrogen剤 tamoxifenを用いてin vitroおよびin vivoで検討した。

北大第一外科で継代中のDAB cell lineから予備的に性ホルモンレセプターを測定し、ER陽性株を選択的に継代してC-DABとして樹立し実験に用いた。C-DABの基本的特性は1) 形態学的には好塩基胞体を有する未熟な腫瘍細胞が単層敷石状に発育し、肝細胞癌型であった。対数増殖期での倍加時間は標準的培地で約10.5時間、estrogen(-)培地で約12.2時間であった。lag phaseでestrogen(-)培地の増殖抑制が著明であった。2) ERは細胞pelletで2/3に、腫瘍組織で3/3に陽性であった。PgRはそれぞれ1/3、2/3に陽性であった。ARは全例陰性であった。3) CEA、AFPは全例検出された。ferritinは2/3で検出された。4) 染色体数モードは56で、核型分析では第1染色体長腕の過剰、第1 3染色体の欠失などがみられ、4種類のマーカー染色体が検出された。5) 核DNA分析では細胞pellet、腫瘍組織いずれもaneuploid patternであった。

in vitro実験では対照群、 E_2 群、TAM群で検討した結果、TAM群で48時間後のlag phaseでの増殖抑制が認められた。 E_2 群では増殖刺激、抑制作用とも認められなかった。

in vivo実験では週齢30週(体重400~500g)の雄性WKA/Hokラット60匹を用いた。背部皮下にC-DAB 10^7 個を移植し、腫瘍径が約10mmとなる10日後に半数を去勢して以下の6群にわけた。I群: 対照非去勢群 II群: 対照去勢群 III群: E_2 非去勢群 IV群: E_2 去勢群 V群: TAM非去勢群 VI群: TAM去勢群。経口投与はI、II群: 5%TWEEN80 0.4ml/kg

Ⅲ, Ⅳ群: $17-\beta E_2$ 1mg/5%TWEEN80 0.4ml/kg V, Ⅵ群: TAM 1mg/5%TWEEN80 0.4 ml/kgを連日強制的に行った。結果は1) 推定腫瘍重量=長径 $\times$ 短径²/2(mg)で求め、各群の腫瘍重量の増加を比較するとⅠ群に対しⅡ, Ⅲ($P<0.05$), Ⅳ, Ⅴ群($P<0.05$)で4週での増殖抑制が認められた。Ⅵ群では認められなかった。2) 2週時点の腫瘍重量を100として各群の重量増加率を比較するとⅠ群に対しⅡ, Ⅴ群($P<0.05$)で4週での著明な増殖抑制が認められた。Ⅲ, Ⅳ群では抑制傾向がみられたが著明でなく、Ⅵ群では抑制は認められなかった。

3) ERは全群で検出された。BmaxはⅠ群で 19.8 ± 16.4 fmol/mgpと高く、Ⅵ群で 1.6 ± 0.5 fmol/mgpと低値であった。PgRは全群で検出されなかった。4) 血清 E_2 はⅥ群で 1454.9 ± 950.8 pg/mlともっとも高かったが、他群との間に有意差はなかった。血清testosteroneはⅠ群に対し去勢群で有意に低下したが、非去勢群のⅢ, Ⅴ群でも有意な低下を認めた。5) AFPはⅠ群の1例のみ2.3ng/mlの低値で検出された。CEAは12例に 0.95 ± 0.23 ng/mlで検出され、Ⅵ群で6例検出と高率であった。ferritinは4例を除いて検出され、いずれも低値であった。6) 組織学的にはhepatocellular carcinoma pattern(HCC)が主体で悪性度が高く、壊死傾向が強かった。Ⅰ, Ⅲ群ではHCCが大部分を占めcholangiocell carcinoma pattern(CCC)は少なかった。Ⅴ, Ⅵ群ではHCCの壊死傾向がより強く、腸上皮化生が著しかった。

以上より E_2 はTAM様増殖抑制作用を示したが、TAM, 外科的去勢の効果から、この肝癌株は増殖初期においてestrogen receptor dependentと考えた。

審査にあたって藤本教授より1) raloxifeneはEREと結合しないためestrogen様作用がなく、抗腫瘍効果も強く副作用も少ないのではないかと。2) PgRに対する抗ホルモン剤投与、特にTAMとMPAの併用効果はどうか。3) TAM投与でHCC優勢からCCC優勢に変化した機序について質問があったが、申請者は1) TAMによるflare upは臨床で時に問題があり、raloxifeneの治験が進めば有望なdrugと考える。2) 当科で切除不能肝癌に対しTAM, MPAの交互療法を7例に行い、PR1例、PSの改善2例が得られている。3) 機序は不明である旨回答した。

また小野江教授より1) ER陽性細胞がmonoclonalであればより明確な結論が得られたのではないかと。2) 4種類のマーカー染色体に対応する腫瘍細胞の特徴はあったか。3) 組織型の変化と腫瘍増殖速度に関連はあったか。4) TAMの直接作用を示す免疫系のパラメーターの確認について質問があった。これに対し申請者は1) cloningすると始めはER陽性細胞のみとなるが次第にERに変化が起こり、再びheterogeneityを示す可能性が強いと考える。2) 対応の検討は行っていない。3) 対数増殖期では全群の倍加時間に有意差はなかった。4) NK活性などの免疫系パラメーターは測定していないと答えた。

本研究は遺伝子工学的手法、raloxifene, 免疫学的検討を用いることにより、さらに肝癌における性ホルモンレセプターの役割が解明されることが期待された。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、研究歴なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。