

学 位 論 文 題 名

マウス癌細胞の悪性化進展の免疫賦活剤による抑制機序  
としての Manganese Superoxide Dismutase の誘導

学位論文内容の要旨

緒 言

癌細胞の悪性化進展 (tumor progression) は、癌化した細胞がその増殖過程において周囲の微小環境の影響によってさらなる遺伝子の変異を起こし、強い増殖能、浸潤・転移能など悪性形質を獲得することである。従って、癌の克服のためには、悪性化進展を抑制する手段を開発することが発癌の予防と共に重要であると考えられる。しかし、癌細胞の悪性化進展の要因あるいは抑制の研究は少ない。それは、癌細胞の悪性化進展を検討する実験系の開発が遅れているためと思われる。岡田らの樹立したC57BL/6マウスの退縮型(QR-32)癌細胞は同系マウスに単独皮下移植すると自然退縮するが、プラスチック・プレートやゼラチンスポンジなどの異物共存下では同系マウスで腫瘍を形成する。増殖してきた腫瘍から再樹立した細胞株はもとのQR-32癌細胞には見られない強い皮下増殖性および肺転移能を獲得し、悪性化進展を起こしたと判定される。また、QR-32癌細胞の悪性化進展には異物反応炎症細胞の産生する活性酸素が関与することが推察されている。本研究ではQR-32癌細胞のゼラチンスポンジ共存下に増殖してきた腫瘍から樹立した癌細胞株の悪性化進展およびこれに付随するets familyに属する転写因子E1AF発現およびマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)産生を検索し、また腫瘍組織中の抗酸化酵素産生量の観点から、悪性化進展の免疫賦活剤PSKによる抑制機序を解析した。

材料と方法

1) QR-32癌細胞( $1 \times 10^5$ 個)を同系マウスにゼラチンスポンジと共に皮下移植し、その増殖を観察した。腫瘍移植5日前より毎日、腫瘍移植後は一日おきに腫瘍摘出までPSK 300 mg/kg/dayを連続腹腔内投与した。2) 移植後21日目に増殖している腫瘍からそれぞれ個別に培養株を樹立した。3) 樹立培養癌細胞の悪性化進展は、新たな正常同系マウスに単独皮下( $2 \times 10^5$ 個)あるいは尾静脈内移植( $1 \times 10^6$ 個)し、皮下増殖性または肺転移能のどちらか一方でも親株QR-32癌細胞のそれらに比べ有意に増強していることを指標にして判定した。4) E1AFおよび膜結合型MMP(MT1-MMP)の発現はノーザンブロッティング法により、Tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)の発現および炎症性サイトカインの発現はRT-PCR法によってを検討した。5) MMPの活性および産生量は癌細胞の培養上清conditioned medium(CM)をサンプルとしてザイモグラフィにより検討した。6) 新鮮腫瘍組織あるいは癌細胞のMn-SOD蛋白産生量は細胞抽出液を蛋白サンプルとして、ウエスタンブロッティング法によってを測定した。

## 結 果

1) 無処置マウスにゼラチンスポンジと共に皮下移植し増殖してきた腫瘍から樹立した細胞株(QR<sub>s</sub>P)の6系中6系が悪性化進展をおこしていたに対して、PSK投与マウスに増殖してきた腫瘍から樹立した細胞株(QR<sub>s</sub>P/PSK)では、6系中3系(50%)しか悪性化進展を起こしおらず、PSKにより悪性化進展が抑制された。2) 悪性化進展に伴い肺転移能を獲得した細胞株でE1AF、MT1-MMPの発現と72kDaのタイプIVコラゲナーゼ(MMP-2)活性がまた増強されていた。一方、92kDaのタイプIVコラゲナーゼ(MMP-9)活性は、QR-32癌細胞でも高くQR<sub>s</sub>PおよびQR<sub>s</sub>P/PSK細胞株間に若干の高低はあるものの転移能亢進との相関性は観察されなかった。また、TIMP-1とTIMP-2の発現にも変化が認められなかった。3) ゼラチンスポンジと共に皮下移植し増殖してきた腫瘍組織中のMn-SOD蛋白量は、無処置群に比べPSK投与群で有意に増加した。4) 移植後14日目の腫瘍組織中の炎症サイトカインの発現は、PSK投与群でIFN- $\gamma$ が増強され、逆にTGF- $\beta$ が抑制されていた。TNF- $\alpha$ およびIL1- $\alpha$ は、PSK投与により変化しなかった。同様の検討を移植7日目と21日目にも行ったが、PSK投与によるサイトカイン発現の変動は14日目の成績とほぼ一致していた。5) 培養QR-32癌細胞のMn-SOD産生量はPSK(100mg/ml)直接処理によっては増強されず、PSK投与により腫瘍組織中発現が増強されたIFN- $\gamma$ (100 U/ml)で単独添加培養した場合には、未処理QR-32癌細胞に比べて50%しか増加されなかったが、IFN- $\gamma$ (10U/mlあるいは50U/ml)とTNF- $\alpha$ (50U/ml)を同時添加培養すると4~5倍増加した。一方、QR癌細胞のMn-SOD産生量はPSK投与群で発現が抑制されたTGF- $\beta$ の処理(1ng/mlあるいは10ng/ml)により、それぞれ未処理QR-32癌細胞に比べて50%あるいは20%に抑制された。

## 考 察

本研究の成績は、ゼラチンスポンジなど異物共存下に増殖することによる癌細胞の悪性化進展が、免疫賦活剤PSK投与により抑制されることを示している。しかも、ets癌遺伝子ファミリーに属する転写因子E1AFの活性化もPSK投与によって抑制された。この悪性化進展にともなって活性化されるE1AFは、MMP-1、MMP-3、MMP-9などマトリックスメタロプロテアーゼ遺伝子の発現を増強することが知られている。本研究においては肺転移能亢進が見られた株で、E1AF発現とMMP-2活性が平行して増強されているが、E1AFがMMP-2遺伝子発現に対する直接作用はまだ観察されていない。しかし、MT1-MMPがMMP-2を活性化することが既に知られており、今回観察されたMT1-MMPとMMP-2の平行して増強される実験結果から、E1AFがMT1-MMPを介してMMP-2を活性化し、癌細胞の転移能を促進するものと考えられる。

癌細胞の悪性化進展を抑制する機構に関連して、PSK投与により腫瘍組織で増強される抗酸化酵素Mn-SOD産生が注目される。岡田らは、*in vivo*、*in vitro*の実験においてQR-32癌細胞の異物と同時皮下移植することによる悪性化進展には異物反応細胞が放出する活性酸素が関与することを報告している。また、QR-32癌細胞にMn-SODを遺伝子導入し過剰発現させると、あるいは腫瘍組織中に抗酸化酵素を誘導すると、異物による悪性化進展が抑制されることも報告している。本研究で明らかになったPSK投与が腫瘍組織でのMn-SOD産生量を増加させ、活性酸素が要因となる悪性化進展を抑制していることは既報の実験成績と一致する。一方、PSKは免疫賦活剤として種々のサイトカイン産生を促進することが報告されている。今回の実験成績もPSK投与マウスに増殖してきた腫瘍組織ではIFN- $\gamma$ の増強とTGF- $\beta$ の減弱が観察された。また、培養QR-32癌細胞のMn-SOD産生量はIFN- $\gamma$ とTNF- $\alpha$ との共同作用で増加し、TGF- $\beta$ により減弱したが、PSKによる直接処理では変化しなかった。これらの成績は、PSKが本来の免疫賦活作用を介して、癌細胞のMn-SOD産生量を増強させ活性酸素が関与する悪性化進展を抑制していることを示唆している。以上、本研究はすでに免疫賦活剤として臨床的にも癌治療に広く用いられているPSKの臨床効果

の機序解明に重要な示唆を与えるものである。

#### 結 語

- 1) QR-32癌細胞のゼラチンスポンジ共存下による悪性化進展に伴う転移能亢進には、E1AFとMT1-MMPの発現増強とMMP-2の産生・活性が関与することを明かにした。
- 2) QR-32癌細胞の悪性化進展のPSK投与による抑制機序は、PSKのサイトカイン産生増強などの本来の免疫賦活作用を介して癌細胞の抗酸化酵素Mn-SOD産生増強であることを明かにした。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齋 藤 和 雄

副 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

## マウス癌細胞の悪性化進展の免疫賦活剤による抑制機序 としての Manganese Superoxide Dismutase の誘導

癌細胞が強い増殖能や浸潤・転移能を獲得する悪性化進展を抑制する手段を開発することは発癌の予防と共に重要である。本研究は癌細胞の悪性化進展の免疫賦活剤PSKによる抑制機序を、C57BL/6マウスの退縮型(QR-32)癌細胞を実験モデルとして解析したものである。実験計画はQR-32癌細胞の悪性化進展が異物反応細胞から産生される活性酸素により促進されるという既報の成績に基づいて組み立てられた。異物ゼラチンスポンジ共存下で同系マウスに増殖する癌細胞の悪性化進展とそれに付随する転写因子E1AF発現およびmatrix metalloproteinase(MMP)産生を検索することにより確認し、悪性化進展過程にある腫瘍組織中の抗酸化酵素産生量の観点から、悪性化進展の免疫賦活剤PSKによる抑制機序を解析した。

実験の結果、1) QR-32癌細胞を無処置マウスにゼラチンスポンジと共に皮下移植し増殖してきた腫瘍から樹立した細胞株(QRsP)の6系中6系(100%)が悪性化進展をおこしていたのに対して、PSK投与マウスに増殖してきた腫瘍から樹立した細胞株(QRsP/PSK)では、6系中3系(50%)しか悪性化進展を起こしておらず、PSKにより悪性化進展の抑制が確認された。2) 悪性化進展に伴い肺転移能を獲得した細胞株、5株のQRsPおよび2株のQRsP/PSKではE1AF、MT1-MMPの発現の増強がNorthern blottingにより、また、72kDaのtype IV collagenase(MMP-2)活性の増強がサイモグラムにより確認された。一方、92kDaのtype IV collagenase(MMP-9)活性は、QR-32癌細胞でも高くQRsPおよびQRsP/PSK細胞株間に若干の高低はあるものの転移能亢進との相関性は観察されなかった。また、Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)の発現をRT-PCR法により検索したが、TIMP-1およびTIMP-2とも変化が認められなかった。3) ゼラチンスポンジと共に皮下移植し増殖してきた腫瘍組織中のMn-SOD蛋白量を抗Mn-SOD抗体を用いたWestern blotting法により検索したが、無処置群に比べPSK投与群で有意に増加した。4) PSK投与により腫瘍組織中に発現・産

生の増強される炎症サイトカインはIFN- $\gamma$ であった。そして、培養QR-32癌細胞のMn-SOD産生量は、未処理QR-32癌細胞に比べIFN- $\gamma$ 単独添加培養では50%の増強であったが、IFN- $\gamma$ と、もともと産生が確認されたTNF- $\alpha$ を同時添加培養すると4~5倍増加した。逆に、PSK投与により腫瘍組織中に発現・産生の減弱するTGF- $\beta$ 処理により、QR-32癌細胞のMn-SOD産生量は50%ないし20%に抑制された。一方、QR-32癌細胞のMn-SOD産生量はPSKを直接添加培養しても増加しなかった。

以上、ゼラチンスポンジなどの異物共存下にマウスに増殖することによる癌細胞の悪性化進展が、免疫賦活剤PSK投与により抑制されることを確認した。しかも、E1AFの活性化された細胞株の出現頻度もPSK投与によって抑制された。悪性化進展にともなって活性化されるE1AFは、転写因子として、MMP-1、MMP-3、MMP-9、MT1-MMPなど癌細胞の転移能に関与するmatrix metalloproteinase遺伝子の発現を増強することが知られている。本研究において肺転移能亢進が見られた細胞株で、E1AF発現とMMP-2およびMT1-MMP活性が平行して増強されたが、PSK投与によりE1AFの活性化と共にこれらMMP発現が抑制され、悪性化進展が抑制されたと考えられる。QR-32癌細胞の悪性化進展を抑制する機構に関連して、既に、癌細胞の抗酸化酵素Mn-SOD産生量が増加すると報告されているが、本研究で明らかになったPSK投与が腫瘍組織でのMn-SOD産生量を増加させ、活性酸素が要因となるQR-32癌細胞の悪性化進展を抑制したことは既報の実験成績と一致する。PSKは免疫賦活剤として種々のサイトカイン産生を修飾することが報告されており、今回の実験でもPSK投与マウスに増殖してきた腫瘍組織ではIFN- $\gamma$ の増強とTGF- $\beta$ の減弱が観察された。しかも、培養QR-32癌細胞のMn-SOD産生量はIFN- $\gamma$ とTNF- $\alpha$ との共同作用で著明に増加し、TGF- $\beta$ により減弱した。これらの成績は、PSKが本来の免疫賦活作用を介して癌細胞のMn-SOD産生量を増加させ活性酸素の関与する悪性化進展を抑制していることを示唆している。

公開発表において、約20人の聴衆を集め、スライドを用いた約15分の口頭発表が行われた。質疑応答では、副査の守内哲也教授より、1)TGF- $\beta$ のRT-PCRとWestern blottingの成績の解離、2)癌細胞のMn-SOD産生量増加と抗癌剤感受性との関連でPSKの効果をどのように考えるか、副査の浅香正博教授より、1)PSKを用いた理由、2)投与経路による効果の違い、3)悪性化進展の抑制におけるMn-SODの意義、4)PSK投与によりMn-SODが増えても悪性化進展が抑制できなかった株が50%ある理由など、主査の斎藤和雄教授より、1)Mn-SOD以外の抗酸化酵素の関与などについて質問がなされ、申請者は、それぞれの質問に対し、文献的考察を交えほぼ妥当な回答をなした。

本論文は、すでに免疫賦活剤として臨床的にも癌治療に広く用いられているPSKが、癌細胞が転移能を獲得する悪性化進展に対する抑制手段としても有用であること、およびその機序を明かにしたものであり高く評価される。これらの成果は、今後、癌治療における免疫賦活剤の新しい役割と意義を考える上で利用されることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位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。