

学 位 論 文 題 名

Single treatment with cisplatin or UFT, but not their combination treatment enhances metastatic capacity of mouse fibrosarcoma cells

(マウス線維肉腫細胞の肺転移能獲得に及ぼす抗癌剤 UFT と CDDP の影響)

学位論文内容の要旨

【背景】

化学療法は癌治療において有力な手段であるが、治療後の抗癌剤耐性癌細胞の出現や悪性化進展(tumor progression)した癌細胞の増加などの危惧が指摘されている。悪性化進展とは癌細胞がその増殖の過程で高い増殖能や強い浸潤、転移能などの悪性形質を獲得することである。このような悪性形質を獲得した癌細胞は選択され、そのポピュレーションが増加してくるために、この悪性化進展は、癌の診断や治療方法が発達した現在でも、癌の治療をより困難にしていると考えられる。この悪性化進展は遺伝子の変異を伴っており、炎症性サイトカインや活性酸素により促進されることが明らかになっている。また、遺伝子毒性を示す抗癌剤や放射線によっても促進される恐れがある。しかし、このような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。Okada ら、Hamada らはそれぞれマウス、ラットの退縮型癌細胞を用いて、癌組織局所に随伴する急性、慢性炎症による癌細胞の悪性化進展を検討する実験系を樹立した。これらの実験系は癌化学療法による癌細胞の悪性化進展の研究にも用いられると考えられる。

【目的】

本研究では、化学療法後の悪性化進展のメカニズムの解明を目的とし、化学療法後の腫瘍細胞の悪性化進展の *in vivo* 実験モデルの樹立を試み、癌細胞の悪性化、特に転移能獲得に及ぼす抗癌剤の影響について検索した。

【実験方法】

1) 実験には C57BL/6 マウス由来の MCA 誘発可移植性線維肉腫(BMT-11)のクローン培養細胞を変異原物質ケルセチンで処理した後得られた退縮型クローン QR-32SK 細胞を用いた。QR-32SK 細胞は同系マウスに大量(1×10^6 個以上)移植すると致死的に増殖するが、通常の細胞数(2×10^5 個以下)の皮下移植では生着せず、また、転移能も弱く、 1×10^6 個を静脈内接種しても肺に転移結節を形成しない生物学的性格を持っている。

2) 大量の QR-32SK 細胞(1×10^7 個) を同系マウスに皮下移植し、腫瘍形成後化学療法を施行した。

3) 癌化学療法として、第一群では cis-diammine-dichloroplatinum(II) (CDDP; 4 mg/kg/day) を癌細胞移植後 1 1 日目から 1 5 日目まで一日おきに三回、マウスの腹腔内に投与した。また、第二群では UFT (20mg/kg/day) を癌細胞移植後 5 日目から 2 1 日目まで毎日経口投与した。第三群では CDDP と UFT の両者併用治療を施行した。

4) 2 1 日目後に、増殖した腫瘍から、非治療群, CDDP 単独治療群, UFT 単独治療群および CDDP/UFT 併用治療群の腫瘍から樹立した培養細胞株をそれぞれ QRL, QRL/CDDP, QRL /UFT および QRL/CDDP/UFT と呼称した。

5) 悪性化進展は、樹立された培養癌細胞 (1×10^6 個) をそれぞれ 5 匹の同系マウスに尾静脈内接種し、それぞれ肺転移形成能を親 QR-32SK 細胞のそれと比較し判定した。

6) 1×10^6 個の樹立培養細胞を無血清培地にて 24 時間培養し、cell lysate と培養上清中の collagenase 活性をそれぞれ gelatin を基質としたザイモグラフィで検索した。

7) RT-PCR 法によって樹立培養細胞の tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1) の発現を検索した。

8) Transwell Chamber を用いて樹立培養細胞の fibronectin に対する chemotactic assay を行った。

9) Transwell Chamber に Matrigel を敷いて培養細胞の fibronectin に対する invasion assay を行った。

10) 樹立した培養細胞の CDDP あるいは 5-FU 感受性を colony 形成法で検討し、 IC_{50} 値で表現した。

【実験結果】

1) 再樹立培養癌細胞は QRL9 株, QRL/CDDP10 株, QRL /UFT 8 株 および QRL/CDDP/UFT9 株であった。

2) 転移結節形成は QRL 細胞接種マウスでは 45 匹の中 12 匹 (27%) に観察されたのに対し、QRL/CDDP 細胞では 50 匹の中 32 匹 (64%), QRL /UFT 細胞では 40 匹の中 25 匹 (65%) で QRL 細胞に比べ、有意に高率であった ($p < 0.001$)。一方、QRL/CDDP/UFT 細胞では 45 匹の中 5 匹 (11%) にしか転移結節形成が観察されなかった。

3) 転移能を獲得した細胞株では 92kDa のタイプ IV コラゲナーゼ(MMP-9) 活性が親 QR-32SK 細胞のそれに比べ、有意に増強されている傾向であったが、72kDa のタイプ IV コラゲナーゼ(MMP-2)活性および MMP-9 の natural inhibitor である TIMP-1 の mRNA 発現は転移能の獲得とは相関しなかった。

4) 転移能を獲得した細胞株では *in vitro* における運動能を示す fibronectin(FN)に対する chemotactic activity が亢進している傾向にあった。

しかし、Matrigel Transwell Chamber を用いた浸潤能は全体に弱く一定の傾向を示さなかった。

5) 転移能を獲得しない癌細胞株では MMP-9 の産生能および chemotactic activity の両者ともに低かった。

6) 各細胞株の転移能と薬感受性を示す IC_{50} 値との間には有意な相関関係が認められなかった。

【考察】

本研究の成果は非転移性 QR-32SK 細胞が同系マウス皮下で増殖する過程で弱いながら転移能を獲得するが、CDDP あるいは UFT 単独による化学療法はその転移能獲得をさらに促進することを示している。一方、CDDP と UFT と併用化学療法は、むしろその転移能獲得を抑制する傾向にあった。また、これら *in vivo* の転移能獲得は *in vitro* の 92kDa のタイプ IV コラゲナーゼ(MMP-9)産生能あるいは fibronectin(FN)に対する chemotactic activity の亢進とよく相関した。すなわち MMP-9 産生能と chemotactic activity の両者がともに弱い細胞株は *in vivo* 転移能を示さなかった。これらの成績は癌細胞の生物学的性格が化学療法により恒常的に変化することにより転移能が亢進した可能性を示している。これら癌細胞の生物学的性格が抗癌剤により恒常的に変化する機構の解析は今後の研究によらなければならない。化学療法による転移能の亢進が薬剤耐性と関連するとの報告もあるが、本研究ではそれぞれの株化癌細胞の薬剤耐性と転移能亢進とは相関しなかった。一方、癌化学療法を施行された担癌動物で転移が促進されるという報告は多いが、そのような実験系では癌細胞の悪性化進展とともに免疫能や血管内皮など転移形成に関与する宿主要因に対する抗癌剤投与の影響が関与すると考えられる。本研究の特徴は、転移能亢進、すなわち悪性化進展の判定を抗癌剤の投与されてない正常マウスで検討していることにある。すなわち、抗癌剤の宿主への影響がないため、癌細胞の生物学的性格の変化(癌細胞の悪性化進展)のみを判定しうる。今後、癌細胞の転移能を制御する各種遺伝子発現を解析することにより、癌化学療法による癌細胞の悪性化進展の機序が明らかになることが期待される。この機序に関連して、悪性化進展をそれぞれ単独では促進させた CDDP と UFT が、併用するとむしろ抑制傾向を示したことが注目される。

【結語】

生体内に増殖するマウス線維肉腫に抗癌剤 CDDP および UFT を単独投与するとその転移能が亢進した。しかし、両抗癌剤を併用投与すると転移能の獲得は起きなかった。これら *in vivo* 転移能獲得と細胞外マトリックスに対する癌細胞の chemotaxis および MMP-9 の産生能など転移能に関係する *in vitro* の性格の亢進が相関し、この実験系が 抗癌剤による癌細胞の転移能獲得機序の解明に有用なモデルであることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則
副 査 教 授 向 後 隆 男
副 査 教 授 福 田 博
副 査 教 授 細 川 真澄男

学 位 論 文 題 名

Single treatment with cisplatin or UFT, but not their combination treatment enhances metastatic capacity of mouse fibrosarcoma cells

(マウス線維肉腫細胞の肺転移能獲得に及ぼす抗癌剤 UFT と CDDP の影響)

審査は、提出論文とそれに関連した学科目について、申請者に対して各審査員が個別に口頭試問により行い、各審査員の報告を下に主査がその結果をまとめた。審査論文の概要は以下の通りである。

癌細胞の悪性化進展は遺伝子の変異を伴うもので、炎症性サイトカインや活性酸素により促進されることが明らかにされている。本研究は、化学療法後の悪性化進展のメカニズムを解明する目的で、化学療法後の腫瘍細胞の悪性化進展の *in vivo* 実験モデルの樹立し、癌細胞の悪性化、特に転移能獲得に及ぼす抗癌剤の影響について検索したものである。

C57BL/6マウス由来のMCA誘発可移植性線維肉腫(BMT-11)のクローン培養細胞を変異原物質ケルセチンで処理した後に得られた退縮型クローンQR-32SK細胞 1×10^7 個を同系マウスに皮下移植した後、化学療法を施行した。化学療法剤として、第一群ではcis-diammine-dichloroplatinum(II)(CDDP; 4 mg/kg/day)を癌細胞移植後11日目から15日目まで隔日に3回、腹腔内投与し、第二群ではUFT(20mg/kg/day)を癌細胞移植後5日目から21日目まで連日、経口投与し、第三群ではCDDPとUFTの両者を併用投与した。

21日目後に、増殖した腫瘍から培養細胞株を樹立した。樹立された培養癌細胞は、非治療群では9株(QRL)、CDDP治療群では10株(QRL/CDDP)、UFT単独治療群では8株(QRL/UFT)、またCDDP/UFT併用治療群では9株(QRL/CDDP/UFT)であった。

まず悪性化進展の有無をみるため、樹立された培養癌細胞 1×10^6 個を各々5匹の同系マウスに尾静脈内接種し、それぞれの肺転移形成能を親株QR-32SK細胞のそれと比較した。転移結節の形成は、QRL細胞接種マウスでは45匹中12匹(27%)に観察されたのに対し、QRL/CDDP細胞では50匹中32匹(64%)、QRL/UFT細胞では40匹中25匹(65%)とQRL細胞に比べ、有意に高率であった($p < 0.001$)。一方、QRL/CDDP/UFT細胞では45匹中5匹(11%)にしか観察されなかった。

次に 1×10^6 個の樹立培養細胞を無血清培地で24時間培養し、cell lysateと培養上

清中のcollagenase活性をザイモグラフィで検索した。結果は、転移能を獲得した細胞株では92kDaのタイプIVコラゲナーゼ(MMP-9)活性が親QR-32SK細胞のそれと比べて有意に増強されていたが、72kDaのタイプIVコラゲナーゼ(MMP-2)活性及びMMP-9のnatural inhibitorであるTIMP-1のmRNA発現と転移能獲得との間に相関は認められなかった。さらに、RT-PCR法により樹立培養細胞のtissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1)の発現を検索し、またTranswell Chamberを用いて樹立培養細胞のfibronectin に対するchemotactic assayならびにinvasion assayを行った。転移能を獲得した細胞株では、*in vitro*における運動能を示すfibronectin(FN)に対するchemotactic activityの亢進がみられたが、浸潤能は全体に弱く一定の傾向を示さなかった。なお、転移能を獲得しなかった癌細胞株ではMMP-9の産生能及びchemotactic activityはともに低かった。

樹立した培養細胞のCDDPならびに5-FUに対する感受性をcolony形成法で検討したが、各細胞株の転移能と薬剤感受性を示すIC₅₀値との間に有意な相関は認められなかった。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、抗癌剤による癌細胞の転移能獲得機序の解明に有用な*in vivo* 実験モデル、特に抗癌剤の宿主への影響がないモデルを樹立したこと、ならびに癌化学療法後の悪性化進展が癌細胞の生物学的性格の恒常的な変化によるものであり、本実験系では癌細胞の転移能獲得は細胞外マトリックスに対する癌細胞のchemotaxisやMMP-9産生能と密接に関連していること、さらに抗癌剤の種類や組み合わせにより悪性化進展は一様ではないことを明らかにしたことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。