lacZ 遺伝子導入腫瘍細胞を用いた微小転移モデルの作出と 微小転移巣の抗癌剤感受性に関する研究

学位論文内容の要旨

癌の集学的治療の進歩にもかかわらず治療成績に著しい進歩が見られない理由は、癌による死亡の最大の原因である転移の抑制が現時点では困難なことによる。転移を抑制するためには微小転移の段階でこれを治療する方法が有効と考えられることから、癌転移の初期段階のメカニズムを解明することは極めて重要と考えられる。転移形成には各種の接着因子、マトリクス分解酵素、宿主の増殖因子など多くの因子が関与することが、主として *in vitro* の実験から明らかにされつつある。しかしながら、癌転移の初期過程の細胞動態には依然として不明な点が多く、転移機構の解明のためにも、また転移の治療という臨床的側面からもこの点を明らかにすることは重要である。

近年、酵素遺伝子をマーカーとして転移性細胞に導入することにより、微小転移巣を *in vivo* で検出する技術が報告された。以後、由来臓器の異なる種々の細胞に β -galactosidase (*lacZ*) 遺伝子が導入され、*in vivo* における転移細胞の検出に応用されてきた。しかし、癌転移の初期段階における細胞動態を詳細に検討した報告は乏しく、その実態はいまだ明らかにされていない。本研究では、ラット前立腺癌細胞株とマウス肺癌細胞株を用いて、大腸菌由来の *lacZ* 遺伝子導入による微小転移モデルの作出を行い、これら二つの細胞の微小転移形成過程を、その細胞増殖動態を含めて詳細に検討した。さらに、マウス肺癌微小転移モデルを用いた抗癌剤の微小転移抑制効果の判定を試み、転移の初期段階における治療の有効性について検討した。

第1章では、分化型ラット前立腺癌細胞株に *lacZ* 遺伝子をマーカーとして導入することにより微小転移モデル (PLS301Z 細胞) を作出した。PLS301Z 細胞の形態学的特徴、増殖速度、転移能は *lacZ* 遺伝子導入前とほぼ同等であった。PLS301Z 細胞をマウスの静脈内に移植した結果、肺における微小転移巣は、X-Gal 染色により特異的、かつ高感度に *in vivo* で検出可能であった。画像解析の結果、マウスの静脈内への移植後、PLS301Z 細胞の肺における転移巣のほとんどは移植後7日目までに消失し、個々の転移巣の大きさは移植後4日目以降増加し始めることが明らかとなった。X-Gal-BrdU 二重染色の結果、PLS301Z 細胞の肺転移巣における細胞増殖率は、移植後2日目に一時的に減少し、4日目以降あらたな増殖が開始されることが示された。IV型コラーゲン免疫染色の結果、肺転移巣が異所性増殖を開始した移植後4日目において、これらの転移巣は血管基底膜に囲まれて存在していた。超微形態学的観察では、移植後2日目では転移細胞のほとんどが肺毛細血管内で変性ないし壊死性の変化を示しており、移植後4日目では微小転移巣が血管基底膜と直接接して血管内で増殖している像が観察された。これらの結果から、PLS301Z 細胞は、肺において血管外への脱

出に先立って、管内性に増殖を開始することが明らかとなった。また、PLS301Z 細胞は前立腺癌の転移形成過程の初期段階を解析するうえで有用なモデルであると考えられる。

第2章では、マウス肺癌細胞を用いて、第1章同様に微小転移モデルを作出し(4A1-1細胞)、同細胞の肺における転移巣の形成過程、すなわち血液循環への遊離、肺毛細血管への定着、血管外脱出および肺における初期増殖を詳細に解析した。病理組織学的観察の結果、静脈内移植後、肺に達した4A1-1細胞は数時間内に速やかに血管外に脱出するものの、大半がその後2ないし3日の間に血管外で死滅することが明らかになった。これらの所見は移植後2日目における転移巣のBrdU標識率の低下と、画像解析により示された肺転移巣数の急激な減少と一致した。移植後4日目以降、残存した肺転移巣の面積とBrdU標識率が増加を開始した。IV型コラーゲン免疫染色の結果、微小転移巣の増大に伴って、転移巣周囲の基底膜の部分的な消失が認められた。4A1-1細胞をマウスの皮下に移植した結果、同細胞は移植後10日目より血中に単一細胞として認められ、移植2週間後より1個ないし2個の細胞から構成される微小転移巣が肺に観察された。これらの結果から、Lewis肺癌細胞は単一細胞での血中への遊離、肺への定着と速やかな血管外脱出、大半の細胞の死滅、血管外における残存細胞の新たな増殖という一連の過程を経て二次臓器における転移巣を形成すると考えられる。

第3章では、微小転移巣の抗癌剤1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracilとuracilの合剤であるUFTに対する感受性を、第2章で作出したマウス肺癌微小転移モデルを用いて評価した。4A1-1細胞を皮下に移植されたマウスの肺における肉眼的転移巣の数は、UFTを移植後14日目より35日目まで(早期投与群)15~20mg/kgの用量で経口投与することにより有意に抑制されたが、移植後21日目(後期投与群)からの投与では転移巣数の減少は認められなかった。一方、実体顕微鏡による微小転移巣の観察では、早期投与群において、より低用量(10mg/kg)から転移抑制効果が認められ、後期投与群(20mg/kg)においてもUFT処置による転移巣数の有意な減少が認められた。皮下の原発巣の増殖は、15および20mg/kg群においてのみ有意に抑制された。4A1-1細胞を静脈内に移植されたマウスの肺における転移巣の数ならびに面積は、移植後4日目より12日目までUFTを20mg/kgの用量で経口投与することにより有意に減少したが、8日目からの投与では転移巣の数に影響は認められず、面積のみが減少していた。4A1-1細胞の移植に先立ってUFTを投与した結果、実験的肺転移巣の数に影響は認められなかった。以上の結果は、癌転移巣の形成過程初期における高い抗癌剤感受性を示すとともに、低用量の抗癌剤による肺転移の有効治療の可能性を示唆している。

学位論文審査の要旨

主査 教授 梅村 孝司
副査 教授 岩永 敏彦
副査 教授 藤永 徹
副査 教授 土井 邦雄 (東京大学)

学位論文題名

lacZ 遺伝子導入腫瘍細胞を用いた微小転移モデルの作出と 微小転移巣の抗癌剤感受性に関する研究

癌の転移には各種の接着因子、マトリクス分解酵素、宿主の増殖因子など多くの因子が関与することが明らかにされつつある。しかし、癌転移の初期段階における細胞動態を詳細に検討した報告は乏しい。本研究では、ラット前立腺癌細胞株とマウス肺癌細胞株に、大腸菌由来の β -galactosidase (*lacZ*) 遺伝子を導入して微小転移モデルを作出し、以下の実験を行った。

最初に、分化型ラット前立腺癌細胞株に *lacZ* 遺伝子を導入して微小転移モデルを作出した。前立腺癌細胞の形態学的特徴、増殖速度、転移能は *lacZ* 遺伝子導入前とほぼ同等であった。前立腺癌細胞をヌードマウスの静脈内に移植し、X-Gal-BrdU二重染色、画像解析、超微形態学的検査、IV型コラーゲン免疫染色などの方法を用いて経時的に検査した結果、前立腺癌細胞は、肺における血管外への脱出に先立って、管内性に増殖することが明らかとなった。

次に、Lewisマウス肺癌細胞を用いて微小転移モデルを作出し、同細胞の肺における転移巣の形成過程を詳細に解析した。その結果、肺癌細胞は単一細胞での血中への遊離、肺への定着と速やかな血管外脱出、大半の細胞の死滅、血管外における残存細胞の新たな増殖という一連の過程を経て二次臓器における転移巣を形成することが分かった。

最後に、微小転移巣の抗癌剤 UFT に対する感受性を、先に作出した肺癌細胞を用いて評価した。肺癌細胞を皮下に移植されたマウスの肺における肉眼的転移巣の数は、UFT を移植後14日目より35日目まで（早期投与群）経口投与することにより有意に抑制されたが、移植後21日目（後期投与群）からの投与では転移巣数の減少は認められなかった。一方、早期投与群において、より低用量（10 mg/kg）から転移抑制効果が認められた。この実験により、癌転移巣の形成過程初期には高い抗癌剤感受性があり、低用量の抗癌剤によって肺転移を有効治療できる可能性が示された。

以上の成果は、転移初期における癌細胞の生体内動態の理解に大きく貢献する。よって、審査員一同は、小林 潔氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。