

氏名(本籍)	えの もと つよ し (千葉県) 榎本剛史(千葉県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第4485号		
学位授与年月日	平成19年7月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>Consistent Liver Metastases in a Rat Model by Portal Injection of Microencapsulated Cancer Cells</b> (微小腫瘍塊による新規高効率肝転移モデル)		
主査	筑波大学教授	医学博士	兵頭一之介
副査	筑波大学教授	医学博士	長田道夫
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	森下由紀雄
副査	筑波大学講師	博士(医学)	大越靖

### 論文の内容の要旨

(目的) 肝転移治療法の開発に際し、評価に適するモデル動物がないことが開発の律速段階となっている。既存の動物モデル作製法では、肝転移性の高い特殊な癌細胞を用いなくてはならない上、転移の再現性も悪かった。さらに生命予後に影響を与える腹膜播腫などが併存するため、評価の妨げにもなっている。そこで微小腫瘍塊は末梢門脈に確実に捕捉されるため、肝転移が成立しやすい現象に着目し、直径300 $\mu$ mのアルギン酸マイクロカプセル(=MC)にヒトがん細胞株を封入したものをラットに経門脈的に投与することで、種々のがん細胞で普遍的かつ高効率に肝転移を形成する動物モデルを作製した。

(対象と方法) ヒト膀胱癌細胞株を封入したMCをin vitroで培養すると、内部のがん細胞は増殖して5-7日目で充満する。さらに2-3日後にはMCが破裂し、癌細胞がMC外に逸脱して増殖を続ける。実験1: 増殖期の癌細胞で充満され、破裂寸前のMC(700~1500cells/MC)3000個をヌードラットの門脈に投与。肝転移形成率(%)=(肝転移形成ラット数/全ラット数)、他臓器転移(腹膜播腫、刺入部、肺、創部)の有無を検討し、肝転移を数値化(%) (metastatic extent = metastatic volume / volume of entire liver)。コントロールは、投与MC内に含まれる癌細胞数と同数のsingle cell suspensionを投与し、上記の項目について同様に比較。実験2: 肝転移程度の調節が可能かどうか、MC数を6000個、3000個、1000個、333個と段階的に投与して検討。実験3: MCによる肝転移形成過程を把握するため、3000個のSUIT-2MCを投与後3, 7, 28日目に、MCの肝内の分布、MCの破裂の有無、形成された肝転移巣の分布とサイズを検討。実験4: MCによる肝転移モデルと、従来の作製法による肝転移モデルを、肝転移形成部位、転移巣の組織学的所見(Hematoxylin and Eosin染色)、desmoplastic reaction (Masson trichrome染色)、血管新生(anti-von. Willebrand factor antibodyによる免疫染色)について比較。

(結果) 結果1: ヒト膀胱癌細胞株SUIT-2, ASPC-1, BxPC-3のMCの3種類の系について行ったところ、肝転移形成率はそれぞれ100%(12/12), 100%(6/6), 83%(5/6)のであった。肝転移を形成した23匹のラッ

トは、すべて肝以外の転移巣は認めなかった。一方コントロール群では肝転移は全く形成されなかった。すべてのラットにおいて、肝転移は数値化可能であった。結果2：投与MC数が6000個、3000個、1000個、333個の場合、metastatic extent (%)はそれぞれ29.5、14.6、1.9、0.2と段階的となり、MC投与数によって肝転移程度を規定することが可能であった。結果3：投与されたMCの2/3は肝辺縁まで到達し、直径20 - 50 $\mu$ mの末梢門脈に塞栓。残り1/3は肝葉の中心部に存在する直径200 - 400 $\mu$ mの太い門脈に存在。門注後3日目には封入されていた癌細胞がカプセルから逸脱し、肝実質に進展して微小な転移巣を形成。7日目には直径500 - 1000 $\mu$ mの、28日目から42日目には肝全体の20%を占める著明な転移巣を形成。結果4：従来の肝転移モデルとの比較では、肝転移の形成部位は、ともに肝辺縁で差がなかった。組織学的所見ではMCによる肝転移巣は線維化が著明であり、desmoplastic reactionは激しい。しかし新生血管数は、従来の転移モデルに比べ少なかった。この結果から、MCによる肝転移モデルは、より臨床的に膀胱癌に類似した組織学的所見であった。

(考察) MC法が高率に肝転移を形成する第1の理由として、MCは肝類洞から通過しない十分な大きさであり、門脈末梢に確実に塞栓したこと。第2の理由として、MCにより内部の癌細胞は門脈末梢に塞栓後、増殖して破裂するまで保護されており、多数の viable な癌細胞を供給できたこと。第3の理由として門脈末梢に塞栓したMCはさらに末梢の肝虚血を引き起こし growth factor や cytokineなどを放出することが、癌細胞の増殖に有利と考えられる。

#### 審 査 の 結 果 の 要 旨

榎本氏らはマイクロカプセルに腫瘍塊を包含させ、これを門脈に注入することにより多数の肝腫瘍病巣を作成することに成功した。新しい着眼点に基づく独創的な研究である。本論文では「肝転移」と表現されているが、「肝への広範な implantation」とした方が正確ではないかとの指摘があった。今後の研究を進めていく上で、この点に注意が必要ではないかと思われる。その他、審査では single cell と cluster cell の差、治療開始時期、ヒトの臨床モデルとの相違点、ヒトの臨床検体に応用可能か、等につき討論され、適切な回答ならびに考察が示された。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。