

氏名	松村 英樹		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博甲第 7869 号		
学位授与年月	平成 28 年 3 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	Kupffer cells decrease metastasis of colon cancer cells to the liver in the early stage (クッパー細胞は大腸癌肝転移の早期プロセスを抑制する)		
主査	筑波大学教授	医学博士	千葉 滋
副査	筑波大学教授	医学博士	坪井 康次
副査	筑波大学教授	博士 (医学)	森 健作
副査	筑波大学教授	博士 (医学)	渡邊 幸秀

論文の内容の要旨

(目的) 大腸癌肝転移は、血液中に遊離した腫瘍細胞 (TC) が肝類洞内皮に接着し、類洞外へ浸潤・増殖することで発生すると考えられている。肝類洞を構成する細胞の一つであるクッパー細胞 (KC) を除去すると肝転移が増加したと報告された。一方で KC が放出するサイトカインが肝類洞内皮への TC の接着・浸潤・増殖を促進するという報告もある。転移を形成するには血中を循環する TC が類洞内に接着することが必須となる。過去の実験では固定標本による組織学的評価が中心であったが、KC が TC に与える影響を明らかとするには、*in vivo* において、両細胞を染色し類洞内を TC が循環している状況下で観察する必要がある。本研究では、生体蛍光顕微鏡 (IVM) を用いて KC と TC の動態を解析することにより、肝転移早期において KC が TC に与える影響を明らかとすることを目的とした。

(対象と方法) ischer 雄性ラットにラット大腸癌細胞株 RCN-H4 5×10^6 個を頸動脈から投与する肝転移モデルを用いた。KC の除去には、Cl₂MDP リポソームを用いた。コントロール (KC+) 群と KC 除去 (KC-) 群の 2 群を設定した。肝葉の一部を脱転・固定し、IVM を用いて肝類洞内動態をリアルタイムに観察した。TC・KC はそれぞれ蛍光染色し、IVM のフィルターを切り替えることで区別した。マス目に番号を振った特殊なスライドガラスを使用することで、同一部位を経時的に

観察する事が可能となり、再現性を担保した。観察は TC 投与 20 分後から 360 分後まで行い、類洞内接着 TC 数を評価した。また、KC 活性化の評価として肝内サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β) の測定を行った。接着 TC 数の差がその後の転移形成にどのような影響を与えるか明らかにするため、KC を除去するタイミングを TC 投与 2 日前から 7 日後の 5 群に分け、TC 投与 14 日後に肝臓を摘出して肝切片を作成しそれぞれ 10 切片の転移結節数を計測した。

(結果) TC を投与すると、肝類洞を流れる TC と類洞内に接着する TC を認めた。接着 TC は時間経過とともに接着が解除された。TC 投与 20 分後から 120 分後までは、KC+群と KC-群の両群間で類洞内接着 TC 数に差を認めなかった。TC 投与 360 分後では KC+群と比較して KC-群の接着 TC 数は有意に多かった。また、KC+群において 74%の TC が KC と接着していた。KC と接着した TC を電子顕微鏡で評価したところ、TC は KC に貪食されていた。肝組織中のサイトカインは、KC-群と比較して KC+群は有意に高値であり、KC が活性化されていた。また、TC 投与 14 日後の肝転移結節数は、KC を除去しなかった群および TC を投与した後に KC を除去した群と比較して、TC 投与前に KC を除去した群では著明に増加していた。

(考察) 本研究は、肝転移形成の早期において KC が TC に与える影響を明らかにするため、肝転移早期のステップである TC の接着に注目し、IVM を用いてリアルタイムに観察した。投与した TC の一部は、類洞内皮細胞と KC に接着し、電子顕微鏡で観察したところ KC と接着した TC は KC に貪食されていた。類洞内接着 TC 数は KC を除去すると有意に増加し、KC の貪食によって類洞内接着 TC 数が減少したと示唆された。また、肝転移早期における類洞内接着 TC 数の差はその後の肝転移結節形成と深い関係があると考えられた。すなわち、KC が肝転移抑制に働く重要なタイミングは、循環 TC が肝臓に到達する時であることが示唆される。KC の TC 貪食と KC の活性化には相関性があるとの既報があるが、本研究においても KC の活性化を認めた。大腸癌手術時に増加する血液中の循環 TC は肝転移再発の因子と報告されている。本研究の臨床応用を考慮すると、KC の貪食機能を正に制御することにより、大腸癌術後肝転移再発を予防する新たな治療法に結びつく可能性がある。Cl₂MDP リポソームは肝類洞構造と類洞内皮に影響を与えなかったが、循環 TC 数に影響を与えるか今後検討する必要がある。また、今回の結果が普遍的な現象か明らかとするため、異なる細胞株を用いたモデルでの検証が必要と考えられた。

審査の結果の要旨

(批評) 申請者は、生体蛍光顕微鏡観察により大腸癌細胞とクッパー細胞との接着をリアルタイムで観察し、大腸癌細胞が血流を介して肝臓に到達早期にクッパー細胞に接着し、さらに、接着後に貪食されることを示した。また、クッパー細胞を除去することで、転移結節数が増加することも明確にした。本研究は、大腸癌の肝転移早期プロセスをクッパー細胞が抑制する事を明らかにしたもので、大腸癌肝転移機構の一端を明らかにしたのみならず、将来的にクッパー細胞の機能を修飾することによる肝転移抑制治療の可能性を示唆した点で、癌治療の発展に寄与するものである。

審査様式 2 - 1

平成 28 年 1 月 7 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。