

氏名(本籍)	間瀬憲多朗(愛知県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第2665号		
学位授与年月日	平成13年3月23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	医学研究科		
学位論文題目	新しい経気道的同所性移植法の確立とヒト肺腺癌培養細胞株の生物学的特性の検討		
主査	筑波大学教授	医学博士	関沢清久
副査	筑波大学助教授	医学博士	轟健
副査	筑波大学講師	医学博士	岩川真由美
副査	筑波大学講師	博士(獣医学)	杉山文博

論文の内容の要旨

(目的)

近年増加傾向にある肺腺癌は現在のところ有効な治療法の開発がなされていない。本研究では肺腺癌細胞の生体内での動態機構(増殖, 浸潤, 転移)を解明し, 肺腺癌の治療法の進歩に寄与することを目標とし, ヒト肺腺癌由来の培養細胞をヌードマウスの肺内に同所性移植を行い, その細胞生物学的特性を解明することを目的とした。

(対象と方法)

第1章ではこれまでに報告されている同所性移植法3法(①経気道的移植法, ②開胸移植法, ③経皮的移植法)と今回肺組織に侵襲を加えることの少ない経気道的移植法に着目し, 従来報告されている経気道的移植法を改良した静脈内留置針を使用した移植法と比較・検討した。方法はヌードマウスを麻酔後, ヒト肺腺癌培養細胞株であるA549培養細胞株細胞浮遊液を用いて上記同所性移植方法4法を行い, 移植手技時間, 移植手技の容易さ, 移植時死亡数, 肺内腫瘍形成率等を検討した。第2章では肺腺癌培養細胞株の生体内での細胞生物学的特性の検討をするために, ニューマウスに本研究にて考案した静脈内留置針を用いた移植法を用いてヒト肺腺癌培養細胞株9株(A549培養細胞株, PC-14培養細胞株, NCI-H358培養細胞株, NCI-H322培養細胞株, NCI-H23培養細胞株, Calu-3培養細胞株, LC-2/ad培養細胞株, RERF-LC-KJ培養細胞株, PL16T培養細胞株)を移植後, 28日または56日間観察し, 安楽死させ肉眼のおよび組織学的な検索を行った。第3章では経気道的同所性移植法で特徴づけられたヒト肺腺癌培養細胞株5株(A549培養細胞株, PC-14培養細胞株, NCI-H322培養細胞株, NCI-H23培養細胞株, RERF-LC-KJ培養細胞株)の細胞よりRNAを抽出し, MMP-2, MMP-9およびその活性化因子であるMTI-NMP, uPAと阻害因子であるTIMP-2, TIMP-1のmRNAの発現をノザンプロット法を用いて検討した。

(結果)

第1章において移植手技時間は開胸移植法と従来報告されている経気道的移植法(ポリエチレンチューブ使用)では本研究にて改良した経気道的移植法(静脈内留置針使用)と比較して移植時間が長く有意差が認められた。開胸移植法および今回改良した経気道的移植法(静脈内留置針使用)は肺内への細胞浮遊液の注入が容易であった。

が、経皮的移植法および従来報告されている経気道的移植法（ポリエチレンチューブ使用）は注入の確認が困難であった。移植時における死亡は開胸移植法では移植時に全例死亡を認めたが、他の移植法は死亡を認めなかった。肺内腫瘍形成率は経気道的移植法（静脈内留置針使用）が最も良好と思われた。第2章においてヒト肺腺癌培養細胞株9株のうち肺内腫瘍形成を認めたものが7株（A549培養細胞株、NCI-H358培養細胞株、PC-14培養細胞株、NCI-H322培養細胞株、NCI-H23培養細胞株、Calu-3培養細胞株、LC-2/ad培養細胞株）であった。残りの2株（RERF-LC-KJ培養細胞株、PL16T培養細胞株）は腫瘍形成を示さなかった。またA549培養細胞株はリンパ節転移および胸膜播種を認め、PC-14培養細胞株ではリンパ節転移を認めたが、残りの5株（NCI-H358培養細胞株、NCI-H322培養細胞株、NCI-H23培養細胞株、Calu-3培養細胞株、LC-2/ad培養細胞株）の移植例ではリンパ節転移は認めなかった。また胸郭外の遠隔臓器への転移は全培養細胞株で認めなかった。第3章においてはヒト肺腺癌培養細胞におけるMMP関連遺伝子の発現を検討すると①NMP-2においてA549培養細胞株、PC-14培養細胞株とNCI-H322培養細胞株で発現が認められた。②uPAにおいてA549、PC-14培養細胞株で強い発現が認められた。

（考察）

第1章ではこれまでに報告されている同所性移植法3法（①経気道的移植法、②開胸移植法、③経皮的移植法）は施行するためには比較的手技等の熟練を要すと考えられたが、従来報告されている経気道的移植法を改良した静脈内留置針を用いた移植法は簡便でなおかつ確実に腫瘍細胞を移植できる方法であると考えられた。第2章ではヒト肺腺癌培養細胞株によって肺内腫瘍形成率や増殖形態、転移能等生物学的特性が様々であったが、腫瘍形成率という点から3群（高腫瘍形成率群、低腫瘍形成率群、無形成群）に分類でき、この腫瘍形成率の違いに関与する因子についての検討が重要であると考えられた。第3章ではMMP-2やuPAが肺腺癌培養細胞の肺内における腫瘍形成やリンパ節転移に関与している可能性があることやin vivoにおける肺腺癌の浸潤・転移においてもこれらの分子が関与している可能性があると考えられた。

（結論）

本研究ではMcLemoreらが報告したヒト肺癌培養細胞の経気道的移植法を改良した静脈内留置針を用いた移植法を検討した。本移植法は簡便でかつ確実に肺内に腫瘍細胞を移植できる方法であることが示され、今後肺癌研究に対し有用な動物実験モデルと思われる。さらにこの手法を用いて肺腺癌培養細胞の生物学的特性について検討し、肺内腫瘍形成率によって様々な生物学的特性をもつ肺腺癌培養細胞株を3群に分類することが可能であり、これら同一の群には腫瘍の増殖・浸潤・転移に関係する共通の因子の存在する可能性を示唆するものと考えられた。そこで癌の増殖・浸潤・転移に関係する因子のひとつである細胞外基質分解酵素のひとつであるMMPに着目した。肺内腫瘍形成率の高い培養細胞株やリンパ節転移を認める培養細胞株においてMMP-2とuPAの発現を認め、これらの分子が肺腺癌細胞においても生体内での増殖・浸潤・転移に関与している可能性が示唆された。今後本動物の実験モデルを用いて肺癌の増殖・浸潤・転移機構を生物学的根拠に基づいて解明していくことが期待できる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

肺癌は近年増加傾向にあり、国民の健康問題として重要である。従って、肺癌の基礎的な研究による成果を治療に応用し、この問題に貢献することは、医学研究にとって急務である。本研究は、ヒト肺癌細胞のヌードマウスへの同所性移植法の改良と、その方法を用いて、ヒト肺腺癌培養細胞のヌードマウス肺での転移増殖に関する新しい知見を得た。すなわち、生物学的特性から肺腺癌培養細胞株を分類することが可能であり、同一の群には腫瘍の増殖・浸潤・転移に関係する共通の因子が存在する可能性があることを示唆した。具体的には、肺内腫瘍形成率やリンパ節転移率にMMP-2といった細胞外基質分解酵素が関与している可能性が示唆された。本研究でな

された方法の確立と、それによって得られた結果は、今後の肺癌研究に貢献するものであると考える。日常臨床で肺癌治療にかかわる呼吸器外科医が行った、優れた基礎研究である。その研究過程も博士課程終了としての十分な内容をそなえている。

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。