



高転移性及び非転移性ハムスター骨肉腫の細胞学的特性についての実験的検討

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 岡田, 雅仁 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1539

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 262号	学位授与年月日	平成 9年12月26日
氏名	岡田雅仁		
論文題目	高転移性および非転移性ハムスター骨肉腫の細胞学的特性についての実験的検討		

博士(医学) 岡田 雅 仁

論文題目

高転移性および非転移性ハムスター骨肉腫の細胞学的特性についての実験的検討

論文内容の要旨

〔目的〕

ハムスター骨肉腫 Os515は高頻度に自然肺転移を発生する実験腫瘍モデルであるが、腫瘍の断面には硬い骨形成の著しい部分と、その外殻に軟らかい骨形成の少ない部分とがみられ、軟らかい骨形成の少ない部分を4週齢シリアンゴールデンハムスター（以下ハムスター）背部皮下に移植すると肺転移を起こさない腫瘍が発育する。そこで肺転移を起こさない腫瘍の実験モデルとしての有用性について検証するとともに、同一の実験腫瘍から発生した異なった性質を有する2つの腫瘍の細胞学特性について検討した。

〔方法〕

Os515の継代方法に従って、腫瘍を細切し4週齢ハムスター背部皮下に移植して移植後6週間で屠殺し、各々の腫瘍の継代移植により移植生着率および肺転移の出現頻度を10代以降まで追跡した。また各々の腫瘍の大きさをAttiaらの計算式から算出し、増殖速度を求めた。

また Os515（以下高転移系）の肺転移巣からと、肺転移の見られない腫瘍（以下非転移系）の10代目から12代目の背部腫瘍から組織片を採取し腫瘍細胞を単離してそれぞれを培養系に移し、実験材料とした。この2系統の細胞について、細胞形態、酵素活性（アルカリ性フォスファターゼ(AI-P)活性、I型コラーゲン分解活性、IV型コラーゲン分解活性）、各種レクチンによる細胞凝集能、血小板凝集能、I型コラーゲンおよびIV型コラーゲンに対する細胞接着能、再構成基底膜の通過能を測定した。

〔結果〕

A：継代移植腫瘍について

非転移系は同一条件下で12代まで継代したところ、ほぼ100%の移植率で継代移植することができ、またいづれにも肺転移は出現しないことが判明した。一方高転移系は100%継代移植でき、すべてに肺転移が確認された。肺転移は、両肺表面に74±35個観察できた。また移植腫瘍は、非転移系では成長が速く、倍加期間では高転移系の8.1±1.1日に対し非転移系では4.4±1.2日であった。腫瘍の組織像では、豊富な類骨形成を示す高転移系に対し非転移系では類骨は小型となり、骨形成能の低下がみられた。

B：培養細胞について

培養細胞の形態は、高転移系が多稜形で上皮様を呈したのに対し非転移系は紡錘形と異なっていた。酵素活性では、AI-P活性（高転移系：972±61n mol/分/mg蛋白、非転移系：575±34n mol/分/mg蛋白）とIV型コラーゲン分解活性（高転移系：9.9±2.3μg/分/mg蛋白、非転移系：4.8±2.2μg/分/mg蛋白）と高転移系が有意の高値を示した。

またレクチンによる細胞凝集能では、それぞれの細胞系が麦芽凝集素においてのみ著しい凝集を示した。使用した他のレクチンでは凝集が観察されなかった。

ヒト血小板濃厚液に対する腫瘍細胞の血小板凝集能を経時的な観察では、高転移系においては速やかに凝集が始まり、最大45%まで上昇したのに対し、非転移系では約40秒遅れて凝集が始まり、32%をピー

クに以後解離する傾向がみられた。

培養細胞のI型コラーゲン（高転移系：72±2%/15分、非転移系：45±1%/15分）と再構成基底膜（高転移系：60±2%/15分、非転移系：54±1%/15分）に対する接着性は、いずれも高転移系で有意の高値を示した。

ヌクレポアフィルター上に再構成基底膜の薄膜を形成し、薄膜に対するそれぞれの細胞通過能を計測したところ、高転移系では3時間後に71±1個/単位面積がフィルター裏面に観察されたが、非転移系では3時間後に15±1個/単位面積が通過したのみで、3時間後、6時間後ともに高転移系において有意に高い通過能がみられた。

〔考察〕

ハムスター骨肉腫 Os515は高肺転移能を有する実験腫瘍モデルであるが、この腫瘍の肉眼的および病理組織学的形態からは、2種類の腫瘍成分の混在が推定された。そこで指定以外の継代移植操作を行ったところ、肺転移を起こさない骨肉腫が分離できた。このことからハムスター骨肉腫 Os515が均一な細胞集団ではないことが考えられた。さらにこの転移を起こさない骨肉腫を継代しても、肺転移が見られないことからこの骨肉腫はハムスター骨肉腫 Os515から分離された新しい実験腫瘍モデルと考えられ、Os515（高転移系）と対比して骨肉腫の肺転移を研究する上で有用な実験モデルと考えられた。

またそれぞれの培養細胞において形態、細胞機能に相違が明らかとなった。特にIV型コラーゲン分解活性や再構成基底膜への接着および通過能は、血管壁への侵入・通過過程に関連する特性であるが、非転移系では著しい能力の低下が示された。また血小板凝集能は血管内を移動し標的臓器の血管に捕捉されやすい機能とする説に従うと、高い凝集能と迅速な凝集の進行が標的臓器の血管への着床の過程に関与すると考えられるが、非転移系にみられた約40秒間の凝集遅延は転移の障害となることが推測された。

〔結論〕

- 1) 確立された高肺転移能を有するハムスター骨肉腫 Os515の移植操作を変更することにより肺転移を起こさない実験系を得た。またこの実験系は10代以上の継代移植を繰り返しても肺転移を起こさないという腫瘍性格を保持していた。
- 2) 2つの実験系は、シリアンゴールドンハムスター背部皮下に移植することで高い移植率で継代移植が可能であったが、それらの腫瘍の肉眼的および組織学的形態や増殖速度に加え、培養細胞における形態や細胞機能が異なっていた。
- 3) この分離された新しい実験腫瘍モデルは高肺転移能を有するハムスター骨肉腫 Os515と対比して、骨肉腫の肺転移の機構を研究する上で有用な実験モデルと考えられた。

論文審査の結果の要旨

ハムスター骨肉腫 Os515は高頻度に自然肺転移する実験腫瘍モデルであるが、腫瘍の断面には硬い骨形成の著しい部分と、その外殻に軟らかい骨形成の少ない部分とがみられ、軟らかい骨形成の少ない部分を移植すると肺転移を起こさない腫瘍が発育する。そこで本研究において申請者は、肺転移を起こさない腫瘍の実験モデルとしての有用性について検証するとともに、同一の実験腫瘍から発生した異なった性質を有する2つの腫瘍の細胞学特性の相違について検索した。

Os515の継代方法に従って、腫瘍を4週齢ハムスター背部皮下に移植して移植後6週間で屠殺し、各々

の腫瘍の継代移植により移植生着率、および肺転移の出現頻度を10代以降まで追跡した。また各々の腫瘍の大きさをAttiaらの計算式で算出し、増殖速度を求めた。またOs515（以下高転移系）の肺転移巣からと、肺転移の見られない腫瘍（以下非転移系）の背部腫瘍から組織片を採取し腫瘍細胞を単離してそれぞれを培養系に移し、実験材料とした。この2系統の細胞について、細胞形態、酵素活性（アルカリ性フォスファターゼ(AI-P)活性、I型コラーゲン分解活性、IV型コラーゲン分解活性)、各種レクチンによる細胞凝集能、血小板凝集能、I型コラーゲン、およびIV型コラーゲンに対する細胞接着能、再構成基底膜の通過能を測定した。

その結果、非転移系は同一条件下で12代まで継代したところ、ほぼ100%の移植率で継代移植することができ、またいづれにも肺転移は出現しないことが判明した。一方高転移系は100%継代移植でき、すべてに肺転移が確認された。肺転移は、両肺表面に 74 ± 35 個観察できた。また移植腫瘍は非転移系では成長が速く、倍加期間は高転移系の 8.1 ± 1.1 日に対し非転移系では 4.4 ± 1.2 日であった。

培養細胞の形態は、高転移系が多稜形で上皮様を呈したのに対し非転移系は紡錘形と異なっていた。またレクチンによる細胞凝集能では、それぞれの細胞系が麦芽凝集素においてのみ著しい凝集を示した。酵素活性では、AI-P活性（高転移系： 972 ± 61 n mol/分/mg蛋白、非転移系： 575 ± 34 n mol/分/mg蛋白）とIV型コラーゲン分解活性（高転移系： 9.9 ± 2.3 μ g/分/mg蛋白、非転移系： 4.8 ± 2.2 μ g/分/mg蛋白）と高転移系が有意に高値を示した。ヒト血小板濃厚液に対する腫瘍細胞の血小板凝集能を経時的な観察では、高転移系においては速やかに凝集が始まり、最大45%まで上昇したのに対し、非転移系では約40秒遅れて凝集が始まり、32%をピークに以後解離する傾向がみられた。

培養細胞のI型コラーゲン（高転移系： 72 ± 2 %/15分、非転移系： 45 ± 1 %/15分）と再構成基底膜（高転移系： 60 ± 2 %/15分、非転移系： 54 ± 1 %/15分）に対する接着性は、いづれも高転移系で有意の高値を示した。

ヌクレポアフィルター上に形成した再構成基底膜の薄膜に対するそれぞれの細胞通過能を計測したところ、高転移系では3時間後に 71 ± 1 個/単位面積がフィルター裏面に観察されたが、非転移系では3時間後に 15 ± 1 個/単位面積が通過したのみで、3時間後、6時間後ともに高転移系において有意に高い通過能がみられた。

以上の結果より、非転移系は病理組織学的に骨肉腫であるにも拘わらず転移能の消失という性質が、高い移植率で継代移植により維持できることが明らかとなり、高転移性骨肉腫 Os515と対比しうる有用な実験モデルであることが判明した。またその培養細胞での実験では、骨肉腫の肺転移成立の過程での最初の障害である血管基底膜通過能が著しく低下し、さらに血小板凝集発現の遅延がみられたことから、培養細胞レベルにおいても転移に関する性質の変化が示唆された。

本研究は、骨肉腫の動物実験モデルについて追求し、特に肺転移についての新しい実験モデルを作成し、また転移に関する生物学特性として、腫瘍細胞の基底膜通過や血管内での血小板凝集能との関係を明らかにしたものである。本研究で新たに発見された実験モデルは、ヒト骨肉腫の病態や治療法を研究する上で貴重な実験系であり、特に肺転移の機構解明に示唆を与えるものであり、本研究の意義は大きいものと高く評価された。

申請者の発表に対し、次ぎのような質疑が行われた。

- 1) 各腫瘍の正常組織との境界部での組織構造はどのようになっているか

- 2) 腫瘍内の血管系の差はみられたか、またリンパ管系の発達はみられたか
- 3) 非転移系の継代移植により組織学的変化がみられたか
- 4) 両腫瘍細胞系のレクチンレセプターの差はみられたか
- 5) 腫瘍の転移を抑制する機構はなにか
- 6) 非転移系は高転移系に戻り得るか
- 7) 再構成基底膜通過能の評価で、散布された細胞の分散をいかに補正したか
- 8) 両腫瘍細胞系の血小板凝集能の差は転移能にどのように関連するか
- 9) ハムスターへの腫瘍細胞の静注経路について
- 10) この系でみられる転移様式について
- 11) 腫瘍内の壊死部分の割合はどうか

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 梶 村 春 彦

副査 教授 山 下 昭 副査 助教授 本 郷 輝 明