

シンポジウム 婦人科癌の浸潤と転移—その基礎と臨床—

卵巣癌における転移能の獲得と変調の機序に関する研究

九州大学助教授 嘉 村 敏 治

目 的

癌は分子生物学的には正常細胞あるいは良性の腫瘍に比較して遺伝子の不安定性を有しており、そのために生ずる遺伝子変異に基づく種々の代謝、情報伝達機構等の異常が発現している細胞の集合体であるとみなすことができる。その結果、細胞生物学的には周囲の正常細胞も含めた細胞間の相互関係に変異が生じ、宿主における自律的増殖・浸潤・転移という癌特有の現象が惹起される。これらの現象を可能とする形質の発現の程度を悪性度と定義すれば、遺伝子不安定性を特徴とする癌細胞により構成される癌腫では、一旦獲得された悪性度は定常性を有することなく経時的に変化していくことが想定される。この経時的変化を解析することはすなわち癌の自然史を明らかにすることであるが、臨床癌において解析することは治療の介在等により困難である。しかしながら卵巣癌はその半数が進行癌であり初回手術後も多数の癌細胞が残存し、しかも遺伝子をその傷害の目標の一つにしている抗癌剤の曝露を治療として受ける腫瘍であるということから癌の自然史解析のモデルとすることができる。すなわち再発してくる腫瘍には自然に生じる遺伝子変異が抗癌剤により短期間に生じていることが想定され、自然史の中でみられる現象がそこに再現されている可能性がある。そこで本シンポジウムでは卵巣癌をモデルにして臨床的にとらえられた現象を基礎的実験的手法を用いて解析することにより浸潤・転移という面からみた癌の自然史を記述することを目的とした。

方 法

1. 臨床データならびに検体の解析

1) 進行卵巣癌の初発と化学療法後再発の病変の拡がりの解析. 2) 初発病巣と化学療法後再発病

巣の組織について、遺伝子変異の指標として p53 蛋白、増殖能の指標として MIB-1 蛋白、細胞接着能の指標として CD44 v6 を SAB 法による免疫組織化学染色法を用いて解析。

2. 基礎実験による解析。

1) シスプラチン投与後再発卵巣腫瘍モデルの作製：ヒト卵巣癌培養株 (HRA, KF) をヌードマウスの背側皮下に移植後直径 1cm の腫瘍形成時にシスプラチン 20mg/kg を腹腔内に投与し、24 時間後腫瘍を摘出して新たなヌードマウスの皮下に継代移植した。この操作を 6 回繰り返して樹立した株をシスプラチン処理株 (処理株) とし、シスプラチンを投与せずに継代だけを 6 回繰り返して樹立した株をシスプラチン非処理株 (非処理株) とした。これらの株を HRA, KF それぞれについて樹立し、親株、非処理株と処理株について比較実験を行った。2) 自然遠隔転移能：マウス足底部皮下に腫瘍細胞を移植後腫瘍が一定の大きさに達した時点で大腿部で移植肢を切断し、その後 HRA では 3 週間目, KF では 6 週間目における肺転移結節数を計測。3) 局所浸潤能：マウス足背部皮下の移植腫瘍の局所浸潤の態様を病理組織学的に評価。4) 実験的浸潤能：in vitro invasion assay による浸潤能の評価。5) 細胞外基質構成物質への接着能：マトリゲル, ラミニン, IV 型コラーゲン, フィブロネクチンのそれぞれでコーティングした培養プレートを用いサイミジンで標識した腫瘍細胞を播いて一定時間培養後接着した細胞の比放射能を測定することにより評価。6) 蛋白融解酵素産生能：腫瘍細胞の培養上清中 IV 型コラゲナーゼ活性をザイモグラムを用いて評価。7) 腫瘍細胞運動能：金コロイドをコーティングしたカバーガラス上で一定数の腫瘍細胞を培養し、細胞の貪食して金コロイドの欠失した部分の

面積を測定することにより細胞固有の運動能を評価。

成 績

1. 臨床データならびに組織検体を用いた解析：遠隔転移についての解析では卵巣腺癌の化学療法後再発35例のうち、遠隔転移は初発診断時3例(9%)に認められたが、再発発見時には16例(46%)で、後者において有意に高率であった($p < 0.001$)。このことは化学療法剤に曝露された卵巣癌細胞は遠隔転移能が増強していることを示唆している。免疫組織化学的に再発卵巣癌症例から採取した組織標本をそれぞれの症例の初発巣と比較したところ、MIB-1蛋白の発現は初発巣、再発巣でその発現に変化は認められなかった。p53蛋白の発現は初発の原発巣、転移巣に比し再発巣では高い傾向を認めた。これらのことより化学療法は腫瘍の増殖能には影響を与えないが、p53遺伝子にはその変異の頻度を高めていることが示唆される。CD44に関しては再発巣での発現がやや高かったが有意ではなかった。

2. 基礎実験系による解析：ヌードマウス皮下移植でみた肺転移能ではHRA, KFともに親株、非処理株に対し処理株は有意に肺転移巣形成が亢進していた。このことは抗癌剤負荷が生残した癌の転移能を亢進させることを示している。また腫瘍増殖の速度はin vivo また in vitro においても非処理株と処理株の間に差はなく、抗癌剤負荷は増殖能には影響を与えないことが示唆された。これらの転移能、増殖能に関する結果は前述した臨床癌で得られた結果と同様であることから、in

vivo で樹立した非処理株、処理株はそれぞれの臨床での初発また再発卵巣癌のモデルとして妥当であると考えられ、さらに本モデルを使用して抗癌剤による浸潤転移能増強の機序を解析した。i) 浸潤の組織学的解析：ヌードマウス移植部位での移植後一定時期でみた腫瘍の組織学的な所見は非処理株に比し処理株では非処理株に比し周囲間質への浸潤が高度であった。ii) in vitro invasion assay による解析：処理株は非処理株に比べて有意に invasion している細胞が多く、実験的にも浸潤能が高いことが示された。iii) 細胞外基質への接着能：コーティングした、いずれの基質に対しても処理株は非処理株に比し高い接着性 ($p < 0.05$) を示した。iv) 蛋白融解酵素産生能：zymogram にてHRA, KFともに処理株における92 kDaのIV型コラゲナーゼ活性が非処理株に比し著明に増強していた。v) 細胞運動能の解析：HRA, KFともに処理株が非処理株に比し金コロイドの貪食面積が有意に拡大しており、処理株の細胞固有運動性の増強が認められた。

結 論

化学療法後の再発卵巣癌症例に認められた転移能の亢進は、実験癌モデルにおいても同一の傾向が確認された。この転移能亢進には浸潤能の増強が関与し、この増強は少なくとも接着能、蛋白融解酵素活性および運動能の各々に対する薬剤固有の修飾の総和として表現されることが示唆される。このことは癌の自然史の中で遺伝子変異により惹起される悪性度の変調は増強の方向に向かうということを示している。