

シンポジウム3 卵巣癌の進展とその制御

細胞間相互作用からみた卵巣癌腹膜播種の進展機序と
その制御に関する研究

九州大学講師 小林 裕 明

目 的

卵巣癌の特徴的進展様式である腹膜播種は卵巣癌治療成績の向上を困難にしている要因の一つであるが、播種巣の形成には宿主側の要因が大きく関与するため、その分子機構に関する研究には腹膜中皮を始めとする間質細胞が共存した実験系を用いることが重要であろう。我々はこれまでに腫瘍細胞—間質細胞間の細胞間相互作用に着目して研究を進め、癌細胞がその進展の過程で間質細胞に与える変化につき報告してきた。本研究では卵巣癌の腹膜播種形成過程において癌が間質に与える影響を細胞骨格に着目して解析し、その結果から細胞骨格関連遺伝子を標的とした遺伝子治療の基礎的検討を行うことを目的とした。この主旨に沿って、1) 間質細胞の主たる細胞骨格蛋白である平滑筋型 α アクチン(α -SMA)とアクチンの安定化を促進するアクチン結合蛋白であるカルポニン h1(CNh1)に及ぼす卵巣癌の影響を明らかにし、2) CNh1 遺伝子を導入した場合の卵巣癌腹膜播種に対する治療効果を、腹膜中皮細胞および卵巣癌細胞自体に与える効果の両面から検討した。

方 法

1. 卵巣癌細胞が間質細胞の細胞骨格関連蛋白に与える影響に関する検討

1) 良性卵巣腫瘍、境界悪性卵巣腫瘍、卵巣癌原発巣および腹膜播種巣の組織を用いて α -SMA と CNh1 の発現を免疫組織化学染色にて検討した。2) 卵巣腫瘍の内容液あるいはヒト卵巣癌細胞株の培養上清を腹膜中皮細胞株あるいは線維芽細胞株の培地に加えて、両株の α -SMA と CNh1 発現(以下ウエスタンブロット法)と細胞骨格(以下ローダミン・ファロイジン染色)に与える影響を検討した。3) 血小板由来増殖因子(PDGF)は線維

芽細胞の α -SMA 発現を低下させるが、その中和抗体を卵巣腫瘍内容液と卵巣癌細胞培養上清に加えて線維芽細胞に作用させた場合、 α -SMA 発現がどう変化するか検討した。また、卵巣腫瘍内容液中の PDGF 濃度を ELISA 法にて測定した。4) 腹膜中皮細胞層にヒト卵巣癌細胞を重層培養し、癌細胞の進入に伴う中皮細胞の形態的变化および α -SMA と CNh1 の発現変化(免疫染色)を観察した。

2. 腹膜中皮細胞への CNh1 遺伝子導入がもたらす卵巣癌細胞の浸潤抑制効果に関する検討

1) 腹膜中皮細胞株にアデノウイルスベクターを用いて CNh1 を遺伝子導入し、その細胞形態および細胞骨格の変化と α -SMA 発現量の変化を検討した。2) この中皮細胞層に対する卵巣癌細胞の浸潤能を重層培養法により検討した。

3. 卵巣癌細胞への CNh1 遺伝子導入がもたらす増殖能と浸潤能の変化に関する検討

1) ヒト卵巣癌細胞株に CNh1 遺伝子を導入し、その細胞形態および細胞骨格の変化と α -SMA 発現量の変化を検討した。2) CNh1 遺伝子導入がその増殖能に与える変化を培養細胞倍加時間、軟寒天内コロニー形成率およびヌードマウス移植腫瘍にて評価した。3) CNh1 遺伝子導入がその浸潤能に与える変化をマトリゲルコーティングポアフィルターを用いた in vitro invasion assay および腹膜中皮細胞との重層培養法により検討した。浸潤能規定因子である細胞接着能と細胞運動能における変化はそれぞれ、ラベルした卵巣癌細胞の腹膜中皮細胞層に対する接着率およびトランスウェルチェンバーを用いた motility assay にて評価した。

4. 腹膜中皮および卵巣癌細胞への CNh1 遺伝子導入による腹膜播種の制御に関する検討

腹膜中皮細胞株および卵巣癌細胞株にアデノウイルスを用いて CNh1 遺伝子を導入後、重層培養法を用いて癌細胞浸潤の抑制効果を評価し、それぞれ単独の細胞に遺伝子導入した場合の抑制効果との比較を行った。

成 績

1. 卵巣癌細胞が間質細胞の細胞骨格関連蛋白に与える影響に関する検討

1) 卵巣腫瘍の間質で α -SMA と CNh1 を強発現する血管壁(血管平滑筋細胞と周細胞)に着目すると、良性卵巣腫瘍の間質では血管壁が両者共に強く連続性に染色されたのに対し、卵巣癌の場合は両者共に明らかに染色性が低下し、特に CNh1 に無染色の血管を多く認めた。境界悪性腫瘍では主として CNh1 発現の低下が生じていた。腹膜播種巣の間質では原発巣同様、両者の染色性の低下(CNh1の方が顕著)を認めた。2) 線維芽細胞株の α -SMA と CNh1 発現は癌細胞培養上清の添加によって用量依存的に減弱し、この低下は CNh1 の方が顕著であった。腹膜中皮細胞でも同様の傾向を認めると共に細胞骨格の変化が生じ、単層培養時には細胞間の開裂が生じた。3) 卵巣腫瘍内容液中の PDGF は良性腫瘍ではほとんど検出されないのに対し、境界悪性から癌になるにつれてより高濃度に検出された。PDGF の中和抗体は卵巣癌由来の液性因子が線維芽細胞に引き起こす α -SMA の発現低下を回復させた。4) 中皮細胞層への癌細胞の侵入に先立って中皮細胞間に開裂が生じ、侵入部周囲の中皮細胞は培養面より離脱した。この開裂に先立ち、中皮細胞で α -SMA と CNh1 の発現低下を認めた。

2. 腹膜中皮細胞への CNh1 遺伝子導入がもたらす卵巣癌細胞の浸潤抑制効果に関する検討

1) CNh1 を遺伝子導入した腹膜中皮細胞は卵巣癌の培養上清存在下でもその形態は変化せず、細胞間の開裂も生じにくい傾向を認めた。外来性 CNh1 の局在に一致したアクチンファイバーの形成を認め、 α -SMA 発現の亢進も確認された。2) CNh1 遺伝子導入腹膜中皮細胞層は卵巣癌細胞の浸潤を有意に抑制した。

3. 卵巣癌細胞への CNh1 遺伝子導入がもたら

す増殖能と浸潤能の変化に関する検討

1) ヒト卵巣癌細胞株は全株とも CNh1 は発現するが α -SMA の発現は認めなかった。CNh1 導入によりアクチンファイバーの形成が促進され α -SMA 発現も誘導された。2) CNh1 導入により癌細胞の培養細胞倍加時間は変化しないものの、軟寒天内コロニー形成率およびヌードマウス移植時の増殖能は低下した。3) CNh1 導入による癌細胞浸潤能の低下が in vitro invasion assay と重層培養法の両者で確認された。浸潤能低下に伴い細胞運動能が有意に抑制されていたが、細胞接着能には変化を認めなかった。

4. 腹膜中皮および卵巣癌細胞への CNh1 遺伝子導入による腹膜播種の制御に関する検討

腹膜中皮細胞株および卵巣癌細胞株に CNh1 を同時に遺伝子導入すると、癌細胞による腹膜中皮細胞層への浸潤は強く抑制された。それぞれ単独の細胞に導入した場合に比し、その抑制効果は相加的であった。

結 論

本研究により卵巣癌が液性因子を介して宿主間質の細胞骨格を変化させ、自己の浸潤を有利にしている可能性が示唆された。 α -SMA の発現を調節・制御する CNh1 を標的とした卵巣癌腹膜播種に対する遺伝子治療は、腹膜中皮を介しての癌細胞浸潤抑制効果と卵巣癌自身に対する抗腫瘍効果(抗浸潤・抗増殖)の両面からの治療効果が期待された。すなわち腹膜中皮における CNh1 強制発現は、卵巣癌細胞による CNh1 および α -SMA 抑制効果に拮抗して中皮細胞の細胞骨格を安定化させ、中皮層を越えての癌細胞浸潤を抑制すると考えられる。一方、癌細胞自身に CNh1 が強制発現されれば、増殖抑制に加えて細胞運動能の低下を介した浸潤抑制ももたらされ、播種巣の形成のみならず一旦成立した播種巣に対しても効果が期待できると考えられる。卵巣癌腹膜播種に対する CNh1 遺伝子治療あるいは CNh1 発現誘導を標的とした薬剤の開発は、同一遺伝子が癌は抑制し宿主間質の防御能は増強させるという二面性の効果を有する新しい概念の治療となる可能性がある。