

# 論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成8年度 博士課程 入学

氏名 宇山 理奈

指導教官名 佐々木 伸雄

論文題目 犬猫乳腺癌細胞株の樹立と転移関連因子に関する研究  
—Eカドヘリンおよび $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ カテニンについて—

乳腺腫瘍は雌犬および雌猫において非常に発生率の高い腫瘍のひとつであり、悪性症例では高率に転移を起こすが、特に猫では臨床的に早期の癌でもすでに転移を起こすことがあるといわれる極めて悪性度の高い腫瘍である。転移は癌の最も重大な合併症であり、患者の予後を規定する重要な因子であることから、癌転移の制御はその予後を著明に改善すると考えられる。乳腺腫瘍の転移に関する基礎的研究は、人やマウス、ラット等に発生した乳腺腫瘍から樹立された培養細胞株を用い、細胞レベルを含めた様々な側面から行われてきた。しかし、人の本症と病態が類似し、そのモデルとして有用と考えられる犬、猫の本腫瘍から樹立された細胞株は必ずしも多くはなく、また特に猫の本腫瘍の細胞株樹立は非常に困難とされており、現在までに樹立された細胞株数は非常に少ない。

一方、癌の転移は複雑な段階を経て成立すると考えられているが、近年これらの各段階の中で様々な接着因子の関与が注目されている。カドヘリンおよびカテニンは通常上皮細胞において細胞間接着および組織構築に重要な役割を演じている接着因子である。これらの因子は癌の転移過程で最も重要な段階のひとつといわれる癌細胞の原発巣からの離脱と、標的臓器での再接着の局面に深く関与していると考えられている。

以上の背景のもとに、本研究においてはまず第一に犬と猫の乳腺癌原発巣由来および転移巣由来の細胞株それぞれからの樹立を試みた。次にそれらの乳腺癌細胞株を用いて転移能と相関するといわれる細胞運動能を測定した。さらに各細胞株におけるEカドヘリンと $\alpha, \beta, \gamma$ カテニンの発現、およびEカドヘリンについてはその機能についても測定した。これらの結果をもとに、原発巣—転移巣由来細胞間および犬—猫細胞間を比較し、犬と猫の乳腺癌の転移機構におけるカドヘリン—カテニン系の重要性について検討した。

第1章の序論に続き、第2章では犬および猫乳腺癌細胞株を臨床例から樹立した。樹立した犬乳腺癌細胞株は同一症例の原発巣由来細胞株—転移巣由来細胞株が4対、合計8株であり、それぞれCHMp, CHMm, CIPp, CIPm, CTBp, CTBm, CNMp, CNMmと命名した。これらの細胞株は形態学的、またヌードマウスにおける転移能では原発—転移株間の差異は必ずしも明瞭ではないものの、これまでに90~160継代の培養が続けられており、長期間の継代においてもいずれも形態、増殖等安定した状態が維持されていることから、犬乳腺癌細胞株として有用な材料と考えられた。一方、樹立した猫乳腺癌細胞株は原発巣由来細胞5株、転移巣由来細胞3株の合計8株であり、それぞれFYMp, FKNp, FONp, FMCp1, FMCp2, FONm, FMCm およびFNNmと命名した。なお、このうち同一症例から原発—転移を対で樹立した細胞株は、2症例より計5株であった。これらもすでに40~150継代の培養が続けられており、いずれの株も安定した増殖を維持している。原発—転移株をそれぞれ比較すると、原発株は転移株に比べ腺構造を呈した細胞増殖形態を示す株が多く認められた。それ以外の特徴では原発—転移株間の差異は必ずしも明瞭ではなかった。一方、猫乳癌細胞のヌードマウスへの皮下移植後、遠隔転移を起こす細胞株は、犬株と比較して少なかった。しかし樹立されたこれらの細胞株は長期間の継代においても形態、増殖等安定した維持をしていることから、猫乳腺癌細胞株として有用な材料と考えられた。また、これまでに犬および猫乳腺癌から原発—転移由来細胞が対で株化された報告はないことから、これらの細胞株が犬、猫乳腺癌の転移に関する研究において非常に貴重な材料になると考えられた。

第3章では樹立した犬および猫乳腺癌の原発株と転移株を用いてそれぞれの運動能を測定し、細胞自体が持つ運動能が原発—転移間でどのように変化を起こしているか比較し、細胞の運動性と転移能との間に何らかの相関性があるのかどうか検討すると同時に、犬と猫の癌細胞

間における差異についても検討した。その結果、犬細胞株での運動能は原発巣／転移巣という由来に無関係に細胞によって大きく異なっていた。また猫細胞株においても、犬と同様に原発巣一転移巣の間に一定の傾向は認められなかった。これらの結果より、犬・猫乳腺癌細胞の転移は、必ずしも細胞運動能の亢進と相関しないことが示された。犬一猫間で比較すると、猫細胞株における運動能は犬細胞株に比べ低値を示し、猫細胞株のヌードマウスへの細胞移植による転移率の低い結果と関連するものと考えられた。猫では临床上、病期の早期にすでに肺転移を示す症例が犬よりもはるかに多いにも関わらず、ヌードマウスへの細胞移植実験では低転移性を、また細胞運動能実験では低値を示したことから、猫乳腺癌における細胞運動能には猫生体内の微小環境に重要な因子が存在する可能性が示唆された。一方、犬細胞では猫ほど生体内微小環境に左右されず、癌細胞自身が常に高い細胞運動能を維持させることが可能である傾向を持つことが示唆された。

第4章では癌転移の最も重要な段階の一つである癌細胞の腫瘍組織からの離脱と、標的臓器での再接着に関わると考えられている細胞一細胞間接着分子カドヘリンの発現および機能を、またカドヘリンの裏打ち蛋白である $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ カテニンの発現を測定した。その結果、犬および猫いずれの乳腺癌細胞においてもEカドヘリン機能は、同一症例の原発一転移巣間で比較した場合、原発巣で弱く、転移巣でより強いことが認められた。このことは、原発巣における低いEカドヘリン機能が細胞間接着能の減弱を示しており、原発巣において癌細胞がより離脱しやすい状態であることを示唆すると考えられた。また逆に、転移巣における高いEカドヘリン機能は転移巣における癌細胞接着能の増強を示しており、これらの細胞が腫瘍組織塊の再形成により適した状態にあることが示唆された。このように犬および猫乳腺癌細胞は、転移の段階によりEカドヘリン機能の発現レベルを変化させている可能性が考えられ、Eカドヘリンが犬・猫乳腺癌の転移過程において重要な役割を持つ因子であることが示唆された。

一方、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ カテニンはEカドヘリンの細胞内ドメインと結合している裏打ち蛋白である。これらはさらに細胞内骨格などと結合しており、情報伝達の役割を持つという可能性も示唆されていることから、これらカテニン系が実際の細胞一細胞間接着を司る細胞外Eカドヘリンの機能を制御している可能性も考えられている。そこで、さらに犬・猫乳腺癌細胞株におけるカテニン系の発現を測定した結果、9株中7株の猫乳腺癌細胞において $\beta$ および $\gamma$ カテニンが欠損していることが認められた。一方犬乳腺癌細胞においては、 $\beta$ および $\gamma$ カテニン両方が欠損している細胞株は認められなかったが、 $\beta$ カテニン欠損株が一つ認められ、これは従来報

告されていない結果であった。

一般にカドヘリン-カテニン複合体はEカドヘリンと $\beta$ カテニンがまず結合し、次に $\alpha$ カテニンが $\beta$ カテニンを介してEカドヘリンと結合する。また $\gamma$ カテニンは $\beta$ カテニンファミリーのメンバーの一つと考えられているため、 $\beta$ カテニンの代わりにその役割を果たすことができると考えられている。しかしこれらの猫の7株では $\beta$ 、 $\gamma$ カテニン両方が欠損していたことから、 $\alpha$ カテニンがEカドヘリンに直接結合しているか、または $\beta$ 、 $\gamma$ カテニン以外の蛋白を介して結合していることが示唆された。現在までにそのような結合を示す可能性を示唆する細胞は全く報告されておらず、 $\beta$ カテニン欠損細胞株の報告もない。これら猫乳腺癌細胞7株の中にはすべての原発巣由来細胞5株が含まれており、前述したように猫乳腺癌症例は臨床病期の早期に高率に転移を起こすという特異的な転移動態を示すことから、その転移機構にはこれらカテニン系の異常が関与する可能性も示唆された。 $\alpha$ カテニン分子の欠損は、いずれの犬・猫乳腺癌細胞においても認められなかったことから、Eカドヘリン機能が $\alpha$ カテニンの発現の変化により制御されている可能性は示唆されなかった。なお、各癌細胞株でのカドヘリン-カテニン系の発現や機能と細胞運動能、ヌードマウスへの細胞移植後の転移能との間には一定の傾向は認められなかった。このことは、犬と猫の乳腺癌の転移において、カドヘリン-カテニン系の発現レベルの低下やカドヘリン機能の低下は転移の必須条件の1つである可能性はあるが、直接的に細胞運動能の亢進や、ヌードマウスへの細胞移植後の転移能に関しては必ずしも絶対的条件ではないと考えられた。

以上の結果から、犬と猫の乳腺癌における転移の成立過程の1条件としてEカドヘリン機能の変化やカテニン系の異常が深く関与することが示唆された。原発巣からの癌細胞の遊離を阻止することが転移抑制の1手段と考えられるが、本研究の結果は、犬・猫乳腺癌においてカドヘリンを介した細胞接着能の亢進やカテニン系の機能亢進といった方法によって、これらの癌の転移を早期に阻止できる可能性を示唆するものであり、新しい癌転移の治療への応用が期待できると考えられた。