

論文の内容の要旨

論文題目 自然発生性中皮腫細胞株の樹立とその特性に関する研究

氏 名 桑原真紀

悪性中皮腫は漿膜を形成する中皮細胞を起源とする腫瘍で、哺乳動物では胸腔および腹腔にみられる。発生頻度はいずれの動物種でも低く、比較的まれな腫瘍と考えられている。一方、ヒトではアスベスト鉱山労働者やアスベストの優れた耐火性を利用した製品を扱う建築労働者等で発生が多いことから、労働災害の一つに認定されている。また、防火建築の解体現場における作業者の安全や学校における学童の健康問題として近年注目を集めている。本腫瘍は、潜伏期は長い、いったん発症すると進行が迅速で、致死率が高いのが特徴で、治療面では化学ないし物理的治療に耐性が強く、現在も有効な治療法が見出されていない。

本腫瘍の発生とアスベスト吸入との関連や腫瘍の発生のメカニズムに関する研究の歴史は長く、多くの業績が蓄積されている。現在では、アスベスト線維を貪食したマクロファージが産生する酸素フリーラジカルが中皮細胞のDNAを傷害することにより悪性中皮腫が惹起されると言われているが、本腫瘍の潜伏期が長いことについての説明は未だついていない。また、効果的な治療法を確立するために必要な基礎的研究として、既存の悪性中皮腫の形態学的特徴を精査することに加え、ヒト悪性中皮腫細胞株や腫瘍片をヌードマウスに接種して腫瘍を再現したり、アスベスト投与によりげっ歯類に腫瘍を誘発して得た悪

性中皮腫を用いた *in vivo* ないしこれらの腫瘍から分離した細胞を用いた *in vitro* の実験系を用い、本腫瘍の生物学的特性を調べるための実験的なアプローチも行われつつある。このような実験モデルは、ヌードマウスという遺伝的に特殊な生物学的環境下や、アスベストの化学的ストレスが常に加わっている状態下で行われている。また一方で、悪性腫瘍はいったん形成されると、その発生原因とは無関係に自立的増殖をする性質がある。このようなことから、動物に自然発生した悪性腫瘍細胞の純粋な生物学的性状を調べることも、治療法の開発上大いに意義あることと考えられる。

申請者は、老齢 F344 雄ラットに 4%前後の頻度で自然発生性の中皮腫が見られることに着目した。まず、自然発生性中皮腫を有する 3 例の F344 ラットの腹水から中皮腫細胞株 (MeET-4、-5 および 6) を樹立した。これらの細胞株の起源腫瘍のうち、2 株 (MeET-4 および 6) は乳頭状増殖を示す上皮型であったが、他の 1 株 (MeET-5) では上皮性のパターンに加え紡錘形の腫瘍細胞から成る肉腫様増殖部分も観察され、継代中持続して二相性の増殖パターンを示した。増殖パターンは異なるものの、これら三つの細胞株の細胞は、すべてビメンチンおよびケラチン陽性を示した。また、電子顕微鏡観察では細胞質内に豊富なグリコーゲン顆粒をもち、細胞表面には多数の微絨毛が認められた。染色体数の中央値は 41 から 71 までばらつき、異常染色体も多数認められた。樹立した細胞株はすべて軟寒天培地でコロニーを形成し、また、近交系である同系統のラットに容易に移植でき、腫瘍細胞としての悪性度の高さを示していた。さらに、細胞株は低濃度の FBS 環境下でも増殖可能であったことから、十分でない培地環境下での増殖を可能にする成長因子を自ら産生していることが示唆された。

樹立した中皮腫由来細胞株が同系ラットに対して移植が可能であることが示されたので、次に、これらの細胞を移植して得た腫瘍を形態学的および免疫組織学的に検索した。細胞株の起源腫瘍は大部分単純な乳頭状増殖パターンを示す上皮様腫瘍であったのに対し、移植腫瘍では腺腔を伴う上皮様、肉腫様およびこれらの混合型などの多様な形態像を示した。細胞株は α -平滑筋アクチン (ASMA) 陰性で、デスミン陽性であったが、移植腫瘍中の細胞はすべて ASMA 陽性でデスミン陰性であり、起源腫瘍と同じであった。これらの結果から、F344 中皮腫細胞は培養環境下で多彩な分化能を有していることが示唆された。また、*in vivo* で獲得される微細環境因子が中皮腫細胞の分化能を修飾し、ひいては形態的な特徴を発現させるものと考えられた。これらの因子は、培養環境下ではいったん消失するが、*in vivo* で再び発現する腫瘍細胞の ASMA に関連している

と考えられる。このように、ラット自然発生性中皮腫細胞由来の細胞株は、培養条件によく順応し、同系ラットに対する可移植性も旺盛であった。さらに、この細胞株を同系ラットに移植継代すると、ヒト悪性中皮腫に観察される形態学的な多様性を再現することが可能であった。

上述した検索結果から判断して、ラット自然発生性中皮腫由来細胞株を用い、ヒトあるいは実験動物のアスベストと関連した悪性中皮腫における活発な増殖や転移を修飾していると考えられている成長因子の変化について検索を行うことは、この腫瘍の生物学的特性を知る上で重要であると考えられた。そこで、アスベストと関連した悪性中皮腫細胞で、その可移植性および軟寒天コロニー形成能に深く関わっていることが知られている transforming growth factor- β (TGF- β) について、MeET-4 および-6 を用いてその産生を検索し、さらに、この成長因子と腫瘍細胞の増殖能との関わりを調べた。細胞株の培養上清中の TGF- β の生物活性を CCL64 ミンク肺上皮細胞増殖抑制法で測定したところ、中皮腫細胞ではラット正常中皮細胞の 30 から 70 倍の値を示した。RT-PCR 法で解析した TGF- β mRNA の発現レベルも同様に中皮腫細胞で顕著に高かった。2つの腫瘍細胞株では、MeET-4 における生物活性および mRNA 発現量は MeET-6 よりも高くかつ多かった。MeET-4 をアンチセンス TGF- β 1 オリゴヌクレオチド (ODN) で処理すると、足場依存性および非依存性増殖がともに抑制された。外因性 TGF- β 1 は悪性中皮腫細胞株の増殖には影響を与えなかったが、休止状態の正常中皮細胞の増殖を軽度促進した。したがって、ラット自然発生性悪性中皮腫細胞では TGF- β が autocrine 機構を介して産生され、その悪性度の高い増殖活性をもたらしていると結論した。

TGF- β は多機能を有する成長因子であり、そのファミリーには 3 種のアイソマーが含まれている。本論文では、TGF- β 1 についてのみ mRNA の定量をした。また、autocrine 機構の形成とその機能についてのアンチセンス ODN を用いた実験も TGF- β 1 のみに絞って実施した。ヒト悪性中皮腫ならびにアスベスト誘発性げっ歯類モデルでは、TGF- β 1 と- β 2 の腫瘍組織中での局在や細胞増殖への関わりが異なるという報告がある。したがって、今後、ラット自然発生性中皮腫でも TGF- β のアイソマーによる産生、分布ないし機能の差の有無等について検索する必要がある。

アンチセンス TGF- β ODN 処理により腫瘍細胞の TGF- β 産生を抑制する実験は、アスベスト誘発マウス悪性中皮腫で行われており、今回のラット自然発生性中皮腫における結果はこれによく一致した。したがって、腫瘍細胞の増殖における TGF- β 1 の機能は、中皮腫という腫瘍そのものの特性であり、中皮腫

の発症機転との密接な関連は無いものと考えられる。ラット自然発生性中皮腫細胞株を用いて得られた生物学的データは、化学物質暴露などの人為的な影響を除外した環境で得られる中皮腫の増殖特性を示すものであり、ヒト悪性中皮腫の増殖機構の検索にも有用であると考えられた。

F344 雄ラットにおける自然発生性中皮腫は、旺盛な播種性転移能を有する。今回樹立した細胞株も、同系ラットに対する可移植性を示した。また、この腫瘍細胞株で示された多量の TGF- β の産生は、腫瘍の転移プロセスにおいて、免疫抑制、血管新生などとともに、autocrine ないし paracrine 機構により腫瘍細胞や周囲の正常細胞の細胞外マトリックス合成に影響し、細胞間接着を司る分子に変化をもたらすことが報告されている。本細胞株は、悪性中皮腫の細胞特性を調べる上でも、また、*in vivo* および *in vitro* における細胞接着メカニズムを検索する上でも有効であると考えられる。

上述したように、申請者が本研究で新たに確立した中皮腫細胞株は、培養条件によく順応し、同系ラットに対する可移植性も旺盛であり、さらに、ラットに移植継代するとヒト悪性中皮腫で頻繁に観察される形態学的な多様性を示した。また、この細胞株は腫瘍の自律的な増殖や活発な転移を修飾する成長因子のひとつである TGF- β を多量に産生した。この自然発生性中皮腫細胞株を用いることにより化学的負荷のかかっている状態でも中皮腫細胞の特性を観察することが可能となった。さらに、その特性をアスベスト関連の悪性中皮腫のものと比較検討することにより腫瘍発生や増殖に関わるアスベストの役割を予測し、ひいては悪性中皮腫の有効な治療法を開発する上で非常に重要な手がかりを得ることができる。このように、本研究の成果は、今後悪性中皮腫の本態の解明と治療法の開発に大いに寄与するものと考えられる。