

大腸癌肝転移形成時における癌細胞と宿主との相互作用

平成9年度進学 石井 秀樹
指導教官 入村 達郎

〔はじめに〕

癌転移の成立は、1889年に Paget が提唱した seed and soil 説にあるように、癌細胞の有する性質と転移先の臓器環境との両方により決定されると考えられている。このような癌細胞と宿主との相互作用を理解することは、副作用の少ない新しいタイプの抗癌剤としての転移治療薬を開発するためにも必須である。しかし、相互作用の実体は明らかでないため解析が困難であった。私はこのような状況に鑑み、免疫系の細胞の寄与も考慮しようという意味で、同種同系癌細胞による大腸癌肝転移モデルを用いて、転移形成に最も影響の大きい宿主側の細胞を見出し、その相互作用に関与する分子を明らかにすることを目的とした。C57BL/6 マウスと同系の大腸癌細胞株 colon 38 を用いて以下の実験を行った。(1) 肝に到達した癌細胞が転移形成に至る過程をステップに分けて細胞組織学的に観察する。(2) 腫瘍組織内に見出された宿主細胞が転移形成にどのように関与するかを査定する。(3) これらの細胞の相互作用を in vitro で解析するモデルを開発する。(4) これらのモデルを用いて関与する因子を同定する。

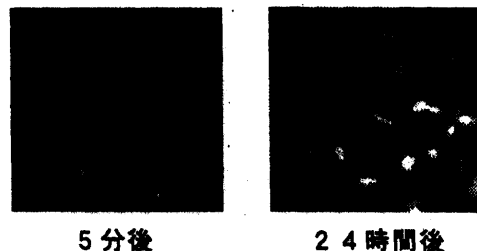
〔方法と結果〕

1. 微小転移の形成と転移腫瘍の形成

1-1. colon 38 細胞の脾臓内投与による肝臓での初期分布

血行性転移する癌細胞の初期分布を観察するため PKH 26 で蛍光標識した colon 38 細胞を同系マウスの脾臓内に投与し、5分後、24時間後に生体微弱蛍光顕微鏡を用いて肝臓での colon 38 細胞の分布を観察した。5分後には、colon 38 細胞は門脈内に留まっていたが、24時間後には類洞内に移動している細胞が観察された (Fig. 1)。この結果から、一度癌細胞は門脈内に留まり、何らかの要因で類洞内に移動すると考えられた。

Fig. 1 生体微弱蛍光顕微鏡で解析した colon 38 細胞の脾臓内投与後の肝臓での分布



5分後

24時間後

1-2. colon 38 細胞の肝転移形成過程での宿主の応答

転移巣の形成とその際の宿主の応答を経時的に観察した。2 × 10⁶ 個の colon 38 細胞を脾臓内投与4分後に脾臓を摘出した。1週間または4週間後に肝臓を摘出して凍結切片を作製し、宿主の応答を観察するため Table 1 に示す抗体を

Table. 1 免疫組織染色に用いた抗体と colon 38 細胞脾臓内投与1週間後の肝転移巣の染色パターン

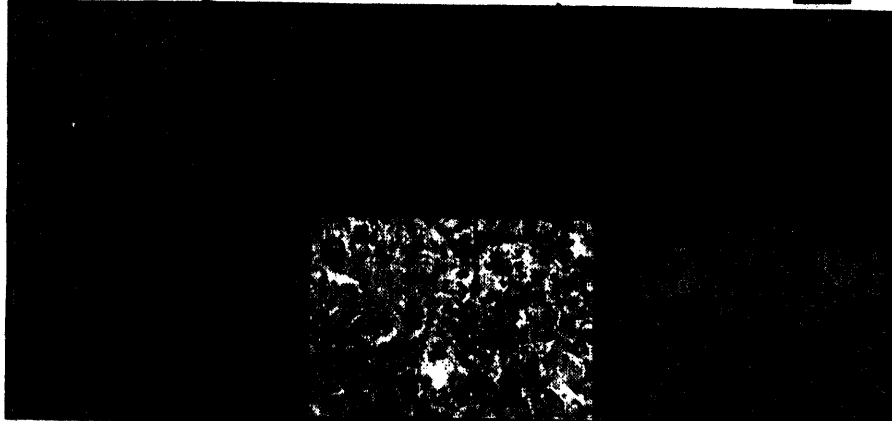
抗体	抗体に認識される細胞・分子	1	2	3
CD31	Endothelial cell	-	-	+
F4/80	Macrophage	+	+	+
LOM-14	Macrophage Lectin	+	+	+
ER-TR7	Fibroblast	+	+	+
AZAN	Collagen	-	+	+

用いて免疫組織化学染色を行った。また、AZAN 染色により結合組織を同定した。

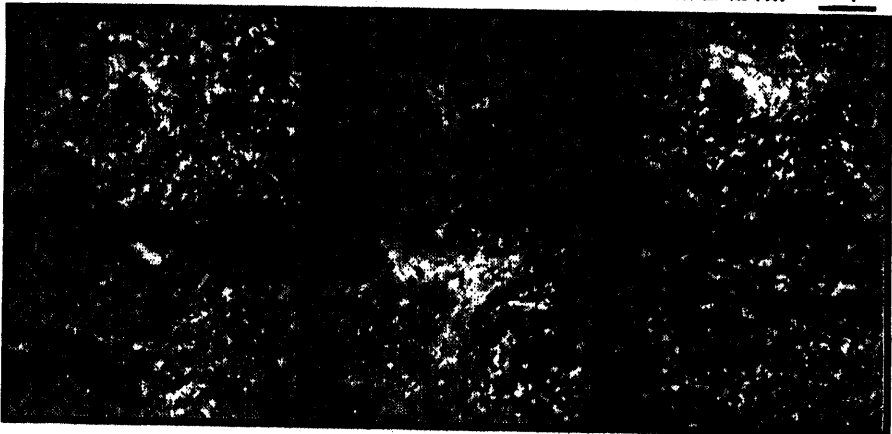
1 週間後の肝臓では直径約 1 mm の微小転移が存在し、染色の結果、Table 1 に示すような 3 パターンが観察された。(Fig. 2A)。この結果から、ごく初期の段階でマクロファージと繊維芽細胞の集積が起こり、その後に、結合組織形成、血管新生が起きると考えられた。また、癌細胞と宿主の細胞は個々に互いに隣接していることも明らかとなった。これに対し、4 週間後では直径約 3 mm 以上の転移巣が

Fig. 2 colon 38 細胞の脾臓内投与肝転移巣の免疫組織染色
用いた抗体は、a: CD31、b: F4/80、c: LOM-14、d: ER-TR7、
e: normal rat IgG、f は AZAN 染色。矢印は陽性細胞を示す。

A. 脾臓内投与1週間後の肝転移巣の一例 (点線内は転移巣) 20 μ m



B. 脾臓内投与4週間後の肝転移巣 (点線内は腫瘍内の結合組織) 40 μ m



形成された。全ての転移巣が AZAN 染色陽性であった。また、上記したほとんどの宿主の細胞は、結合組織中に癌細胞とは分離して存在していた (Fig. 2B)。この結果から、転移巣が形成されていく過程で組織の再構築が起こっていることが示唆された。

2. 宿主細胞の肝転移腫瘍の確立過程における重要性

マクロファージや血管内皮細胞などの宿主細胞に影響を与える薬剤を投与し、colon 38 細胞による転移巣の形成に対する影響を検討した。マクロファージ除去作用を有する dichloromethylene diphosphate の liposome 封入剤 (DMDP-liposome) とマクロファージ賦活化作用のある OK-432 は colon 38 細胞脾臓内投与 2 日前から、血管新生阻害剤である TNP-470 は 10 日後から 4 週間後の肝臓摘出までそれぞれ投与した。4 週間後の colon 38 細胞の肝転移結節を計測し、さらに、1-2 と同様に免疫組織化学染色を行った。肝転移結節数は OK-432 では約 40%、TNP-470 投与では約 30% に減少し、DMDP-liposome 投与では約 150% に増加した。薬剤投与群、非投与群で組織の状態に明確な違いは認められなかった。以上より、薬剤投与により転移結節数は変化するが、形成された結節における組織形成はその影響を受けないことが示唆された。

3. 癌細胞と宿主の細胞との相互作用の in vitro での解析

3-1. colon 38 細胞の green fluorescent protein (GFP) トランスフェクタントの作製

colon 38 細胞の転移形成過程を長期間に渡って観察する目的で、colon 38 細胞に GFP を発現さ

せた。colon 38 細胞に p-EGFP ベクターをトランスフェクトしてクローンを得た。さらにこのクローン中の GFP 高発現細胞をセルソーターにて分取した。得られたトランスフェクタント細胞は、脾臓内投与により肝転移巣が形成された。しかし、肝転移巣の凍結切片を蛍光顕微鏡で観察したところ、GFP による蛍光は検出できず、in vivo での長期の観察には適さないことがわかった。この GFP トランスフェクタント細胞は、以下に述べるように in vitro で複数の細胞を共培養する際に細胞を識別する目的で利用した。

3-2. 腫瘍組織再構築の in vitro モデルの作成とこれに関与する因子の検討

腫瘍肝転移形成後期において colon 38 細胞と宿主の細胞が分離するメカニズムを検討するため、in vitro モデルの作成を試みた。colon 38 細胞とその GFP トランスフェクタントとの共培養では、両細胞は個々の細胞が混在して存在していた。それに対し、colon 38 細胞の GFP

トランスフェクタントと同系マウス由来の繊維芽細胞株 NIH3T3 を共培養すると、コンフルエントになっても両細胞は個々の細胞としては混在することはなくコロニーを形成して分離して存在していた (Fig. 3)。これは 4 週間後の肝転移巣の形態と類似しており、組織の再構築に関与する因子を同定するためのモデルとして利用できると考えられた。

3-3. colon 38 細胞と肝類洞内皮 (HSE) 細胞との相互作用

肝臓特異的血管内皮細胞であり類洞を形成する HSE 細胞の単離法を確立し、colon 38 細胞との相互作用を検討した。その結果、HSE 細胞の培養上清が colon 38 細胞の運動性と増殖性を有意に促進することが判明した (Fig. 4)。この結果から、肝転移のごく初期の段階で HSE 細胞の産生する液性因子が、colon 38 細胞を類洞内に引き寄せ、さらに肝臓での増殖を促進する可能性が示された。

[まとめと考察]

癌の治療が困難なのは、癌が診断されたときに既に微小転移巣が形成されていることが多いためである。従って、癌細胞が原発部位を離れて遠隔部位に到達し微小転移巣を形成するまでの過程を阻害することによっては、治療効果は期待できず、むしろ微小転移形成以降の過程の阻害が重要であると考えられる。今回、私は colon 38 細胞が肝臓に定着して微小転移巣から大きな転移巣が形成される過程において、癌細胞と宿主のマクロファージ、繊維芽細胞、血管内皮細胞が個々に互いに隣接して存在している状態から、ほとんどの宿主の細胞が結合組織中に存在し、癌細胞とは分離している状態になるという興味深い知見を見出した。ここでは、癌細胞と宿主の細胞との間で組織の再構築が起きていると考えられ、両者の間に何らかの相互作用があることが強く示唆された。今回、in vitro のモデルを作製したが、この相互作用に関与する分子の同定には至っていない。今後このモデルの解析を進めることにより、腫瘍組織再構築の分子機構を明らかにしていきたいと考えている。

Fig. 3 colon 38-GFP transfectant と NIH3T3 細胞 または colon 38 細胞との共培養

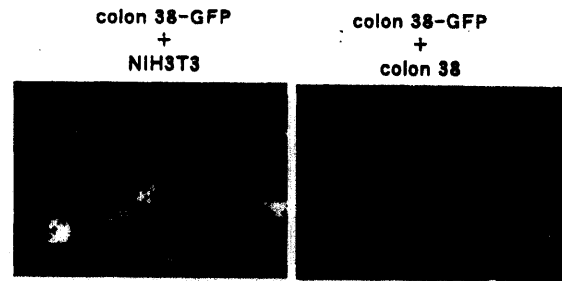


Fig. 4 HSE 細胞培養上清の colon 38 細胞の増殖性と運動性に対する影響

