

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

氏名 石井 秀 樹

癌が転移するかどうかは、癌細胞と転移先の臓器環境との両方の性質に基づいて、それらの相互作用により決定されると考えられる。この相互作用の分子機構を理解することは、副作用の少ない新しい抗癌剤としての転移治療薬を開発するために必須である。また癌転移が臓器に特異的に起こり、その特異性は癌細胞が流入する確率とは明らかに異なっていることから、生物学的に解明されていないメカニズムが、転移形成には重要であることが従来から指摘されていた。しかし、相互作用の担い手である宿主側の細胞、相互作用の仲立ちをする分子などの実体が明らかでないため解析が困難であった。本論文では、同種同系癌細胞による大腸癌の肝転移モデルを用いて、転移形成に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が目標とされた。具体的には、全体が三つの部分からなり、それぞれ、(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し、このモデルを用いて関与する因子を同定する、という研究を行なった結果が述べられている。

第一部(第2章)では、微小転移の形成と転移腫瘍の形成が経時的に観察された。血行性転移する cplon 38 細胞の初期分布を明らかにするため、この細胞を蛍光標識して同系マウスの脾臓内に投与し、生体微弱蛍光顕微鏡を用いて肝臓での分布を観察した。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。この結果から、癌細胞は一時的には門脈内に留まり、何らかの要因で類洞内に移動する事が示された。次に、colon 38 細胞によって肝転移が形成する過程での、宿主細胞の分布の変化を経時的に観察した結果が述べられている。方法としては colon 38 細胞を脾臓内投与し、1週間及び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種々の宿主細胞のマーカーを病理組織学的に検出した。1週間後の肝臓では直径約 1 mm の微小転移が存在し、こ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、結合組織形成、血管新生が起きる事が示された。この段階では癌細胞と宿主の細胞は個々に互いに隣接しているが、4週間後では直径約 3 mm 以上の転移巣が形成され、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分布していた。すなわち、微小転移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

ことが示された。

第二部（第3章）では、宿主細胞の肝転移腫瘍の確立過程における重要性を実験的に示そうとした結果が述べられている。方法としては、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 細胞脾臓内移植前から、血管新生阻害物質である TNP-470 は移植後から肝臓摘出時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、免疫組織化学的な染色を行った。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。投与群と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ため、腫瘍細胞の初期分布や増殖時における腫瘍組織の構成ではなく、転移結節が形成するかが薬物によって影響を受けることが示された。

第三部（第4章）では、癌細胞と宿主の細胞との相互作用の実験的な解析結果が述べられている。腫瘍肝転移形成後期において *in vivo* で 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 細胞とその緑色蛍光蛋白（GFP）遺伝子導入細胞とを共培養すると、個々の細胞が混在して観察されたが、colon 38 細胞の GFP 遺伝子導入細胞と同系マウス由来の繊維芽細胞株 NIH3T3 を共培養すると、コンフルエント時に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いた。これらの状態は colon 38 細胞を脾注した 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。一方、colon 38 細胞と肝類洞内皮（HSE）細胞との相互作用に関しては、液成因子の関与を追求した。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 *in vitro* で検討した。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。癌細胞が肝臓に到達した後、24 時間以内に 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、肝臓での増殖を促進する可能性が示された。

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。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。学位申請者は、colon 38 細胞が肝臓に着床し、微小転移巣を形成し、さらには大きな転移巣を形成する過程を、形態学的に詳細に

観察した。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得た。この間に、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。この相互作用に関与する分子の同定には至らなかったが、これを解析するための細胞相互作用の変化を再現する *in vitro* のモデルの作製に成功した。以上の研究成果は、消化器癌の肝転移のメカニズムを明らかにする上で重要な、実験病理学的な基礎を築き上げたものである。癌転移研究を中心とする腫瘍学に資するところが大きいことは、言うまでもない。よって、本研究を行った石井秀樹は博士（薬学）の学位を得るにふさわしいと判断した。