

第 9 回群馬 Clinical Oncology Research 勉強会

日 時：2003 年 11 月 6 日 (木)
場 所：群馬大学刀城会館
当番世話人：高岸 憲二 (群馬大院・医・機能運動外科学)

一般講演

1. ヒト骨肉腫細胞の転移能と関連した生物学的性質と
遺伝子発現の変化

中野 哲宏, 清水 公裕, 浜田 邦弘
大和田 進, 森下 靖雄
(群馬大院・医・臓器病態外科学)
谷 賢実, 横田 淳
(国立がんセンター研究所生物学部)

骨肉腫の治療において肺転移は生命予後を左右する因子であり、骨肉腫肺転移の病態解明と新たな治療法の開発が待たれる。それらの目的において、ヒト骨肉腫細胞株から肺高転移株と低転移株を単離し、生物学的特性や遺伝子発現の相違を比較することによって、ヒト骨肉腫の肺転移能を規定する因子を同定することは極めて有用である。そこで我々は、ヒト骨肉腫細胞株 HuO9 から、*in vivo* selection 法及び希釈プレート法により、複数の高転移株 (M112, M132, H3), 低転移株 (L6, L12, L13) を単離した。高転移株 3 株は、ヌードマウスの尾静脈内に注入 (2×10^6 cells/0.2ml) すると、80 日以内に全例が 200 個以上の肺転移巣を形成したのに対して、低転移株 3 株は 200 日以上マウスが生存し、肺転移巣の数も平均 10 個以下であった。転移能と関連した生物学的性質の比較では、*in vitro* と *in vivo* での増殖能に差はなかったが、接着能、運動能、浸潤能に高転移株と低転移株の間に有意な差が見られた。また、cDNA マイクロアレイ法による 637 種類の癌関連遺伝子の発現の比較では、7 種類 (AXL, TGFA, COL7A1, WNT5A, IL-16, MKK6, BRAG) の遺伝子の発現が異なっていた。これらの結果から、高転移株と低転移株の転移能の差は、腫瘍原性及び増殖能の差によるのではなく、接着能、運動能及び浸潤能などの性質の違いによることが示唆された。さらに発現量に差が認められた 7 種類の遺伝子のうち、5 種類 (AXL, TGFA, COL7A1, WNT5A, MKK6) は接着能、運動能及び浸潤能に関連することが報告されている遺伝子であることから、これらの分子が骨肉腫細胞の接着能、運動能及び浸潤能の制御を介して、転移能に影響を与えている可能性

が考えられる。

2. 実験的パストール処理を行った膝関節の組織像

渡辺 秀臣, 篠崎 哲也, 小林 勉
高岸 憲二

(群馬大院・医・機能運動外科学)

パストール法は骨誘導能を保ちながら悪性細胞を死滅させる。骨悪性腫瘍が関節近傍に発生することから、関節構造組織に対するパストール処理の影響を組織的に検討した。【方 法】 日本家兎 32 匹を 2 群に分け、膝関節を摘出して 65 度 30 分で処理したパストール群と温熱処理を行わないで戻したコントロール群の関節の変化を 4 週毎に調べた。【結果および考察】 術後 4 週間で、骨の破壊が著明に確認され、その後徐々に骨の remodeling がみられた。この回復過程は、パストール群とコントロール群で差を認めなかった。軟骨は、4 週めから徐々に変性が見られたが、パストール群の方が早期に変性が現れる傾向を示した。半月板と靱帯には、4 週後に確認された細胞の消失が 16 週には回復し、細胞の出現を観察した。これらの軟部組織の反応は、パストール群とコントロール群に共通に見られた。【結 論】 骨、靱帯、そして半月板は、関節の摘出により一度死滅状態に陥るが、2ヶ月より再生の変化が見られるようになった。しかしながら、関節軟骨は一度摘出されると変性した。これらの変化は、パストール処理によっては、有意な影響を受けないが、軟骨の変性は早期に出現する傾向が見られた。

3. 放射線感受性の異なる PNET 細胞株の樹立と放射線誘発アポトーシス

石川 仁, 秋元 哲夫, 松田真里子
桜井 英幸, 中山 優子, 北本 佳住
原島 浩一, 斉藤 淳一, 長谷川正俊
中野 隆史 (群馬大院・医・腫瘍放射線学)
三橋 紀夫

(東京女子医科大学放射線医学教室)

【目 的】 当科で樹立した野生型 p53 遺伝子を有し、EWS キメラ遺伝子の存在が確認された放射線感受性

PNET 細胞株のキメラ遺伝子を確認し、放射線感受性を検討するとともに、連続して照射することで得られた放射線抵抗性株の差異を特に放射線誘発アポトーシスを中心に検討した。【方 法】 キメラ遺伝子の確認は RT-PCR 法およびサザン・ブロッティング法により同定した。放射線感受性をコロニー形成能による細胞生残率曲線によって比較するとともに、照射後の細胞周期の変化をフローサイトメトリーを用いて検討した。放射線誘発アポトーシスは照射後の細胞から DNA を抽出し、ラダー形成の有無で確認した。また、抵抗性株での p53 遺伝子変異の有無を PCR-SSCP 法で検索した。【結 果】 樹立した細胞株には EWS (exon-7)-FLI (exon10) のキメラ遺伝子が存在し、PNET 細胞株であることが確認された。細胞生残率曲線では高感受性株の Do は 1.14、抵抗性株では 1.37 と、明らかな放射線感受性の差異が認められた。また、高感受性株にのみ 2Gy 照射 24 時間後にラダー形成が認められた。対数増殖期にある細胞株の G2/M 期の割合は高感受性株の 9.3% に対して抵抗性株で 15.3% であった。2Gy 照射後の G2-block は高感受性株で顕著であり、G2-block からの解除も抵抗性株に比較して遅延していた。また、PCR-SSCP 法により抵抗性株に p53 遺伝子 の exon-5 ならびに exon-6 に変異が認められた。【結 語】 放射線照射により p53 遺伝子の変異が誘導されたことが、放射線高感受性 PNET 細胞株が放射線抵抗性を獲得した一因と考えられた。研究会ではマイクロアレイの結果も併せて報告する。

4. IFN- γ によるテロメララーゼ特異的 CTL 傷害性の調節機構

田嶋 公平，田中司玄文，桑野 博行
(群馬大院・医・病態総合外科学)

【目 的】 テロメララーゼの catalytic subunit である hTERT を標的とする CTL は白血病細胞を傷害する。今回我々は、HLA-A24 拘束性のエピトープ hTERT₄₆₁₋₄₆₉ に特異的な CTL の肺癌に対する傷害性と IFN- γ の影響について検討した。【方 法】 hTERT₄₆₁₋₄₆₉ をパルスした自己樹状細胞および CD40 活性化 B 細胞で数回刺激後、限界希釈法にて CTL clone を作成した。IFN- γ 処理は 100 U/ml、48 時間行った。傷害活性を ⁵¹Cr 遊離試験で測定した。TAP1,2 および hTERT の発現を半定量 RT-PCR にて、PA28 および LMP7 を Western Blot にて検討した。【結 果】 hTERT₄₆₁₋₄₆₉ 特異的 CTL clone は HLA-A24 陽性細胞株 6 株のうち 4 株に傷害性を認めた。IFN- γ 処理により、抗原提示関連遺伝子 (HLA-A24, TAP, LMP7, PA28) の発現はすべて上昇したが CTL に対する感受性に相違がみられた。傷害性が低下した細胞では hTERT の発現が減少していたが、傷害性の上昇した細胞では不変であった。【考 察】 hTERT を標的とした免疫療法はエピトープを提示している肺癌に対しては有効である可能性が示された。一部の肺癌細胞において IFN- γ 処理は hTERT 遺伝子の転写を抑制するため CTL に対する感受性の低下が認められた。

特別講演

司会：高岸 憲二（群馬大院・医・機能運動外科学）

骨軟部腫瘍における Bone Morphogenetic Protein (BMP) の発現と意義

吉川 秀樹
(大阪大学大学院器官制御外科学教授)