

氏名	むら 村 かみ 上 ひろし 弘
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2541 号
学位授与の日付	平成 15 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Morphological and biological heterogeneity of three tumorigenic cell lines derived from a single p53 <sup>-/-</sup> osteoblast-like cell line, MMC2. (p53 欠損骨芽細胞様細胞株 MMC2 より樹立された 3 種の腫瘍細胞の形態学的、生物学多様性について)
論文調査委員	(主査) 教授 日 合 弘 教授 鍋 島 陽 一 教授 中 村 孝 志

### 論 文 内 容 の 要 旨

骨肉腫は最も頻度の高い悪性骨腫瘍であり、病理学的に類骨を形成する悪性腫瘍として定義されている。しかしその病理像は著しい骨組織形成を伴うものから、殆ど類骨を形成しないものまで非常に多様であり、かつ臨床上の悪性度も多様である。このような多様性の背景には、起源となる細胞の相違あるいは腫瘍細胞における遺伝子変異などが関与していると想定されるが、その詳細は不明である。一方癌抑制遺伝子である p53 遺伝子は、その体細胞性変異が約60%のヒト骨肉腫において存在していること、経配偶子性変異をもつ個体が高頻度に骨肉腫を発生することより、その機能欠損が骨肉腫発生のキーとなる遺伝子である。共同研究者の中山は p53 ノックアウトマウスの頭蓋冠組織より骨芽細胞としての分化形質を有する細胞株 MMC2 を樹立した。この MMC2 に由来する腫瘍細胞を用いて骨肉腫の多様性を理解するための解析を試みた。

MMC2 をヌードマウスに移植後 10-12カ月という長期の潜伏期間を経て 3/8 箇所腫瘍形成が認められた。組織学的には著しい類骨形成を認めるもの (MMC2-P38-1)、わずかに認めるもの (MMC2-P23)、全く認めないもの (MMC2-P38-2) と明確な相違があった。それぞれの腫瘍より *in vitro* 細胞株を樹立し、アレル特異的 PCR により全て MMC2 由来の細胞であることを確認し、それぞれ MMOS2, MMOS1 及び MMOS3 と命名した。3 株ともヌードマウス接種後 2 週で腫瘍を形成し、その組織像では MMOS2 では著しい類骨形成が認められたのに対し、MMOS1 ではごくわずかであり、MMOS3 では全く認めず、起源となった腫瘍の組織像を反映する結果が得られた。

まず 3 種の細胞株の *in vitro* での増殖能を比較した。低血清 (1%) 条件での倍加時間に関しては MMOS3 (19hr) が MMOS1 (39hr), MMOS2 (25hr) より有意に短かった。また寒天培地における足場非依存性増殖能に関しても MMOS3 が他の 2 株より有意に高い値を示した。一方、*in vivo* での腫瘍増大速度に関しては、*in vitro* で血清依存性が最も高かった MMOS1 が他の 2 株よりはるかに早く、MMOS2 と MMOS3 の間には差がなかった。肺転移形成能に関しては、皮下接種の場合は MMOS2 のみ 1/10 で形成され、脛骨内に接種した場合は MMOS2 で 50% (5/10), MMOS1 で 30% (3/10) で転移巣が検出されたが、いずれの方法でも MMOS3 は転移巣を形成しなかった。このような *in vitro* と *in vivo* での生物学的活性の不一致には、血管新生能など *in vivo* 特有の因子が関与している可能性がある。次に *in vitro* における骨芽細胞としての形質を比較検討した。MMOS2 は ALP 活性、石灰化結節形成及び I 型コラーゲンの発現などの点において親株の MMC2 と同様な分化形質を示した。一方、他の 2 株での分化形質発現は低く、特に MMOS3 は分化誘導にも全く反応せず骨芽細胞としての形質を喪失したものと考えられた。オステオカルシンの発現低下とオステオポンチンの発現亢進が 3 種の形質転換細胞に共通した変化であり、癌化との関連性が伺われた。以上、MMC2 という共通した細胞を起源として病理学的、生物学的に著しく異なる 3 種の細胞株が形成されたことより、この実験系は骨肉腫の多様性が腫瘍細胞のもつ遺伝子変異の相違によって決定される場合のモデルであると考えられ、p53 遺伝子変異に加えて骨肉腫の発生に関与する遺伝子の単離のための材料となると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

骨肉腫の病理組織像及び臨床像は非常に多様である。p53<sup>-/-</sup>マウスより樹立した骨芽細胞株 MMC2 より、三種類の腫瘍細胞株 (MMOS1, MMOS2, MMOS3) を樹立し、骨肉腫の多様性を理解するための解析を試みた。いずれも造腫瘍能をもつが、形成された腫瘍の病理組織像は著しく異なり、MMOS2 が豊富な類骨をもつ典型的な骨肉腫を形成するのに対し、MMOS3 においては類骨形成は全く認められなかった。この分化度の差は、*in vitro* における石灰化誘導実験における結果に一致していた。増殖能に関しても多様であり、*in vitro* での血清非依存性は MMOS3 > MMOS2 > MMOS1 の順であったが、*in vivo* での増殖速度は MMOS1 ≧ MMOS2 = MMOS3 と、*in vitro* と *in vivo* の結果に解離が認められた。肺転移能は MMOS2 が最も高く、MMOS3 は転移を形成しなかった。三種の細胞株は共通した細胞 (MMC2) を起源としていることから上記の多様性は、それぞれの細胞株の最終癌化過程において発生した遺伝子変異によるものと考えられることより、この実験モデルは多様性を決定する遺伝子群の解析のための適切な材料となるものである。

したがって本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成14年12月17日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。