

京都大学	博士（ 医 学）	氏 名	由 井 理 洋
論文題目	Mesenchymal mode of migration participates in pulmonary metastasis of mouse osteosarcoma LM8 (間葉系細胞運動はマウス骨肉腫細胞株 LM8 の肺転移に関与する)		
(論文内容の要旨)			
目的：骨肉腫は日本国内で年間約 170 例発症し、小児骨悪性腫瘍の中で最も頻度が多い。難治性肺転移のため、この 20 年間 5yr relapse free survival は 70%程度で改善していない。本研究は骨肉腫肺転移のメカニズムの解明と抑制を目的とする。 方法：マウス高肺転移株 LM8 はマウス自然発生骨肉腫株 Dunn より in vivo selection を経て樹立され、皮下移植後 4 週間で肉眼的肺転移を形成する。Dunn は皮下移植後肺転移を起こさないため、2 つの細胞株を比較することで骨肉腫肺転移に関わる生物学的特徴を明らかにし、薬剤又は低分子化合物による転移抑制効果を検討する。 結果：LM8 は Dunn と比較し有意に filopodia 形成が多く、その差異は細胞外基質の存在により亢進した。免疫染色では LM8 は Dunn と比べ、actin stress fiber, focal adhesion の形成が低下していた。さらに autophosphorylated FAK Y397 の focal adhesion 部位への局在が顕著なことから focal adhesion turnover が亢進していることが示された。LM8 は Dunn と比較して Boyden chamber migration assay, wound healing assay で細胞運動能が共に亢進していた。Pull down assay で RhoA, Rac1, Cdc42 の活性を LM8 と Dunn で比較すると Cdc42 活性のみ LM8 が有意に高かった。Western blotting では LM8 は Dunn に比べて autophosphorylated FAK Y397 level の上昇が認められた。Rho-associated kinase を Y-27632 で阻害すると LM8 の細胞運動は低濃度(10 μM)で増加し以降濃度依存的に低下した。一方、Dunn の細胞運動は濃度依存的に低下した。LM8 を Y-27632 10 μM で処理すると Cdc42 活性は上昇し、integrin β1 機能阻害抗体で focal adhesion 形成を阻害すると Cdc42 活性は低下した。RNA 干渉効果による Cdc42 発現抑制と Cdc42 再発現の実験から、LM8 の細胞運動は Cdc42 活性に依存し、Dunn と LM8 の Cdc42 活性の差が細胞運動能の差を反映していると考えられた。 既存の抗癌剤による LM8 の細胞運動抑制効果を評価したところイリノテカンとその活性代謝産物 SN38 が細胞死を誘導しない低濃度で最も効果的に細胞運動を抑制した。さらに、イリノテカンは Cdc42 活性、FAK Y397 autophosphorylation を低下させ、filopodia 形成も可逆的に抑制した。LM8 を C3H マウスに移植し、イリノテカンを連日内服させる実験では、LM8 を皮下移植し 2 週間後に原発巣を切除する系、LM8 を静注する系いずれもイリノテカン投与群で有意に肺転移抑制が認められた。 考察：LM8 と Dunn の細胞運動はともに Rho- ROCK- myosin- stress fiber formation と Cdc42- filopodia formation- cell protrusion という 2 つのメカニズムに依っており、高肺転移株 LM8 は後者に依存する率が高い。これらは single cell migration における所謂アメーバ様細胞運動と間葉系細胞運動の差異を反映しており、LM8 の高肺転移性に関して間葉系細胞運動様式に伴う高運動性が重要であると推測された。イリノテカンの低容量、連日内服は骨肉腫肺転移抑制治療として今後検討されるべき治療法であると考えられた。			

(論文審査の結果の要旨) 骨肉腫において肺転移は予後を規定する重要な因子である。しかし肺転移に対する有効な治療法が確立されていないため、この 20 年間治療成績の改善が認められていない。そのため、骨肉腫肺転移のメカニズムの解明と肺転移抑制療法の開発が強く望まれている。 本研究は、マウス骨肉腫高肺転移株と低転移株の細胞形態、細胞運動を比較することで、骨肉腫の肺転移に関わる細胞生物学的特徴の検索を行っている。研究の結果、骨肉腫の転移には間葉系細胞運動様式による細胞運動の亢進が重要であることが明らかとなった。間葉系細胞運動は、Rho-ROCK-myosin 系シグナルへの依存度が低く、細胞外マトリックスからインテグリンβ1 を介したシグナル伝達による Cdc42 の活性亢進とそれに伴う Filopodia 形成に依存する傾向が見られた。また、自己リン酸化 FAK の上昇も明らかとなり、focal adhesion turnover の亢進も細胞運動亢進に関与していることが示唆された。骨肉腫の治療に使用される既存の抗癌剤のなかで、トポイソメラーゼ I 阻害剤であるイリノテカンがもっとも効果的に LM8 の間葉系細胞運動を抑制し、イリノテカン内服によってマウス骨肉腫肺転移モデルにおける有意な肺転移抑制効果が得られた。これらは細胞運動抑制療法による抗転移療法開発の可能性を示している。 以上の研究は、骨肉腫肺転移における間葉系細胞運動とそれに伴う細胞運動亢進の重要性を初めて明らかにし、また細胞運動抑制による肺転移抑制という新規の転移抑制療法の開発に寄与するところが多い。 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 23 年 1 月 24 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。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			