

氏 名	はし 橋 だ 田 ひろ 裕 き 毅
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2446 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 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	Basic and clinical research on the mechanism of colon cancer metastasis (大腸癌転移機構に関する基礎的および臨床的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 鍋 島 陽 一 教 授 千 葉 勉 教 授 山 岡 義 生

論 文 内 容 の 要 旨

癌治療において癌転移の制御は最も重要な課題の一つである。そこで癌転移機構に深く関与する細胞運動に関して研究した。細胞運動を抑制するマウスモノクローナル抗体を作製した。Balb/c マウスにヒト大腸癌細胞株 RPMI4788 を接種免疫し、B 細胞とマウスミエローマ細胞 SP2 を融合しハイブリドーマを作製しマウスモノクローナル抗体を得た。Boydon chamber を応用した直径 8 μ m の小穴が無数にあいた Transwell を用いて RPMI4788 が通過するのを抑制する抗体を選別し、細胞運動を抑制していることを確認するために、phagokinetic track assay を用いた。この中の一つが MH8-4 抗体で有意に細胞運動を抑制した。ウエスタンブロッティングにおいて 140kD の蛋白を認識していた。RPMI4788 から cDNA ライブラリーを作製し pDREF ベクターにライゲーションした後、Raji 細胞にエレクトロポレーションし細胞表面に発現させ、MH8-4 抗体を用い magnetic cell sorting (MACS) にてクローンを選んだ。エピトープを検討したところ、cDNA クローニングの結果、integrin $\alpha 3$ とほぼ一致した。ヒト大腸癌転移症例 40 例の原発巣と転移巣において、MH8-4 抗体を用いた免疫染色で、27.5% の症例で integrin $\alpha 3$ の発現は原発巣に比し肝転移巣で減弱し、原発巣より肝転移巣で増強している症例はなかった。即ち integrin $\alpha 3$ の発現の減弱は大腸癌における転移能と関係していることが示唆された。大腸癌 114 症例における免疫染色、RT-PCR での検討では、52.6% で integrin $\alpha 3$ は陽性で、integrin $\alpha 3$ の減弱はリンパ節転移 ($P=0.002$)、壁深達度 ($P=0.017$)、臨床病期 ($P<0.001$) と有意に相関していた。Disease-free survival, overall survival で、integrin $\alpha 3$ の減弱は大腸癌患者の予後不良因子であった ($P<0.001$, <0.001)。多変量解析で integrin $\alpha 3$ は独立した予後因子であった ($P=0.036$)。

次に大腸癌が進展する過程での integrin $\alpha 3$ と他の因子との協調関係を調べた。正常組織において integrin $\alpha 3$ と複合体を形成する膜 4 回貫通蛋白の中で転移抑制因子である MRP-1/CD9 と KAI1/CD82 との関係を免疫染色、RT-PCR を用い、各々の発現程度をプロットし相関係数を求めた。病期 I では integrin $\alpha 3$ と MRP-1/CD9, KAI1/CD82 は有意に相関していたが、病期が進行するに連れて相関関係が認めなくなり、癌化に伴ってその複合体が崩壊し転移が起こっていくと考えられた。

一方、癌転移進展には血管新生が関与し、その制御も癌治療において重要である。前述の抗体の作製と同様に、細胞運動を抑制するマウスモノクローナル抗体を作製した。さらに血管新生に与える影響を検討した。Matrigel でコートされた Transwell で、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の運動を抑制する抗体 MH8-11 を選別した。この抗体がもう一つの血管新生の機構である管腔形成能に与える効果を調べた。MH8-11 抗体は Matrigel 上での HUVEC の管腔形成能を有意に阻害した。MH8-11 抗体を用いたウエスタンブロッティングでは 165kD の蛋白を認識し、クローニングした結果、エピトープは aminopeptidase N (APN)/CD13 とほぼ一致した。MH8-11 抗体を用いヒト大腸癌症例 114 例で APN/CD13 の発現を検討したところ、APN/CD13 は壁深達度と有意に相関していた ($P=0.025$)。また disease-free survival, overall survival において、APN/CD13 陽性群では有意に予後不良であった ($P=0.014$, 0.033)。リンパ節転移陽性の症例群で有意に予後不

良でありリンパ行性転移との関係が示唆された。多変量解析では APN/CD13 は独立した予後因子であった ($P=0.023$)。即ち腫瘍での APN/CD13 の発現が血管新生に関与し、血管内皮の細胞運動をコントロールすることが、管腔形成を抑制し、癌の転移進展抑制に重要であることが示唆された。最近、APN/CD13 が新生血管に強発現し、その血管に特異的に NGR peptide が homing し、抗血管新生療法の標的となりうるなどの報告が散見され、注目されている分野の一つであるといえ、今回の研究結果からも大腸癌に対する抗体療法や遺伝子治療の新しい可能性を示唆するものと考えられた。

大腸癌において integrin $\alpha 3$, APN/CD13 が細胞運動、血管新生に重要であることが確認され、さらなる癌転移機構の解明とその制御が今後の癌治療において展開されると期待される。

論文審査の結果の要旨

癌治療において癌転移の制御は最も重要な課題の一つであり、癌転移機構に深く関与する細胞運動に関して研究した。大腸癌細胞運動を抑制するマウスモノクローナル抗体を作製した、MH8-4 抗体は有意に細胞運動を抑制し、140kD の蛋白を認識していた。エピトープは、integrin $\alpha 3$ とほぼ一致した、ヒト大腸癌転移症例の原発巣と転移巣において、MH8-4 抗体を用いた免疫染色で、integrin $\alpha 3$ の発現は原発巣に比し肝転移巣で減弱し、integrin $\alpha 3$ の減弱は大腸癌患者の予後不良因子であった。Integrin $\alpha 3$ の発現は大腸癌における転移能と関係していることが示唆された。

さらに、大腸癌で integrin $\alpha 3$ と複合体を形成する MRP-1/CD9 と KAI1/CD82 との関係を検討したところ、癌化に伴いその相関関係は消失し、その複合体が崩壊する可能性が示唆された。

癌転移進展には血管新生が関与し、その制御も、癌治療において重要である。癌細胞運動を抑制するマウスモノクローナル抗体を作製し、さらに血管新生に関わる血管内皮細胞運動に注目し、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の運動も抑制する抗体 MH8-11 を選別した。MH8-11 抗体は 165kD の蛋白を認識し、エピトープは aminopeptidase N (APN) とほぼ一致した。この抗体は HUVEC の管腔形成能も阻害し、APN は血管新生にも関わることを確認された。大腸癌症例で APN 陽性群では有意に予後不良であった。APN は血管新生に関与し、大腸癌の転移進展に重要であることが示唆された。

以上の研究から、大腸癌転移機構において integrin $\alpha 3$, APN が細胞運動、血管新生に重要であることが解明され、大腸癌治療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14年1月10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。