

氏名	いのうえ ともこ 井上智子
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第535号
学位授与年月日	平成18年 3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Characteristic patterns of VEGF, integrins, ER $\alpha$ and HER2 immunoreactivity suggest two tumor cell populations in DMBA-induced rat mammary tumor (VEGF、インテグリン、ER $\alpha$ 、HER2の特徴的な免疫反応パターンは、DMBA誘発ラット乳腺腫瘍における2つの腫瘍細胞集団を示唆する)
学位論文審査委員	(主査) 林一彦 (副査) 井上貴央 應儀成二

## 学位論文の内容の要旨

近年、腫瘍実質中の特定の細胞集団が腫瘍の進展に強く関わっている可能性が報告されている。そこで、エストロゲン感受性が高く血管新生の豊富な乳癌モデルであるジメチルベンツアントラセン (DMBA) 誘発ラット乳腺腫瘍を用いて、腫瘍の病態生理に関わる各種因子の免疫組織化学染色を行い、腫瘍細胞集団の存在様式とそれらの特徴や機能について検討を行った。

### 方法

8週齢の雌性SDラットに20 mgのDMBAを経口投与して、約3ヶ月後に形成された37個の腫瘍のうち、直径10~15 mmの腫瘍10個を実験材料として使用した。新鮮凍結した腫瘍から凍結切片を作製し、H&E染色または免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色には血管内皮増殖因子(VEGF)、腫瘍の浸潤に関わる接着因子である $\alpha 3$ 、 $\alpha 6$ 、s1、s4インテグリン、エストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ )、乳癌の予後に関わる癌遺伝子産物のヒト上皮細胞増殖因子受容体2 (HER2)、増殖能が低い細胞の指標となる細胞周期抑制因子のp27、基底膜の構成要素のラミニンに対する抗体を使用した。腫瘍組織における各分子の発現と分布を観察するとともに、腫瘍細胞集団における分子の陽性率を算出し、Fisherの検定法を用いて統計学的検定を行った。さらに、腫瘍細胞集団が筋上皮に由来するのではないことを確認するため、乳腺腫瘍と対照のラット授乳期乳腺を透過型電子顕微鏡(TEM)で観察し比較した。

## 結 果

使用した 10 個の腫瘍は病理学的にすべて浸潤性乳管癌に分類され、腫瘍の上皮は 2~数層であった。授乳期乳腺の腺房には TEM 観察の結果、腺上皮細胞と筋細糸を有する筋上皮細胞の二種類が認められた。一方、乳腺腫瘍では基底層と内層はともに、核が大きく核小体の著明な悪性の上皮細胞で構成されており、筋細糸を含む細胞はどちらの層にも認められなかった。免疫組織化学染色の結果、VEGF と  $\alpha 3$ 、 $\alpha 6$ 、s1 インテグリンの陽性反応は腫瘍小葉の最外層で基底膜に接する細胞の層（基底層）の細胞質に局在し、ER $\alpha$  と HER2 の陽性反応は腫瘍小葉の内腔側にある数層の細胞の層（内層）でそれぞれ核と細胞膜に局在する傾向が認められた。各分子の陽性率を検定した結果、VEGF、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 6$ 、s1 インテグリンは基底層の細胞に有意に多く発現しており、ER $\alpha$ 、HER2 は内層の細胞に有意に多く発現していた ( $p < 0.001$ )。p27 陽性細胞はいずれの層でも少数だったので、腫瘍実質細胞の増殖能は一樣に高いと考えられた。s4 インテグリンの反応は弱く、層による違いは認められなかった。ラミニンは腫瘍小葉周囲の基底膜に陽性であった。

## 考 察

免疫組織化学染色の結果、DMBA 誘発乳腺腫瘍の実質を成す腫瘍小葉は、基底層と内層の少なくとも二つの腫瘍細胞集団で構成されていることが示唆された。基底層の腫瘍細胞には VEGF と  $\alpha 3$ 、 $\alpha 6$ 、s1 インテグリンが、内層の腫瘍細胞には ER $\alpha$  と HER2 が発現していた。TEM 観察の結果、基底層と内層の腫瘍細胞集団はともに悪性の上皮細胞であり、一般に悪性度が低い乳腺腫瘍に認められる筋上皮由来の細胞は集団の構成に関わっていないことが判明した。基底層の VEGF 発現は腫瘍実質周囲へ血管新生を誘導するのに関連があると考えられた。インテグリンは  $\alpha$  と s の二量体として機能するため、おそらく基底層では  $\alpha 3s1$  と  $\alpha 6s1$  の二量体として発現していると推測された。これらのインテグリンはラミニンなどの細胞外基質成分と結合するので、腫瘍細胞が基底膜へ接着することや、間質へ浸潤することに関わっているのではないかと考えられた。また、 $\alpha 6s1$  インテグリンは VEGF の発現を高めることが知られているので、基底層の腫瘍細胞がこのインテグリンを介して基底膜へ接着することは、VEGF の発現を亢進させて血管新生を誘導する原因になっているのではないかと推測された。内層における ER $\alpha$  と HER2 の発現は、これらを共発現するヒト乳癌と共通の現象であり、このラット乳腺腫瘍モデルは内分泌療法における HER2 の役割を検討するのに適しているのではないかとと思われる。さらに、この乳腺腫瘍は、腫瘍細胞集団の特徴や、VEGF、インテグリン、ER $\alpha$ 、HER2 の機能や相互関係を研究するうえで有用な実験モデルになると考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、エストロゲン感受性が高く血管新生の豊富な乳癌モデルである DMBA 誘発ラット浸潤性乳管癌における細胞集団の存在様式とそれらの特徴や機能の解明を目的として、腫瘍の病態生理に関する各種因子の発現の有無を免疫組織化学法を用いて検討したものである。その結

果、筋上皮を含まない2～数層の上皮細胞で構成されるDMBA誘発ラット浸潤性乳管癌の腫瘍小葉は、VEGFと $\alpha 3$ 、 $\alpha 6$ 、s1インテグリンが明瞭な有意差を持って発現する基底層と、ER $\alpha$ とHER2が有意に発現する内層の少なくとも二つの腫瘍細胞集団で構成されていることが明らかとなった。これらの結果は、ER $\alpha$ とHER2が発現するヒト乳癌の内分泌療法、分子標的治療の検討やVEGF、インテグリン、ER $\alpha$ やHER2の機能と相互関係をラット乳癌モデルを用いて研究するうえでの重要な基礎的データとなる。本論文の内容は、外科学における乳癌研究の分野で明らかに学術の水準を高めたものと認める。