

氏名(国籍)	エムラ ファビアン (コロンビア)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第 3460 号		
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	Establishment and characterization of novel xenograft models of human biliary tract carcinomas (ヒト胆道癌における新たな xenograft モデルの確立と特徴)		
主査	筑波大学教授	医学博士	田中直見
副査	筑波大学教授	医学博士	金子道夫
副査	筑波大学講師	博士(医学)	磯部和正
副査	筑波大学講師	博士(医学)	大前比呂思

論文の内容の要旨

(目的)

胆道(胆嚢・胆管)癌は、根治切除可能症例でも局所領域や遠隔臓器転移を生ずる場合が多く、予後不良な疾患とされている。しかしながら、重要臓器の隣接する解剖学的に複雑な部位に発生する胆道癌は周囲の複数の臓器に進展し易く、腫瘍容積が小さいにも拘わらず、切除可能症例が少ない上、胃癌や大腸癌に比べて発生頻度が低く、間質成分が多いため癌細胞の培養樹立株が困難で、細胞レベルあるいは分子・遺伝子レベルでの特徴の解明は不十分である。また、ヒト胆道癌の動物移植モデルも極めて少ないため、宿主・腫瘍関係における腫瘍生物学的理解が進みがたいのが現状である。殊に、胆管癌では治療実験可能なヒト胆道癌の動物移植モデルは報告されていない。

本研究では、既に著者らが樹立したヒト胆道(胆嚢・胆管)癌細胞培養樹立株を用いて、ヌードマウス皮下に可移植性固形腫瘍(Xenograft)モデルを新規に作成し、分子標的抗癌剤などの開発、あるいは既存抗癌剤の治療実験、等の必要性を視野に入れつつ、新規 Xenograft の腫瘍生物学的特徴を明らかにする事を目的とした。

(材料と方法)

インフォームド・コンセントを得て筑波大学附属病院で手術した胆道癌手術標本より、理化学研究所・ジーンバンクの協力を得てヒト胆道癌細胞の培養細胞株を樹立した。このうち、ヒト胆嚢癌細胞株(TGBC-44)、およびヒト胆管癌細胞株(TGBC-47)の生細胞 $1 \sim 3 \times 10^7$ 個を 100 μ l の PBS に浮遊させマイクロシリンジで 5 週齢の雄ヌードマウス(Balb/c nu/nu)皮下に移植した。移植癌細胞がヒト由来である事は、Nucleoside pyrimidine (NP), peptidase B (PepB), lactic dehydrogenase のアイソザイム分画の分析、及び、分裂中期細胞の核型(Karyotype)を Gバンド法により解析することにより確認した。細胞移植後 2~3 日間隔で腫瘍径を計測し、200mm³以上に増大した場合に Xenograft が生着したと判定した。生着腫瘍の腫瘍

生物学的特徴として1) 移植生着率, 2) 腫瘍増殖特性 (成長曲線, 倍加時間), 3) 病理形態学的所見 (HE染色による Xenograft と原発病巣における病理形態学的比較, PAS 染色によるグリコーゲン産生の有無), 4) 腫瘍進展や抗癌剤治療の効果あるいは胆癌宿主の予後に関わるとされる platelet derived endothelial growth factor (PDGF), thymidylate synthase (TS), cyclooxygenase-2 (COX-2) などのタンパク発現, 等について検討した。

(結果)

ヒト由来胆道癌細胞株特異性の確認: アイソザイム分画の分析によると, TGBC-44 と TGBC-47 のバンドはコントロールとして用いたヒト由来の細胞株である HelaS 3 と等しく, マウス細胞の混入がないことが証明された。G バンド法では TGBC-44 において3種類の, TGBC-47 において8種類のマーカー染色体が同定された。

生着腫瘍の腫瘍生物学的特徴: 1) TGBC-44 および TGBC-47 細胞株のヌードマウス皮下移植の生着率は100%であった。2) TGBC-44 および TGBC-47 細胞株の移植5日および7日後にはそれぞれ計測可能な Xenograft になり, それぞれ3週間および4週間の指数増殖期を経て, 定常増殖期に移行する増殖曲線を描いて成長した。TGBC-44 および TGBC-47 Xenograft の指数増殖期に於ける腫瘍倍加時間はそれぞれ 3.9 ± 1.1 日および 4.1 ± 10.5 日であった。また, それぞれの胆癌マウスの平均生存日数は, 74 ± 1.5 日と 54 ± 2.5 日であった。3) TGBC-44 Xenograft は由来する胆嚢癌と類似する腺扁平上皮癌であった。原発胆嚢癌では典型的なケラチン形成を伴う扁平上皮癌は腫瘍辺縁の浸潤部位に主に観察され, 腺癌像を呈する部分と扁平上皮癌を呈する部分の割合は同程度であった。これに対して, TGBC-44 Xenograft ではケラチン形成を伴う扁平上皮癌が腺癌と散在性に混在しており, 扁平上皮癌成分は原発胆嚢癌に比べて少ない。TGBC-47 Xenograft は由来する胆管癌に類似した低分化癌であるが, より血管成分に富み肉眼所見でも易出血性であった。アルシアン青染色性の酸性ムチンは TGBC-44 Xenograft と原発胆嚢癌の両者に陽性発現しているが TGBC-47 Xenograft と原発胆管癌の両者では発現していない。また, PAS 染色陽性のグリコーゲンは両 Xenograft および両原発癌で発現していた。4) PDGF, TS, COX-2 の何れもが原発癌組織とそれぞれの Xenograft での発現を認めた。PDGF は TGBC-44 Xenograft と TGBC-47 Xenograft の両者で強発現していた。TS の発現は PDGF の発現より弱発現であるが, 両 Xenograft および両原発癌組織の全標本に発現していた。また, TGBC-47 Xenograft における TS の発現は TGBC-44 Xenograft の発現より弱発現であった。COX-2 発現は胆嚢癌細胞に比べて胆管組織に於いて原発癌と Xenograft を問わず強い発現を認めた。また, Western blotting 法で TGBC-44 Xenograft と TGBC-47 Xenograft の PDGF, TS, COX-2 の発現を検討したところそれぞれのタンパクに分子量に相応して発現がみられた。

(考察)

この研究はヒト胆管由来の腺癌, 胆嚢由来の腺扁平上皮癌細胞株 Xenograft の腫瘍生物学的特徴を初めて明らかにしたものである。いずれもヌードマウスに移植後, 急速な発育を示し, 形態的, 細胞生物学的にヒト由来癌組織に類似した特徴を示していた。これらのヒト胆道癌 Xenograft は癌化学療法ターゲットである酵素, PDGF/TP, TS, COX-2 の発現を有しており, 未だ未開発の胆道癌に対する有効な新規化学療法レジメ, あるいは新規の抗腫瘍活性薬剤を開発する上で, 有効なプラットフォームを提供できると考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

胆道 (胆嚢・胆管) 癌は, 根治切除可能症例でも局所領域や遠隔臓器転移を生ずる場合が多く, 予後不良

な疾患とされている。また、切除可能症例が少ない上、癌細胞の培養樹立株が困難で、細胞レベルあるいは分子・遺伝子レベルでの特徴の解明は不十分である。ヒト胆道癌の動物移植モデルも極めて少ないため、宿主・腫瘍関係における腫瘍生物学的理解が進みがたいのが現状である。本研究では、既に著者らが樹立したヒト胆道（胆嚢・胆管）癌細胞培養樹立株を用いて、ヌードマウス皮下に可移植性固形腫瘍（Xenograft）モデルを新規に作成し、新規 Xenograft の腫瘍生物学的特徴を明らかにする事を目的とした。その結果、ヒト胆管由来の腺癌、胆嚢由来の腺扁平上皮癌細胞株 Xenograft の腫瘍生物学的特徴を初めて明らかにした。未だ未開発の胆道癌に対する有効な新規化学療法レジメ、あるいは新規の抗腫瘍活性薬剤を開発する上で、有効なプラットフォームとなりうる可能性があり評価できる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。