

氏 名（本籍）	ひら 平	が 賀	まさ 雅	き 樹
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）			
学 位 記 番 号	医 博 第 1 7 8 0 号			
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 3 月 26 日			
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当			
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 (博 士 課 程) 外 科 学 系 専 攻			
学 位 論 文 題 目	大 腸 上 皮 の 悪 性 化 に 伴 う 細 胞 外 マ ト リ ッ ク ス へ の 接 着 性 の 変 化 と そ の 意 義			

(主 査)

論 文 審 査 委 員	教 授 松 野 正 紀	教 授 名 倉 宏
	教 授 貫 和 敏 博	

論文内容要旨

研究目的

癌細胞と正常上皮細胞の細胞外マトリックス（以下 ECM）への接着性を比較検討し、その細胞生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

研究方法

大腸癌で手術を行った 20 例より EDTA キレーション法および酵素消化法で正常上皮細胞及び癌細胞を分離し、ECM でコーティングした 96 穴プレートで細胞接着試験および抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体・抗インテグリン $\beta 1$ 抗体・マウス IgG1 κ （コントロール）を用いて細胞接着阻止試験を行った。また、ECM への接着性の変化と腫瘍占居部位・組織型・Dukes 分類・リンパ管侵襲・脈管侵襲などの臨床病理学的因子との関連を検討した。さらに、ECM 上での細胞の viability やアポトーシス誘導に対する耐性について検討した。

研究結果

細胞接着試験では、正常細胞では IV 型コラーゲン（以下 IV-CN）に $13.50 \pm 1.41\%$ ($P < 0.0001$)、ラミニン（以下 LN）に $7.18 \pm 1.10\%$ ($P < 0.01$) と有意に接着し、癌細胞では IV-CN に $8.21 \pm 0.71\%$ ($P < 0.01$)、LN に $16.82 \pm 0.64\%$ ($P < 0.0001$) と有意に接着した。すなわち大腸上皮の悪性化に伴って IV-CN への接着性は維持されるものの減弱する傾向があり、一方 LN への接着性は著しく増強した。細胞接着阻止試験では、正常上皮細胞では、IV-CN に対する接着は抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体・抗インテグリン $\beta 1$ 抗体で共に強く阻害されたのに対し、LN に対する接着はそれよりは弱く阻害された。癌細胞では、IV-CN に対する接着は正常細胞の場合と同様に抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体・抗インテグリン $\beta 1$ 抗体で共に有意に阻害されるのに対し、LN に対する接着は、抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体では阻害されず、抗インテグリン $\beta 1$ 抗体では弱い有意差を持って阻害された。ECM への接着性の変化と臨床病理学的因子との有意な関連は認められなかった。ECM 上での細胞の viability は正常細胞では IV-CN 存在下で ECM 非存在下や LN・フィブロネクチン（以下 FN）存在下に比し良好であったが、癌細胞では IV-CN のみならず LN 存在下でも ECM 非存在下や FN 存在下に比し極めて良好であった。抗癌剤によるアポトーシスの誘導は ECM 非存在下および各 ECM 存在下で有意差を認めなかったが、紫外線によるアポトーシスの誘導は LN 上で有意に抑制された。

結 論

大腸上皮の悪性化に伴ってLN接着性の獲得とIV-CN接着性の減弱が確認され、この現象によって癌細胞が転移能・増殖能の獲得やアポトーシス刺激に対する viability の維持能を獲得している可能性が示唆された。

研究の意義・独創的な点

細胞基質間接着に関して、大腸上皮の正常細胞と癌細胞の接着性を直接比較したり、臨床病理学的因子との相関を検討した研究はこれまでにない。本研究は手術標本より新鮮分離した細胞を用いて正常上皮細胞と癌細胞のECMに対する接着性の差異を比較検討した独創的な研究である。大腸上皮が悪性化に伴ってLN接着性の獲得とIV-CN接着性の減弱を示すことを明らかにし、これにより癌細胞が転移能・増殖能の獲得やアポトーシス刺激に対する viability の維持能を獲得している可能性があることを示した点で学術的意義が高い。

審査結果の要旨

生体内では正常大腸上皮・癌組織共にその周囲に細胞外マトリックス (extracellular matrix, 以下 ECM) が豊富な環境で存在している。従来その生理的な意義が不明であった ECM も1970年代にフィブロネクチンが発見されて以来研究が進み、正常大腸上皮が ECM との接着により生存シグナルを受けることや大腸癌細胞株の増殖能や運動能が ECM 上で高いことなどの報告がなされてきた。本研究では手術標本より新鮮分離した細胞を用いて正常上皮細胞と癌細胞の ECM に対する接着性の差異を比較検討し、その細胞生物学的意義について検討した。

大腸癌で手術を行った20例より EDTA キレーション法および酵素消化法で正常上皮細胞及び癌細胞を分離し、ECM でコーティングした96穴プレートで細胞接着試験を行った。正常細胞では、型コラーゲン (以下, -CN) に $13.50 \pm 1.41\%$ 、ラミニン (以下 LN) に $7.18 \pm 1.10\%$ と有意に接着し、癌細胞では、-CN に $8.21 \pm 0.71\%$ 、LN に $16.82 \pm 0.64\%$ と有意に接着した。すなわち大腸上皮の悪性化に伴って、-CN への接着性は維持されるものの減弱する傾向があり、一方 LN への接着性は著しく増強した。ECM への接着性の変化と腫瘍占居部位・組織型・Dukes 分類・リンパ管侵襲・脈管侵襲などの臨床病理学的因子との関連を検討したが有意な関連は認められなかった。次にこの接着性の違いの細胞生物学的意義を検討するために、ECM 上での細胞の viability やアポトーシス誘導に対する耐性について検討したところ viability は正常細胞では、-CN 存在下で ECM 非存在下や LN・FN 存在下に比し良好であるが、癌細胞では、-CN のみならず LN 存在下でも ECM 非存在下や FN 存在下に比し極めて良好であった。抗癌剤によるアポトーシスの誘導は ECM 非存在下および各 ECM 存在下で有意差を認めなかったが、紫外線によるアポトーシスの誘導は LN 上で有意に抑制された。以上のことから、大腸上皮の悪性化に伴い、-CN 接着性の減弱・維持および LN 接着性の増強が認められ、これは癌細胞の viability の維持・転移能・増殖能に関与していることが示唆された。

正常大腸上皮細胞・癌細胞の ECM 接着の意義は正常細胞・癌細胞それぞれについて次第に解明されつつあるものの不明な点が多く、特に ECM への接着性に関して同一の検体から分離した正常細胞と癌細胞の接着性の差を直接比較検討した報告はない。本研究は大腸上皮の悪性化に伴い、-CN 接着性の減弱・維持および LN 接着性の増強が認められることを明らかにし、この現象が癌細胞の viability の維持・転移能・増殖能に関与している可能性があることを示している。学位論文として十分に値するものである。