



Establishment of in vivo metastasis model of human adenoid cystic carcinoma : detection of metastasis by PCR with human β -globin gene

Komatsubara, Hideki

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-03-31

(Date of Publication)

2013-04-23

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2742

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002742>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 94 】

氏名・(本籍) 小松原 秀 紀 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)
学位記番号 博い第1489号
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付 平成15年3月31日

【 学位論文題目 】

Establishment of in vivo metastasis model of human
adenoid cystic carcinoma:detection of metastasis
by PCR with human β -globin gene
(in vivo モデルによるヒト腺様嚢胞癌転移株の樹立
:PCR法による β グロビン遺伝子を用いた微小転移の検出)

審 査 委 員

主 査 教 授 古 森 孝 英
教 授 前 田 盛
教 授 丹 生 健 一

緒言

腺様嚢胞癌 (adenoid cystic carcinoma 以下 ACC) は唾液腺原発の悪性腫瘍で、増殖は緩慢であるが、びまん性に浸潤し、肺転移の頻度が高いという特徴的な性格を有している。ACC の生物学的活性の解明や転移巣に対する治療法確立のためには、in vivo 転移モデルが望まれるが、ACC の動物移植モデルは報告されていないのが現状であった。われわれはヌードマウスに継代移植可能で、皮下移植後に自然肺転移を生じるヒト ACC 株 (KOA-1 と命名) を初めて樹立した。今回、KOA-1 をヌードマウス皮下に移植、経時的に組織学的検索および β グロビン遺伝子を用いた polymerase chain reaction 法 (以下 PCR 法) により肺転移巣の検出を試み、本実験系が ACC の in vivo 転移モデルとして有用であるかどうかについて検討した。

材料と方法

実験動物として 6 週齢、BALB/cANCrj-nu/nu ヌードマウスを用いた。

移植材料は 59 歳男性の口蓋小唾液腺原発 ACC 患者の手術摘出材料より採取し、ヌードマウス皮下にて現在まで 61 か月間、24 代継代中の KOA-1 腫瘍で、組織学的には solid pattern 優位の ACC である。

KOA-1 腫瘍を 1mm^3 に細切しヌードマウス皮下に移植、1、2、3 か月後に屠殺し肺組織を摘出した。肺組織は半分に分割し、一方は後述のように PCR 分析により転移の有無を判定した。残りの一方のうち一部はホルマリン固定、HE 染色により顕微鏡的に肺転移巣の有無を観察し、一部は別のマウス皮下に移植し 3 か月後の造腫瘍能を肉眼的に観察、腫瘍を形成したものを転移陽性と判定した。

PCR 分析は通法に従い DNA を抽出後、プライマーをヒト β グロビン遺伝子に設定しアウトプライマー、インナープライマーの 2 種類を作製、Nested-PCR 法を用いた。増幅産物を 2% アガロースゲルにて電気泳動し、269 base pair に β グロビン遺伝子の増幅されていたものを転移陽性とした。

結果

KOA-1 をヌードマウス皮下に移植すると、全例に腫瘍形成を認め、生着率は 100% であった。また、皮下でのダブリングタイムは 9.3 日であった。

結果を下表に示す。肺摘出時に肉眼的に明らかに転移を認めたものはなかったが、組織学的検索では 2 か月後で 7 匹中 0 匹、3 か月後で 18 匹中 5 匹に微小転移巣を確認できた。

PCR 分析では 1 か月後では陽性例はなかったが、2 か月後で 15 匹中 5 匹、3 か月後で 42 匹中 21 匹と、陽性率は組織学的検索よりも高かった。

摘出肺組織の造腫瘍能は 2 か月後の摘出肺で 8 匹中 0 匹、3 か月後の摘出肺で 24 匹中 6 匹に認められたが、造腫瘍能のみられた 6 匹はすべて PCR 分析では陽性を示していた。

	PCR 分析	組織学的検索	造腫瘍能
肺転移陽性率			
1 か月	0/10 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
2 か月	5/15 (33.3%)	0/7 (0%)	0/8 (0%)
3 か月	21/42 (50.0%)	5/18 (27.8%)	6/24 (25.0%)

考察

転移は癌の特徴的な生物学的活性であり、転移の予防により癌患者の予後は改善できる可能性がある。しかし、臨床的に転移を発見した時点では、すでに全身に癌細胞が播種され治療困難な状態となっていることも多い。腺様嚢胞癌 (ACC) は唾液腺原発の悪性腫瘍であるが、発育が緩慢であるにもかかわらず、高頻度で肺転移を生じるという特徴を有しており、ACC 患者の予後は局所制御よりもむしろ転移の状態に左右されることが多いと言われている。

ACC の転移に対する有効な治療法の確立のためには適切な動物実験モデルの開発が望まれる。これまでヒト ACC 由来株の細胞樹立の報告は 4 例報告されているが、いずれも実験動物への移植は困難とされており、動物へ移植後に自然転移を生じたとする報告はなかった。

一般にヌードマウス皮下に移植された癌細胞は、局所での発育はあるものの、転移を起こしにくいことが知られており、転移モデルとして用いる場合には血管内に移植したり同所性に移植したりすることにより転移率を上げる工夫がなされてきた。しかし血管内移植では転移のステップの一部しか再現できないこと、同所性移植では手技がやや困難になり再現性に乏しくなるという問題点がある。

この点、今回われわれが樹立したヌードマウス可移植性 ACC 由来株 (KOA-1) は、皮下移植後、高頻度に自然肺転移を生じるという、ユニークな腫瘍株である。また、KOA-1 皮下移植腫瘍のダブリングタイムは 9.3 日であったが、これはこれまでわれわれが経験した他の口腔癌のヌードマウス皮下移植腫瘍と比較して約 2~3 倍であった。このように本腫瘍株は、ヌードマウス皮下に移植された後も、発育が緩慢で肺転移を生じやすいという、ACC 本来の特徴を保持しているものと考えられた。

微小転移は通常の組織学的検索では検出できないことも多く、最近では分子生物学的手法により検出しようとする試みもなされるようになった。口腔領域では、サイトケラチン遺伝子や変異 p53 遺伝子を増幅して検出する報告もあるが、いずれも特異性に問題があり、臨床応用されるには至っていない。今回はヒトとマウスの種の違いを利用して、マウス肺組織から確実に KOA-1 細胞を認識する方法として、ヒト固有の β グロビン遺伝子の塩基配列を増幅する方法を用いた。その結果、PCR 分析では組織学的検索と比較して高い転移陽性率を認めた。

PCR 法は $10^6 \sim 10^7$ 個の細胞から一つの癌細胞を検出することが可能である。今回、摘出した肺の一部を別のマウス皮下に移植し、造腫瘍能を検討した結果、6 匹の摘出肺で造腫瘍能が確認できたが、これらの 6 匹はすべて PCR 分析では陽性反応を示していた。これらのことより、個体数が少なく断定的なことは言えないが、PCR 法による検出では偽陰性となることはきわめて少ないと思われた。逆に、検出感度が高いため、死滅し断片化した癌細胞由来の DNA を増幅し、偽陽性の原因となる可能性も考えられるが、PCR 法でも 1 か月後の陽性率は 0% で、経時的に検出頻度が高くなっていることから、ヒト β グロビン遺伝子の検出は KOA-1 の肺転移巣を正確に表わしているものと推測された。

以上のように、KOA-1 腫瘍はヌードマウスに皮下においても ACC 固有の性格を保持しており、PCR 分析では移植 3 か月後に 50% と高い肺転移を認めたことから、本実験系はヒト ACC の in vivo 転移モデルとして今後の研究に有用であることが示された。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲第 1495号	氏名	小松原 秀紀
論文題目	Establishment of in vivo metastasis model of human adenoid cystic carcinoma : detection of metastasis by PCR with human β -globin gene in vivo モデルによるヒト腺様嚢胞癌転移株の樹立 : PCR法による β グロビン遺伝子を用いた微小転移の検出		
審査委員	主 査	吉 森 孝 英 ()	
	副 査	新 田 誠 也	
	副 査	丹 生 隼 一 ()	
審査終了日	平成 15 年 2 月 25 日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

<p>緒言</p> <p>腺様嚢胞癌（以下ACC）は唾液腺原発の悪性腫瘍であり、予後不良の原因として高頻度におこる肺転移が臨床的に問題とされる。われわれはヌードマウスに継代移植可能で、皮下移植後に自然肺転移を生じるヒトACC株（KOA-1と命名）を初めて樹立した。今回、KOA-1をヌードマウス皮下に移植し、経時的に組織学的検索およびβグロビン遺伝子を用いたpolymerase chain reaction法（以下PCR法）により肺転移巣の検出を試みた。</p>
<p>材料と方法</p> <p>KOA-1腫瘍を細切し6週齢、ヌードマウス皮下に移植、1、2、3か月後に屠殺し肺組織を摘出した。肺組織は半分に分割し、一方は後述のようにPCR分析により転移の有無を判定した。残りの一方のうち一部はホルマリン固定、HE染色により光顕的に肺転移巣の有無を観察し、一部は別のマウス皮下に移植し造腫瘍能を肉眼的に観察、腫瘤を形成したものを転移陽性と判定した。</p> <p>PCR分析は通法に従いDNAを抽出後、プライマーをヒトβグロビン遺伝子に設定しNested-PCR法を用い269bpに増幅産物が確認されたものを転移陽性とした。</p>
<p>結果</p> <p>KOA-1をヌードマウス皮下に移植すると、生着率は100%であり、皮下でのダブルタイムは9.3日であった。</p> <p>肺摘出時に肉眼的に明らかに転移を認めたものはなかったが、組織学的検索では、1か月、2か月後では肺転移巣を検出できなかったが、3か月後では18匹中5匹（27.8%）に微小転移巣を確認できた。</p> <p>PCR分析では1か月後では陽性例はなかったが、2か月後で15匹中5匹（33.3%）3か月後で42匹中21匹（50.0%）と、陽性率は組織学的検索よりも高かった。</p> <p>摘出肺組織の造腫瘍能は1か月、2か月後の摘出肺では認められなかったが、3か月後の摘出肺で24匹中6匹に認められた。造腫瘍能のみられた6匹はすべてPCR分析では陽性を示していた。</p>

<p>考察</p> <p>ACCの転移に対する有効な治療法の確立のためには適切な動物実験モデルが必要であるが、これまで動物へ移植後に自然転移を生じたとする報告はなく、今回われわれが樹立したKOA-1株は、皮下移植後、増殖が緩慢で高頻度に自然肺転移を生じるという、臨床的なACCの特徴を保持した腫瘍株である。本研究では微小転移巣の検出をヒトとマウスの種の違いを利用して、マウス肺組織から確実にKOA-1細胞を認識する方法として、ヒト固有のβグロビン遺伝子を増幅する方法を用いた。その結果、PCR分析では組織学的検索と比較して高い転移陽性率を認めた。</p> <p>今回、摘出した肺の微小転移巣の造腫瘍能を検討した結果、造腫瘍能が確認できたものはすべてPCR分析では陽性反応を示していた。これらのことより、PCR法による検出では偽陰性となることはきわめて少ないと思われた。</p> <p>以上のように、KOA-1腫瘍はヌードマウスに皮下においてもACC固有の性格を保持しており、PCR分析では移植3か月後に50%と高い肺転移を認めたことから、本実験系はヒトACCのin vivo転移モデルとして今後の研究に有用であることが示された。</p> <p>本研究は、唾液腺由来腺様嚢胞癌の転移について、その転移機序解明の一助を研究したものであるが、従来では、検出困難であった早期肺転移の検出に成功し、in vivo転移モデルについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。</p>
