

学位論文の要旨

所 属	三重大学大学院医学系研究科 生命医科学専攻病態解明医学講座	氏 名	西村 明展
主論文の題名			
Three-dimensional alginate spheroid culture system of murine osteosarcoma			
主論文の要旨			
<p>【目的】 生体内で腫瘍細胞は細胞外マトリックスと相互作用し、3次元的に密接しながら増殖する。そして増殖とともに腫瘍組織内に不均一な微小環境（酸素濃度、pH、栄養など）を形成する。この微小環境より離脱した細胞は遊走、浸潤し、転移形成を開始する。このような生体内に類似した微小環境下で腫瘍細胞を培養するex vivoモデルは骨肉腫治療の開発に有用であると考えられる。本研究では、マウス骨肉腫細胞を用いてアルジネート3次元培養システムを作製し、その細胞の特性を維持できているかを評価した。さらに、このアルジネート3次元培養ビーズをマウス背部皮下へ移植することにより、新たな自然肺転移モデルとして成立するかどうかを評価した。</p> <p>【方法】 <u>細胞培養</u>：単層培養下に増殖させたマウス骨肉腫細胞株（Dunn）および、その高肺転移株（LM8）をトリプシン酵素処理後、アルジネートビーズ（4.0×10^6 cells/ml）にて3次元培養に供した。</p> <p><u>組織学的検討</u>：培養14日後、28日後のDunnとLM8のアルジネートビーズをHematoxylin-eosin (H-E) 染色にて染色し、組織学的な増殖形態を検討した。</p> <p><u>細胞増殖能</u>：培養2日～14日後まで2日毎にビーズ内に含まれるDunnとLM8のDNA量を定量化した。Hoechst 33258を用いたfluorometric assayで測定した。</p> <p><u>細胞離脱能</u>：24時間にDunnおよびLM8を含んだ1つのアルジネートビーズからビーズ外環境に離脱し、プレートへ接着した細胞数を計測した。培養翌日～7日後まで間、毎日計測した。計測は4% paraformaldehydeにて固定後、H-E染色にて細胞を染色し、光学顕微鏡下で計測した。</p> <p><u>In vivo アルジネートビーズ移植モデル</u>：Dunn (n=7) およびLM8 (n=8) を含む5ビーズ（約20万細胞）をC3Hマウス（5週令、オス）背部皮下に移植した。また、コントロールとしてアルジネートビーズのみ (n=2) を5ビーズ、マウス背部皮下に移植した。移植後、隔日で体重、腫瘍体積 [(短径)²×(長径)/2]を計測し、28日後に屠殺した。屠殺したマウスより、局所腫瘍、肺を摘出し、4% paraformaldehydeにて固定後、H-E染色で組織学的な検討を行った。また、肺の最大断面を光学顕微鏡下で観察し、その肺転移結節数を計測した。</p> <p>【結果】 <u>組織学的検討</u>：Dunn、LM8はいずれもアルジネート環境下で増殖し、ビーズの辺縁を中心としてコロニーを形成しながら増殖していた。個別のコロニーの大きさはLM8がDunnに比べて大きかった。</p> <p><u>細胞増殖能</u>：培養14日後まで、アルジネートビーズ内に含まれるDNA量はDunnとLM8共に増加した。両者のDNA量に統計学的有意差は認められなかった。</p> <p><u>細胞離脱能</u>：培養2日後よりDunn、LM8ともに離脱細胞を確認することができた。離脱細胞数は両者とも経時的に増加したが、その数はDunnに比べLM8で有意に多かった（培養2日後：p<0.05, 培養3日後～7日後：p<0.01）。</p>			

(注) 2, 000字以内にまとめて記入すること。

In vivo アルジネートビーズ移植モデル: 細胞含有ビーズはすべてのマウス皮下で生着、増殖した。移植8日後よりマウスの背部皮下に弾性硬の腫瘍結節を確認することができた。マウスの体重は各群間で有意差は認めなかった。腫瘍体積はDunn、LM8ともに移植28日目まで経時的に増加し、観察期間を通じDunnに比べLM8が有意に大きかった（移植後10、16、18、24、26日： $p<0.05$ 、移植後12、14、20、22日： $p<0.01$ ）。摘出した局所腫瘍を組織学的に検討するとアルジネートビーズを中心として腫瘍が増生している像が認められた。アルジネートビーズのみを移植した群では28日後でもアルジネートビーズが皮下に残存していたが、その周囲には炎症細胞浸潤などは認められなかった。また、肺転移はDunnで8匹中6匹（75%）、LM8では7匹中7匹（100%）と高率に認められた。結節数はDunnに比べLM8で有意に多かった（ $p<0.01$ ）。

【考察】本培養システムでは、マウス骨肉腫細胞はビーズの辺縁部を中心にコロニーを形成し、ビーズから細胞を離脱しながら増殖していた。腫瘍細胞の離脱は転移形成の最初のステップであるため、LM8がDunnに比べ、離脱細胞数が多かったことはその転移能の違いの一部を反映したものと考えられた。

現在、腫瘍の自然肺転移モデルは皮下投与モデル、同所投与モデルが一般的とされている。しかし、これらのモデルでは浮遊細胞を局所投与するため、腫瘍細胞が周囲組織に播種したり、血管内に迷入したりする可能性が考えられる。したがって局所での腫瘍増殖、離脱、浸潤の転移初期段階を再現できていない可能性がある。我々のモデルではビーズから離脱した細胞が局所で腫瘍塊を形成し、増殖、離脱、浸潤を介して転移を形成するため、より正確に転移の段階を反映したモデルと考えられた。

本培養システムはより生体内に近い微小環境を作り出す*ex vivo*モデルであり、皮下移植することにより、遠隔転移能を反映する新たな自然肺転移モデルとして成立した。マウス骨肉腫培養システムは抗腫瘍薬の薬剤スクリーニングや新たな転移メカニズムの解明に有用であると考えられる。