

学 位 論 文 要 旨

氏 名 清水 裕貴



論 文 題 目

「The role of Angiotensin II in liver metastasis formation

(肝転移形成におけるアンジオテンシン II の役割)」

指 導 教 授 承 認 印

小泉和之郎



要旨

【背景・目的】

本邦の大腸癌の罹患率、死亡率は上昇傾向を認めている。治療には①内視鏡的治療②外科的治療③化学療法があげられる。大腸癌は肝臓に転移しやすく、切除可能な場合は外科的治療の適応となるがそれは転移巣の大きさ・転移数により左右される。肝転移を認めた症例のうち約 15%は切除可能であるが、多くは切除不能でありその予後は不良である。そこで新たな癌の転移・浸潤の抑制に有効な分子標的薬剤の出現に期待がかけられている。

1998年に Lever は高血圧症の治療でアンジオテンシン変換酵素阻害剤(ACE阻害剤)を内服していた群は他種の降圧薬内服群より有意に癌による死亡率の低下を認めたことを報告した (Lancet. 352, 179-184, 1998)。このことから ACE 阻害剤によりアンジオテンシン II (AngII) の産生が抑制され抗腫瘍効果が出現したことが明らかになった。最近の研究で、Ang II 受容体のサブタイプである AT1A 受容体シグナルが血管新生促進因子の一つである血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF)を誘導し、腫瘍の血管新生を増強すること (Carcinogenesis. 2, 271-279, 2005)、血小板・内皮細胞を介し腫瘍の肺転移を促進すること (Am J Pathol. 2, 553-564, 2013) が報告されてきた。しかし、大腸癌の肝転移における詳細な機序はわかっていない。

本研究では、肝クッパー細胞による大腸癌の肝転移形成促進において AngII シグナルが果たす役割を検討した。

【方法】

(1) マウス大腸癌肝転移モデルの作成

雄性 8 週齢の C57BL/6 マウスを用い大腸癌肝転移モデルを作成した。ペントバルビタール麻酔下にマウスの左側腹部を切開し、腹腔外に露出した脾臓にマウス大腸癌細胞 (CMT-93: 2.0×10^6 cells) を接種し閉腹し、腫瘍細胞を接種した 2 週間後に検体を採取した。

(2) 薬剤投与による肝転移形成への影響

アンジオテンシン変換酵素阻害剤 (ACEI)・アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) を腫瘍細胞の接種後から検体採取まで経口投与 (100mg/kg) し、薬剤投与群と非投与群において肝表面の腫瘍占拠面積・肝組織における腫瘍促進に関与する因子の遺伝子発現 (RT-PCR) を比較検討した。

(3) AT1A 受容体シグナルの肝転移形成における役割

C57BL/6 野生型マウス (WT) と Ang II 受容体のサブタイプである AT1A 受容体ノックアウトマウス (AT1AKO) を用いて、肝転移形成における様々な因子に関して比較検討した。

①肝重量・肝転移率評価

肝重量・肝転移率を WT・AT1AKO それぞれ測定した。

②肝転移面積評価

肝転移面積評価のため、マクロレベルでは肝表面の腫瘍占拠面積を測定し、ミクロレベルでは Hematoxylin-Eosin (HE)染色にて肝組織における腫瘍面積を WT・AT1AKO でそれぞれ測定した。

③生存率評価

肝転移巣における腫瘍増大の評価のため、WT と AT1AKO で腫瘍接種後の生存率を調べた。

④血管新生評価

血管新生の評価のため、血管内皮細胞の表面マーカーとして知られる CD31 の遺伝子発現 (RT-PCR) を WT と AT1AKO でそれぞれ調べた。

⑤免疫組織学的評価

肝クッパー細胞のマーカーとして知られる F4/80 と抗腫瘍免疫に関与する TGF- β の遺伝子発現 (RT-PCR) と肝転移巣での陽性細胞数を WT・AT1AKO でそれぞれ調べた。

⑥肝転移巣における肝クッパー細胞の由来評価

肝転移巣における肝クッパー細胞の由来を評価するため、骨髄移植実験を行った。WT・AT1AKO に遺伝子組み換えにて GFP を組み込んだマウスの骨髄 (WT (+)-BM・AT1AKO (+)-BM) を、GFP (-) のマウス (WT (-)・AT1AKO (-)) に移植した。骨髄移植にてそれぞれ 4 群 (a) WT (+)-BM→WT (-)、(b) AT1AKO (+)-BM→WT (-)、(c) WT (+)-BM→AT1AKO (-)、(d) AT1AKO (+)-BM→AT1AKO (-) を作成し、肝表面の腫瘍占拠面積と免疫組織化学染色にて GFP・F4/80・TGF- β 陽性細胞をそれぞれ計測した。

【結果・考察】

(1) 薬剤投与による肝転移形成への影響

腫瘍細胞を接種した 2 週間後において、薬剤非投与群と比較して薬剤投与群では肝表面における腫瘍占拠面積が減少した。また肝クッパー細胞のマーカーである F4/80 と抗腫瘍免疫因子である TGF- β の遺伝子発現も薬剤非投与群と比較して薬剤投与群で低下していた。これより AngII 受容体シグナルにより肝転移形成が促進している可能性が示唆された。

(2) AT1A 受容体シグナルの肝転移形成における役割

これより WT と AT1AKO を比較検討した。

①肝重量・肝転移率評価

肝重量測定・肝転移率の結果より、AT1AKO と比較して WT で肝重量は増加し肝転移率の高値であった。肝転移が多いほど肝重量が増すため WT の方がより肝転移が多く、またマクロレベルにおいて WT の方がより肝転移していることが示唆された。

②肝転移面積評価

マクロレベル・ミクロレベルのどちらも、AT1AKO と比較して WT で肝転移面積が広がった。

③生存率評価

腫瘍接種 60 日後における生存率は、AT1AKO と比較して WT で低値であった。これより AT1AKO と比較して WT で肝転移巣における腫瘍増殖がより促進していることが推測された。

④血管新生評価

腫瘍増殖において血管新生は非常に重要であることが知られている。血管内皮細胞の表面マーカーの CD31 の遺伝子発現が AT1AKO と比較して WT で高値であり、WT でより腫瘍増殖が促進されていることが示唆された。

⑤免疫組織学的評価

F4/80・TGF- β の肝組織における遺伝子発現・肝転移巣における陽性細胞数はそれぞれ AT1AKO と比較し WT で高値であった。そして F4/80 と TGF- β の二重染色において double positive の細胞数も AT1AKO と比較し WT で高値であった。これより肝転移巣に肝クッパー細胞が集積し、肝クッパー細胞が抗腫瘍免疫を促進する TGF- β を発現していることが示唆された。さらに AT1AKO と比較し WT でより陽性細胞数が多いことより、AT1A 受容体シグナル依存性に転移巣における肝クッパー細胞の集積と TGF- β の発現が起こり腫瘍増殖が促進されることが推測された。

⑥肝転移巣における肝クッパー細胞の由来評価

骨髓移植より作成された 4 群を比較したところ、肝表面における腫瘍占拠面積は (a)、(b)、(c)、(d) の順に低下した。肝転移巣における F4/80 陽性細胞数・TGF- β 陽性細胞数・F4/80 と TGF- β の 2 重染色の陽性細胞数も同様に (a)、(b)、(c)、(d) の順に低下した。これより骨髓の種類よりも宿主の種類が肝転移形成により強く影響を及ぼす可能性が示唆された。また GFP と F4/80 の二重染色より肝転移巣における GFP-F4/80+細胞数は GFP+F4/80+細胞数の 3 倍以上あり、宿主由来の肝クッパー細胞が肝転移形成に関与する可能性が推測された。

【結論】

宿主由来の肝クッパー細胞が AT1A 受容体シグナル依存性に血管新生や抗腫瘍免疫に関与する因子を発現することで、大腸癌の肝転移形成を促進する可能性が考えられた。