

氏名(本籍)	生駒 哲朗 (岐阜県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位授与番号	甲第 578 号		
学位授与日付	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		
学位論文題目	A Definitive Role of RhoC in Metastasis of Orthotopic Lung Cancer in Mice		
審査委員	(主査) 教授 藤原 久義		
	(副査) 教授 森 秀樹	教授 竹村 博文	

論文内容の要旨

肺癌は、診断法の進歩している一方で、未だに十分な効果のある治療法は開発されていない。しかしながら近年、肺癌原発巣の浸潤、転移をコントロールすることによって、延命治療効果が示されている。そこで我々は、細胞の接着や運動において重要な役割を担っているRho family遺伝子の肺癌浸潤、転移における機能的役割の解析を行い、肺癌遺伝子治療の可能性を検討する事にした。

対象と方法

マウス肺癌細胞の一つであるLewis lung cancer (LLC)細胞におけるRho遺伝子の発現確認を、RT-PCR法を用いて行った。Rho family遺伝子を過剰発現した細胞を得るためにLLC細胞に対するRhoA, RhoC, dominant-negative Rho (dnRho), green fluorescent protein (GFP)の遺伝子導入は、Retrovirus vector(RV)を用いて行った。RVによる遺伝子導入効率を上げるために3回の重複感染を行った。遺伝子導入効率の確認はfluorescence activated cell sorter (FACS)によるGFPの発現細胞の割合の測定ならびにRT-PCR法によって行った。さらにRhoA, RhoC, dnRho, GFP遺伝子を導入した各遺伝子導入LLC細胞群とコントロールとして遺伝子導入を行わない親株LLC細胞(Parental)群の5群に分け以下の実験を行った。

- in vivo -

各々の遺伝子を導入する事によるLLC細胞の浸潤、転移に及ぼす影響について評価をするために、C57/BL6マウス(6-8週令, 雌)をエーテル麻酔下に皮下小切開を加えた後、各遺伝子導入LLC細胞(1×10³/匹)を直接肺内に投与し、肺癌モデルを作製した。モデル作製から10,14,21日後にsacrificeし、原発腫瘍体積、縦隔リンパ節転移重量の測定ならびに組織学的解析により、肺癌の浸潤、転移を評価した。

- in vitro -

- ①各遺伝子導入細胞の遊走、浸潤能の評価を孔径8.0- μ mのTranswell Biocoat Control chamberならびにBiocoat Matrigel invasion chamberを用いて行った。
- ②転移メカニズムを調べるために、各遺伝子導入細胞におけるmatrix metalloproteinases (MMPs)の発現をRT-PCR法を用いて行った。更に各遺伝子導入細胞のMMPs活性をGelatin Zymography法により評価した。

結果

LLC細胞において内在性のRhoA, RhoB, RhoC遺伝子が発現していることが確認された。RVは3回重複感染をさせることで、1回では56%,2回では74%,3回では86%まで遺伝子導入効率を上げることができた。RVによる遺伝子導入後の遺伝子発現レベルをRT-PCR法によって評価したところ、Parental群と比較してRhoA, RhoC, dnRho, GFPを導入した細胞ではそれぞれの導入遺伝子発現量の増加が認められた事から、以下の実験

に用いるRho family遺伝子を過剰に発現した細胞を得ることに成功した。

- in vivo -

原発腫瘍ならびに縦隔リンパ節転移重量は、各遺伝子導入細胞群のすべてで、モデル作製後時間経過ともなって増大した。モデル作製21日後における原発腫瘍体積は、各遺伝子導入群とParental群との間に有意な差は認められなかった。これに対して縦隔リンパ節転移重量はモデル作製後21日で、RhoC群:773±145mg(P<0.001), dnRho群:206±88mg(P<0.05), Parental群328±142mgであり、Parental群と比較してRhoA, GFP群に有意な差は認められなかったが、RhoC群において転移促進をdnRho群において転移抑制を認めた。

- in vitro -

- ①遺伝子導入細胞の遊走、浸潤能の解析の結果、Parental群の遊走細胞数の165±19cells に対してRhoC群では177±19cells(P<0.001)と増加を認め、dnRho群では153±17 cells(P<0.001)と減少を認めた。同様にParental群の浸潤細胞数は42±9cellsに対して、RhoC群では59±17cells(P<0.001), dnRho群では37±8cells(P<0.05)であり、浸潤細胞数はParental群と比較しRhoC群において増加を、dnRho群において減少を認めた。これに対して細胞の遊走浸潤能とも、RhoA, GFP群とParental群の間には有意な差は認められなかった。
- ②Parental細胞と比較してRhoCを導入したLLC細胞では、MMP-2, MMP-9, MT1-MMP, TIMP-2の遺伝子発現レベルの上昇を認めた。これに対してdnRhoを導入したLLC細胞ではMMPsの発現レベルの低下を認めた。更に、MMPs活性を調べた結果、RhoCを導入したLLC細胞において潜在型MMP-2, MMP-9, 活性型MMP-2の活性の亢進が認められた。これに対してdnRhoを導入したLLC細胞ではMMPs活性の低下を認めた。MMPsの発現、活性ともRhoA, GFPを導入したLLC細胞においてコントロールのParental細胞と比較して変化は認められなかった。

考察

本実験においてRho family遺伝子の中でも、RhoC遺伝子を過剰発現させることで細胞の遊走、浸潤の亢進を介して癌転移の促進が認められた。これに対して、dnRho遺伝子を過剰発現させることで細胞の遊走、浸潤の抑制により癌転移の抑制が確認された。

このことは肺癌の転移に、Rho family遺伝子の中でもRhoC遺伝子が深く関与していることを示している。これまでRho family遺伝子の変化は細胞接着や運動に関わることで、浸潤、転移を促進すると考えられてきたが、本実験においてRho遺伝子による肺癌転移のメカニズムの一つとしてMMPsの発現ならびに活性の上昇が関わる事が明らかになった。

結論

RhoC遺伝子の過剰発現はMMPsの発現の促進を介して肺癌転移を促進することが明らかになった。dnRho遺伝子などによるRhoC遺伝子の機能抑制は新しい肺癌遺伝子治療の可能性を示すと考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者 生駒哲朗は、RhoC遺伝子の過剰発現が、肺癌転移に重要な役割を演じていることを明らかにした。このRhoC遺伝子の発現を抑制させることで、臨床においても肺癌転移を抑制させる可能性があり、本研究は呼吸器学の進歩に少なからず寄与するものと思われる。

[主論文公表誌]

A Definitive Role of RhoC in Metastasis of Orthotopic Lung Cancer in Mice
Clinical Cancer Research. Vol.10(3);1192-1200,2004