The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Detection of Peritoneal Micrometastases of Gastric Carcinama with Green Fluorescent Protein and Carcionembryonic Antigen Promoter
Author(s)	金子, 克彦
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43798
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【11】

氏　　名	金子克彦（かねこかつひこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16580　号
学位授与年月日	平成13年11月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学　位　論　文　名	Detection of Peritoneal Micrometastases of Gastric Carcinama with Green Fluorescent Protein and Carcionembryonic Antigen Promoter Green Fluorescent Protein（GFP）とCEAプロモータを用いた胃癌腹膜微小転移巣の検出
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　門田　守人 （副査） 教　授　野口眞三郎　　教　授　金田　安史

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

我が国において胃癌は依然として癌死の中で重要な位置を占めている。早期胃癌の予後は良好であるが、進行胃癌においては根治的手術を行ったにもかかわらず術後に転移再発が生じる。中でも、腹膜転移再発は胃癌の治癒切除後の再発形式として最も頻度が高いものであり、このことは術中に手術操作による癌細胞の散布の可能性や、手術時すでに肉眼で同定できない微小腹膜転移が存在している可能性を示唆している。したがって、腹膜再発の治療には微小腹膜播種の検出方法の確立が必要と考えられる。本研究ではGreen Fluorescent Protein（以下GFP）の蛍光に着目し、これを腫瘍特異的に発現させることにより微小腹膜播種を同定しようとするものである。腫瘍特異性を得るために、上皮系細胞で発現のみられるCarcinoembryonic Antigen（以下CEA）遺伝子のプロモーターを用いた。CEA遺伝子のプロモーターにGFP遺伝子をつないだプラスミドDNAを作成し、これをin vitro及びin vivoで胃癌細胞株またはヌードマウス腹膜転移モデルに遺伝子導入し、GFP遺伝子の発現を観察することにより微小腹膜播種転移の検出が可能であるかどうかを検討した。

【方法】

ヒト胃癌細胞株MKN45、MKN1及びヒト繊維肉腫細胞株HT1080の培養上清中のCEA濃度をRIA法により測定した。次いで、各細胞株のCEA-mRNA発現量をRT-PCR法にて測定した。また、改変型GFP（以下EGFP）遺伝子の上流にCEAのプロモーターを挿入したpCEA-EGFP、cytomegalovirus immediate-early enhancerを持つpEGFP-N1、プロモーターのないpEGFP-1プラスミドを作成し、各々の細胞株にリポゾーム法を用いて遺伝子導入し蛍光の観察を行った。BALB/cヌードマウスの腹腔内にMKN45を1×10^7個投与し、4日目と6日目に2回30μg pCEA-EGFP、pEGFP-N1、pEGFP-1プラスミド由来のHVJ-liposome complexを各々腹腔内投与した。7日目に蛍光実体顕微鏡を用いてマウスの腹腔内臓器及び壁側腹膜の微小腹膜転移の観察を行った。

【結果】

培養液上清中のCEAはMKN45においてのみ検出されMKN1、HT1080では検出できなかった。CEA-mRNAの発現はRT-PCR法にて胃癌細胞株（MKN45、MKN1）両株で確認することができたがHT1080では検出できなかった。CEA-mRNA発現の見られた胃癌細胞株2株では、pCEA-EGFPのin vitroの遺伝子導入によりGFPの蛍光を観察することができた。

In vivo の遺伝子導入実験では、pCEA-EGFP 群、pEGFP-N1 群では腹腔内に蛍光結節がみられたが pEGFP-1 群では蛍光結節はみられなかった。pCEA-EGFP 群でみられた結節は pEGFP-N1 群の結節と異なり周囲の淡い蛍光もなく腫瘍結節が特異的に蛍光を発していると考えられた。

腹腔内の部位別の観察では、壁側腹膜上の微小転移の同定に最も有効であり、通常光観察において検出できない結節が蛍光実体顕微鏡観察下では多数観察された。壁側腹膜の最小蛍光結節は病理組織学的に微小転移巣であることが確認された。pCEA-EGFP 導入群での壁側腹膜上の微小転移の検出最小径は150μm程度と考えられた。一方、臓側腹膜の観察では、壁側腹膜と同様に多数の蛍光を持った結節を確認したが、腸管が自家蛍光を有しているため、特異的検出はやや困難であった。

【総括】

CEA プロモーターに GFP 遺伝子をつないだ plasmid を HVJ-liposome 法により遺伝子導入することによりヌードマウス腹腔内のヒト胃癌微小転移を特異的に検出することができた。この方法により微小転移を生きたままの状態で観察することが可能となり、手術時における微小腹膜転移の検出や腹膜転移の治療の評価に応用できる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

腹膜転移再発は胃癌の治癒切除後の再発形式として最も頻度が高いものであり、このことは術中に手術操作による癌細胞の散布の可能性や、手術時すでに肉眼で同定できない微小腹膜転移が存在している可能性を示唆している。したがって、腹膜再発の治療や評価には微小腹膜転移の検出方法の確立が必要と考えられる。

本研究では Green Fluorescent Protein (GFP) の蛍光に着目し、これを腫瘍特異的に発現させることにより微小腹膜転移を同定しようとするものである。腫瘍特異性を得るために上皮系細胞で発現している Carcinoembryonic Antigen (CEA) 遺伝子のプロモーターを改変型 GFP (EGFP) 遺伝子の上流に持ったプラスミドを作成し、胃癌細胞株またはヌードマウス腹膜転移モデルに遺伝子導入した後、EGFP 遺伝子の発現を観察することにより微小腹膜転移の検出が可能であるかどうかを検討した。

in vitro では CEA-mRNA 発現細胞株特異的に EGFP の発現を観察することができ、腹膜転移モデルにおいても HVJ-liposome 法を用いた遺伝子導入によって通常の観察では検出できない微小な結節を腫瘍特異的に EGFP を発現させることによって可視化診断することが可能となった。

これらの知見は従来の検査法では発見が困難な腹腔内の胃癌微小転移を初めて特異的に可視化を試みたもので、進行胃癌治癒切除後の大きな問題点である微小腹膜転移の診断や治療評価への臨床応用に重要な示唆を含んでおり、学位の授与に値するものと考えられる。